



HAL
open science

Glycoconjugués ciblés vers le foie : reconnaissance par des lectines pour la vectorisation de chélateurs de cuivre.

Marie Monestier

► To cite this version:

Marie Monestier. Glycoconjugués ciblés vers le foie : reconnaissance par des lectines pour la vectorisation de chélateurs de cuivre.. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV048 . tel-01690529

HAL Id: tel-01690529

<https://theses.hal.science/tel-01690529>

Submitted on 23 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie / Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marie MONESTIER

Thèse dirigée par **Pascale DELANGLE** et
codirigée par **Olivier RENAUDET**

préparée au sein du **Laboratoire de Reconnaissance Ionique et
Chimie de Coordination du Service de Chimie Inorganique et
Biologique, CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Glycoconjugués ciblés vers le foie : reconnaissance par des lectines pour la vectorisation de chélateurs de cuivre

Thèse soutenue publiquement le **02 octobre 2015**,
devant le jury composé de :

Pr. Florence DJEDAINI-PILARD

Professeur à l'Université de Picardie – Amiens (Rapporteur)

Pr. José Manuel GARCIA FERNÁNDEZ

Director del IIQ, Universidad de Sevilla (Rapporteur)

Pr. Peter FALLER

Professeur à l'Université de Stasbourg (Examinateur)

Dr. Anne IMBERTY

Directeur de recherche au CERMAV, CNRS - Grenoble (Présidente)

Dr Pascale DELANGLE

Ingénieur de recherche au CEA - Grenoble (Directrice de thèse)

Pr Olivier RENAUDET

Professeur à l'Université Joseph FOURIER (Co-directeur de thèse)



A mes parents...

Remerciements

Au cours de ces trois dernières années, il m'a été permis de travailler au sein de plusieurs équipes bien différentes. Cependant celles-ci ont toutes un point commun : j'y ai rencontré des personnes géniales, prêtes à m'accorder leur temps, leur sympathie et partager leurs savoirs et savoir-faire. Merci à tous pour votre accueil, votre amitié, votre générosité, ainsi que tous les bons moments de sciences ou du quotidien que nous avons passé ensemble. J'ai beaucoup appris à votre contact, et votre soutien m'a été infiniment précieux. La liste est longue, je souhaite remercier en premier lieu ceux que j'aurais malencontreusement oublié : merci du fond du cœur, j'espère que vous me le pardonnerez...

Avant toute chose, merci au Labex ARCANÉ pour avoir financé ma thèse et ainsi permis qu'elle se déroule dans de si bonnes conditions. Les formations et journées scientifiques du Labex m'ont été également très profitables.

Je souhaite remercier chaleureusement ma directrice, mon co-directeur et ma co-encadrante pour leur disponibilité et pour avoir cru en moi bien plus que je n'y croyais moi-même.

Merci à **Pascale Delangle**, ma directrice, pour avoir été d'un soutien infailible ces trois dernières années. Tes conseils, tes encouragements, ton investissement total, nos longues discussions et la confiance que tu m'accordes m'ont permis de progresser énormément et de gagner en confiance en moi. Tu m'as poussée quand j'en avais besoin et parfois même portée dans mes moments de faiblesse, veillant toujours à mon bien être avant tout. Merci pour ces belles choses que l'on a construit ensemble, scientifiquement et humainement, notre forte complicité et j'espère que l'on continuera au minimum à s'échanger de bonnes séries pour les moments de détente... Merci à **Olivier Renaudet**, mon co-directeur, qui depuis des années me guide et me conseille. Tu as su me convaincre de pousser l'aventure toujours plus loin ainsi que me communiquer ton enthousiasme et ta passion dont tu ne te sépares jamais. Ta confiance et tes encouragements m'ont été bien précieux ces... bientôt six dernières années ?? Merci pour ton aide, ton écoute, ton incroyable sympathie, ta bonne humeur, tes boutades et merci de m'avoir toujours accueillie à bras ouverts. Merci à **Christelle Gateau**, ma co-encadrante passionnée, pour nos réunions du vendredi matin à faire chauffer nos neurones ensemble sur la synthèse orga. Ton investissement corps et âme dans le projet, toutes tes excellentes idées, ton caractère enjoué et ta profonde gentillesse m'ont donné du cœur à l'ouvrage et ont été d'un grand soutien. J'ai adoré t'aider à l'organisation de la fête de la science, et merci pour être restée avec moi sur la plage une heure durant à chercher mes clefs, faisant preuve de beaucoup d'abnégation...

Pour simplifier les choses, mes remerciements sont ensuite organisés par laboratoires. Au risque de me répéter, je tiens à remercier chacun parce que vous avez fait beaucoup pour moi.

Au CEA Grenoble...

Au RICC, merci à **Pascale Maldivi** pour m'avoir accueillie au laboratoire et pour toutes les pauses festives. Merci également à **Thierry Douki**.

Merci **Maria Moula Karimdji**, ma Moumou, avec qui j'ai traversé ces 3 ans de thèses et tout partagé ou presque. Sans toi, rien n'aurait été pareil. Merci pour ton amitié, ton soutien, ton humeur pétillante et le soleil que tu as amené tous les jours avec toi au laboratoire. Même si la fin nous a éprouvées, c'est ton rire et tes expressions colorées qui restent gravées en moi pour m'avoir réchauffé le cœur au quotidien ! On a géré le steak ! Merci à **Colette Lebrun**, pour ta douceur, ta gentillesse et ton sourire à toutes épreuves. Merci aussi pour tes analyses de masse, ton aide à l'HPLC et ton implication dans le projet. Tu fais bien plus pour nous que de nous aider scientifiquement tu es notre maman du labo : ton soutien m'a été infiniment précieux. Merci à **Céline Rivaux**, pour m'avoir beaucoup appris dans la joie et la bonne humeur, pour ta disponibilité et ton dynamisme dès huit heures du matin et ce jusqu'au soir. Ton sourire, ton caractère adorable et attentionné, ton humour et tes réparties m'ont cruellement manqué... Merci à **Matthieu Starck**, ou Ronchonchon, mon co-bureau et un peu mon grand frère aussi ! On était quand même bien dans notre havre de paix à côté des RMN... Merci d'avoir toujours pris soin de moi ou m'avoir botté les fesses si nécessaire, pour les fous rires et les larmes qu'on a eu ensemble, pour ton amitié et tout le temps que tu as consacré au bien être du labo. Merci à **Bastien Boff**, alsacien rieur, Sherlock Holmes de la chimie et co-paillasse de choc ! Merci pour toutes les fois où nous nous sommes creusé les méninges ensemble, pour ton humour à toutes les sauces et les picons-bières qui rendent fourchette. Merci de tout cœur à **Lucile Chatelain**, qui m'a apporté toute la tendresse, la force et la robustesse dont j'avais besoin ! Merci pour ton calme, tes attentions, ton soutien, nos confidences et les sorties équitation ! Merci aussi à **Julie Andrez** pour ta joie de vivre, ton rire carillonnant dans les couloirs et aux pauses thé. Même si nous n'avons pas pu traverser la thèse toutes les 4 au coude à coude comme nous l'avions voulu, nos liens sont restés forts. Merci à **Jennyfer Molloy** dont la douceur, la générosité et l'humilité n'ont d'égal que le talent. Génie d'intelligence et de cœur, tu resteras pour moi un modèle. Attentive à tous, tu apportes aide et soutien devant ce dont chacun a besoin. Merci de m'avoir offert ton épaule sur laquelle m'appuyer, de m'avoir apporté force, optimisme et de grands bols d'air frais ! Merci à **Faustine Robert**, dont la sérénité, l'optimisme et la solidité m'ont épaulé et apaisé cette dernière année. C'était un plaisir et une chance d'avoir travaillé avec toi. Merci pour ton amitié, ton aide, ton enthousiasme et de m'avoir relevée dans les moments de doute. Merci à **Fanny Laporte**, dont la sympathie, la folie et la tendresse ont été de véritables bouffées d'oxygène. Grâce à ton recul tu m'as fait relativiser beaucoup de choses et j'attendais avec impatience tes visites au bureau pour papotages ou chansons qui ont rendu mes journées bien plus légères ces derniers mois. Merci à **Yves Chenavier**, dont l'imagination débordante, la curiosité et le plaisir de vivre m'ont sorti du quotidien. Il était fort agréable de laisser vagabonder nos esprits et voir s'épanouir nos âmes d'enfants, rêvant à des cabanes dans les arbres, plantes, minéraux et autres expériences loufoques au cours d'interminables repas... Merci à **Zohra Termache**, super héroïne d'un soutien incommensurable dans les méandres des démarches administratives. Merci pour les longues heures et l'énergie que tu m'as consacrées, de t'être souvent battue pour moi, et de t'être toujours soucie de mon bien être. Je n'ai qu'une vague idée de la partie immergée de l'iceberg de ce que tu fais chaque jour pour nous mais je sais que ta contribution est essentielle. Merci à **Valentin Guidal**, beau gosse du labo et toujours

prêt à mettre le feu au sens figuré comme au sens propre ! Merci à **Nathalie Sisomay**, émotive au grand cœur, pour nos courses effrénées en Twizzy et d'avoir toujours veillé à ce que je ne m'épuise pas au travail lors de baisses de régime. Merci à **Sebastiano Di Pietro**, qui m'aura causé beaucoup de crampes abdominales et aux joues à force d'hilarité. Merci à **Sylvain Veau**, l'homme de la situation, posé et toujours enthousiaste. Merci pour ton amitié, ta bonne humeur communicative ; j'aurais aimé passer plus de temps avec toi. Merci à **Edit Mesterhazy**, petite fleur de Hongrie, timide mais forte, débordante d'affection, de curiosité, de soif d'apprendre et de voyager. Merci à **Oliver Cooper**, paisible et adorable. Merci à **Laetitia Ancel**, tornade d'énergie, qui a tout mit de côté pour m'aider alors que j'en avais le plus besoin. Merci à **Alexandra Botz** pour ton sourire matinal. Merci à **Lydia Plassais** pour tes encouragements et tes conseils. Merci à tous les membres de l'équipe, en particulier **Jacques Pecaut** pour ton soutien, **Adrien Zambon**, **Lionel Dubois**, **Florence Duclair**, **Chady Moussalem**, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à partager des repas ou des pauses café, et **Vincent Lebrun** pour les papotages autour du robot de synthèse peptidique. Merci à **Stéphane Oros** pour nous avoir fait rire et rêver, même depuis le fin fond de l'Antarctique ! Merci à **Thibaut**, chimiste et artiste. Merci à **Pierre-Alain Bayle** pour ton aide précieuse en RMN, et à **Jean-François Jacquot**, pour être maintes fois venu à mon secours lorsqu'il était question d'informatique.

Au LCBM, merci à **Elisabeth Mintz** pour ta disponibilité, nos nombreux échanges et tes conseils. Merci à **Martine Cuillel** pour ta passion et tous le temps que tu m'as consacré lors de nos longues discussions sur les « Chel ». Merci de tout cœur à **Peggy Charbonnier** qui m'a tellement appris, avec une patience d'ange, une amitié franche, une énergie débordante et un optimisme toujours de la partie ! Merci pour être aussi une confidente et amie dont le soutien m'a portée, de près comme de loin, tout au long de ces trois ans. Merci à **Khemary Um** pour nos moments de complicité et ton aide précieuse à de nombreux points de vue... Merci à **Thomas Gallon**, confrère de vagabondages inter-labos. Merci pour tous les rayons de joie que tu as semé sur tes passages... Merci à **Giulia Veronesi** de m'avoir fait découvrir avec beaucoup de sympathie la magie des grands instruments ! Merci enfin à **Carole Mathevon** et **Amel Kouadri** pour votre accueil chaleureux et les pauses café salutaires. Merci à **Véronique Collin-Faure**, fidèle au rendez-vous du FACS et toujours prête à m'apporter ton aide entre deux gels. Merci pour ton sourire, ta bonne humeur, ton dynamisme et la profonde gentillesse dont tu m'as fait preuve.

Au SPRAM, merci à **Maria Mendéz Malaga** pour m'avoir offert autant d'amitié, de perspectives et de m'avoir prouvé que même avec du travail à revendre il est possible de se vider l'esprit ! Dessin, piscine, vélo, ateliers cuisines... je ne sais pas comment tu as réussi à me communiquer autant de motivation et d'énergie. Tu es géniale, laisse-moi t'embarquer dans mes valises... Merci à **Christophe Lincheneau**, à l'intelligence stupéfiante et la générosité sans borne. Ton soutien, les bouffées de force envoyées dans le bureau chaque soir ou presque, le chocolat, les conseils et tous le temps que tu nous à consacré la semaine comme les weekends... un simple merci ne saurait suffire. Merci à **Florent Caffy** pour ta patience, tes taquinages et ton aide à toutes heures. Merci à **Lucia Mattera** et **Louis Vaure**, chaleureux et attentionnés, pour vos sourires, votre soutien et m'avoir fait rire.

Au LAN, merci à **Christine Saint-Pierre** pour les moments de détente et ton aide aussi, **Marie Dorier**, j'ai eu plaisir à te retrouver et à nos discussions malheureusement toujours trop brèves au coin de l'escalier, **Nadège Hammond** et **Didier Gasparuto**.

Sur le campus universitaire...

Au DCM, au sein de l'équipe I2BM, merci à **Didier Boturyn** de m'avoir toujours chaleureusement accueillie et conseillée. Merci à **Nathalie Berthet**, pour ton soutien depuis toutes ces années. Merci pour ta douceur, d'avoir toujours veillé sur moi, ton amitié sincère... tu as été pour moi un véritable ange gardien ! Merci à **Baptiste Thomas**, ou Gribou, travailleur acharné mais passionné avant tout. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté, ta bonne humeur, ton amitié et nos sessions karaoké dans le labo. Merci à **Carlo Pifferi**, avec qui j'ai eu le plaisir de partager le labo mais trop peu de temps à mon goût : attentionné, toujours prêt à rendre service, et avec le sourire... tu aurais du venir deux ans plus tôt !!! Merci à **Adrien Grassin** pour avoir toujours réservé une place de choix à ta petiteuuu Marie, ton humour décapant, ta franche amitié et tes plaisanteries incessantes. Impossible de s'ennuyer une seconde avec toi ! Merci à **Laureen Bonnat**, pour tes accueils toujours chaleureux, ton caractère adorable, ton soutien, et nos cuites au jus d'abricot ! Merci à **Dhruv Thakar**, mon conscrit de thèse, pour ton calme, ton soutien et les bons moments passés ensemble. Merci à **Marc Rideout** pour toutes nos joyeuses chamailleries. Merci à **Morgane Lourdin**, consœur du labo des bisounours, et à **Michael Claron** pour m'avoir beaucoup faite rire. Merci à **Nicolas Spinelli**, pour tes encouragements, tes boutades, tes farces... et puis, tête de gondole toi-même ! Merci à **Clara Barrau** pour ton aide à la synthèse. Merci à **Sabine Chierici**, **Valessa Barbier**, **Fabien Thoreau**, **Rémy Lartia**, **Hugues Bonnet**, **Régine Rozand**, et enfin toute l'équipe pour votre accueil chaleureux. Merci aux « anciens », en particulier à maître **Romarc Bonnet**, ou Romichou, pour avoir enseigné aux jeunes disciples que nous étions comment survivre dans un laboratoire, et avoir toujours été pour moi soutien et écoute. Merci aussi à **Isabelle Bossu**, **Emilie Dufour** et **Michele Fiore**.

Merci enfin à **Fatima Haddache** du BEA, pour ton soutien, ton sourire et ta bonne humeur à toutes épreuves qui remettent sur les rails de l'optimisme !

Au CERMAV, merci à **Anne Imberty** et à **Jérémie Topin** pour m'avoir consacré beaucoup de leur temps et fait découvrir la modélisation moléculaire. Merci pour votre accueil chaleureux, toutes nos discussions et vos conseils. Merci Jérémie pour nos longues correspondances par mail alors même que tu n'étais plus au CERMAV, ton aide précieuse, ta générosité et tes corrections détaillées et fort utiles de mon manuscrit ! Merci mille fois.

Merci à mon comité de suivi de thèse, **Anne Imberty** et **Franck Fieschi**, pour tous vos conseils avisés qui mon guidés tout au long de ces trois ans, votre aide et votre implication. Ces comités n'ont jamais été une simple formalité, ils ont été essentiels dans beaucoup de mes choix. Merci à Anne d'avoir également pris soin de moi en congrés, pour ta sympathie et ta disponibilité (et merci aussi à Serge Perez !).

Merci à mon jury de thèse, **Florence Djedaini-Pilard**, **José Manuel Garcia Fernandèz**, **Peter Faller** et **Anne Imberty** d'avoir examiné ce travail. Merci pour vos conseils, vos

remarques constructives et votre sympathie. J'espère avoir l'occasion de vous rencontrer à nouveau, le temps nous à manqué pour de plus amples discussions.

Merci à mes élèves qui m'ont apporté bouffées d'air, assurance, sentiment d'accomplissement et plein de bons moments...

Enfin, merci à mon entourage, famille et amis, dont le soutien depuis toujours et en particulier ces trois dernières années m'ont permis d'avancer jusqu'ici !

Tout d'abord merci à **Papa et Maman**, pour tout ce que vous m'avez transmis et qui à fait ce que je suis aujourd'hui. Sans vous, votre soutien inconditionnel, vos attentions, vos inquiétudes... rien de tout cela ne me serait arrivé. Vous m'avez donné la curiosité, l'envie d'apprendre et de comprendre, enseigné l'humilité et l'esprit critique. Vous m'avez portée par vos encouragements, votre estime, vous avez respecté mes choix, vous êtes réjouis avec moi de mes bonheurs et m'avez offert vos bras, et un oreille attentive à mes doutes et mes angoisses... Bref je ne vous remercierai jamais assez de l'amour protecteur dont vous m'entourez. Merci à mes deux sœurs pour leur soutien, leur tendresse qui réchauffe le cœur, les fous rires à en pleurer et les chamailleries vite oubliées... Merci **Sixtine**, ma Nini (presque) jumelle, pour la fraîcheur et la folie que tu m'apportes, ton aide, les coachings pour ne pas tomber dans le laisser aller le plus total et rester au courant sur ce qui se passe en dehors de ma grotte^^ Merci **Lise**, ma Lili, pour m'avoir aiguillé, tracé la voie. Avec **Olivier**, vous m'avez aidé à franchir des étapes importantes de ma vie, rendu bien des services. Merci à **Théotime**, petit prince aux cheveux d'or à la tendresse et l'intelligence débordantes, ainsi qu'au tout petit **Balthazar** qui vient juste de voir le jour ; mes précieux trésors, vous remettez de l'ordre dans mes priorités... Merci aussi à tatie Marie-Jo, ma tatie Nounou, qui m'a offert ma première blouse de chimiste et a toujours pris soin de moi.

Merci à **Guillaume**, qui m'a supporté et qui a pris soin de moi au quotidien avec la plus grande tendresse chaque fois que je rentrais tard, épuisée, les nerfs à vif. Merci pour ta patience infinie, ton soutien dans chacune des épreuves que j'ai traversées. Merci de m'avoir poussée à me faire confiance, d'avoir séché mes larmes et toujours su me faire rire et relativiser chaque fois que j'ai avais besoin, soit très souvent. Avec toi pour m'épauler tout devient possible. Merci aussi à toute sa famille, en particulier **Marie-Claire, Gérard, Céline, Cédric, Romain, Isabelle, Bernard, Odile** pour votre profonde affection et avoir répondu présent alors que j'avais besoin d'aide et de soutien.

Je pense aussi à mes amis, **Damien, Camille et Bertrand, Magali, Adeline, Johanna**, qui m'ont écoutée et soutenu. Merci également à **Cécile Bouchard**, qui m'a transmis sa passion et qui est la preuve vivante que le respect et l'humanité fonctionnent si bien pour manager une équipe. Merci pour ta confiance et ton amitié.

Table des matières

INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE I- VECTORISATION DE CHELATEURS DU CU(I) VERS LA LECTINE ASGP-R POUR LA DETOXICATION DU FOIE	19
I - Le cuivre et la maladie de Wilson	19
I.1) La maladie de Wilson : définition et épidémiologie	19
I.2) Biologie du cuivre et physiopathologie	20
I.2.a - Le cuivre et la vie.....	20
I.2.b - Métabolisme du cuivre	22
I.2.c - Physiopathologie de la maladie de Wilson	24
I.3) Diagnostic et symptômes	24
I.3.a - Manifestations cliniques	24
I.3.b - Paramètres biologiques	25
I.3.c - Diagnostic génétique.....	25
I.3.d - Mise en place du diagnostic.....	26
I.4) Traitements existants	27
I.4.a - Chélateurs de cuivre	27
I.4.b - Les sels de zinc	28
I.4.c - Transplantations hépatiques.....	29
I.4.d - Perspectives	29
II - Conception de nouveaux chélateurs du Cuivre intracellulaire	31
II.1) La stratégie de chélation du cuivre intracellulaire	31
II.2) Chélateurs du cuivre inspirés de métallochaperonnes : la famille CP	33
II.2.a - Les métallochaperonnes	33
II.2.b - Les chélateurs de la famille CP.....	34
II.3) Chélateurs du cuivre inspirés des métallothionéines : la famille T	37
II.3.a - Les métallothionéines	37
II.3.b - Les chélateurs de la famille T.....	39
III - Le récepteur aux asialoglycoprotéines est une cible de choix pour la vectorisation de médicaments vers le foie.....	43
III.1) La vectorisation de médicaments vers le foie : choix de la stratégie.....	43
III.1.a - Pourquoi vectoriser les chélateurs ?.....	43
III.1.b - Vectorisation passive ou active ?.....	44
III.1.c - L'internalisation par endocytose.....	45
III.1.d - L'ASGP-R est la cible idéale pour la vectorisation vers les hépatocytes.....	46
III.2) L'ASGP-R : une lectine de type C	48
III.2.a - Qu'est-ce qu'une lectine ?	48
III.2.b - La classification des lectines animales.....	48
III.2.c - Les lectines de type C	49
III.3) Structure et fonction de l'ASGP-R	51
III.3.a - Structure de l'ASGP-R.....	51
III.3.b - Fonction de l'ASGP-R	54
III.4) Les propriétés de reconnaissance de l'ASGP-R	56
III.4.a - Mécanismes de reconnaissance monovalente	57
III.4.b - Reconnaissance monovalente des résidus terminaux des ASGP	59
III.4.c - Mécanismes de reconnaissance multivalente	60
III.4.d - Reconnaissance multivalente des oligosaccharides portés par les ASGP	61
III.5) Ciblage des ASGP-R par des ligands synthétiques.....	64
III.5.a - Modifications des sucres.....	64
III.5.b - Conception de ligands multivalents.....	67
III.5.c - Sélectivité par rapport à d'autres lectines	69

III.5.d - Applications pour la vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique ou diagnostique vers les ASGP-R 71

IV - Approche appliquée à la maladie de Wilson	76
IV.1) Vectorisation d'un chélateur de la famille CP	76
IV.1.a - Une plateforme cyclodécapeptidique possédant deux faces régiosélectivement fonctionnalisables	76
IV.1.b - Chel1 : un pro-chélateur du cuivre ciblé vers les hépatocytes.....	79
IV.1.c - Propriétés cellulaires de Chel1.....	81
IV.2) Vectorisation de chélateurs de la famille T	82
IV.2.a - Introductions d'unités de ciblage sur L ² et L ⁴	82
IV.2.b - Propriétés de chélation du cuivre	85
V - Problématique	88

CHAPITRE II- LA CYTOMETRIE EN FLUX POUR L'ETUDE D'INTERNALISATION DES GLYCOCONJUGUES DANS LES HEPATOCYTES89

I - Objectifs des travaux et démarche envisagée.....	89
I.1) Objectifs.....	89
I.2) Démarche.....	91
II - La cytométrie en flux.....	93
II.1) Principe et fonctionnement.....	93
II.1.a - Généralités	93
II.1.b - Les données collectées	95
II.1.c - Les réglages : voltages, régions, seuil et compensation	96
II.2) Présentation et analyse des résultats.....	97
II.3) Exemples d'applications	98
II.3.a - Méthode d'analyse du cycle cellulaire.....	99
II.3.b - Mesure de la viabilité cellulaire	99
II.3.c - Le tri cellulaire	100
II.3.d - Analyses de fonction cellulaires.....	101
III - Stratégie d'étude de l'internalisation des glycoconjugués par cytométrie en flux	102
III.1) Cytométrie en Flux pour l'étude de l'endocytose par l'ASGP-R.....	102
III.2) Marquage des glycoconjugués	106
III.3) Choix du type cellulaire et culture.....	107
III.4) Conditions d'incubation et d'acquisition au cytomètre	107
III.5) Mise au point des expériences de cytométrie en flux.....	109
III.6) Expériences de saturation des récepteurs	110
III.7) Expériences de compétition	111
IV - Conclusion	114

CHAPITRE III- LA FAMILLE DES CYCLODECAPEPTIDES (CP)..... 115

I - Elaboration des glycoconjugués pour l'étude de l'efficacité de ciblage.....	115
I.1) Différents dérivés de la famille CP.....	115
I.2) Stratégie de synthèse	117
I.3) Synthèse de l'unité de ciblage	118
I.3.a - Généralités sur la synthèse de sucres modifiés.....	118
I.3.b - Synthèse des GalNAc α ONH ₂ et GalNAc β ONH ₂	119
I.3.c - Synthèse des unités Gal β ONH ₂ et Lac β ONH ₂	121
I.4) Plateforme cyclodécapeptidique.....	121
I.4.a - La synthèse peptidique sur support solide	122

I.4.b - Stratégies de synthèse des différentes plateformes fonctionnalisées par des aldéhydes	124
I.4.c - Oxydation des sérines en aldéhydes.....	126
I.5) Assemblage et marquage par la cyanine 5.....	127
I.5.a - Assemblage des unités de ciblage avec la plateforme peptidique.....	127
I.5.b - Marquage par la sonde fluorescente sulfo-cyanine 5.....	128
II - Etude de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux	130
II.1) Internalisation du glycoconjugué CP ^{4α} dans les cellules hépatiques humaines.....	130
II.1.a - Saturation des récepteurs par CP ^{4α} -Cy5.....	130
II.1.b - Compétition entre CP ^{4α} -Cy5 et le GalNAc.....	131
II.2) Effet de la multivalence.....	132
II.2.a - Saturation des récepteurs par CP ^{3α} -Cy5 et CP ^{1α} -Cy5.....	133
II.2.b - Compétitions des CP ^{3α} -Cy5 et CP ^{1α} -Cy5 avec le GalNAc.....	133
II.3) Effet de la configuration anomérique.....	135
II.3.a - Saturation des récepteurs par CP ^{4β} -Cy5 et CP ^{3β} -Cy5.....	136
II.3.b - Compétition de CP ^{4β} -Cy5 et CP ^{3β} -Cy5 avec le GalNAc.....	136
II.4) Effet de la nature du sucre.....	137
II.4.a - Saturation des récepteurs par CP ^{4βGal} -Cy5 et CP ^{4βLac} -Cy5.....	138
II.4.b - Compétition de CP ^{4βGal} -Cy5 et CP ^{4βLac} -Cy5 avec le GalNAc.....	138
II.5) Effet de la longueur des bras espaceurs.....	139
II.5.a - Saturation des récepteurs par CP ^{4pegα} -Cy5.....	140
II.5.b - Compétition de CP ^{4pegα} -Cy5 avec le GalNAc.....	140
III - Conclusion de l'étude de la famille CP	142
CHAPITRE IV- LA FAMILLE DES TRIPODES (T)	143
I - Elaboration des glycoconjugués pour l'étude de l'efficacité de ciblage.....	143
I.1) Différents dérivés de la famille T.....	143
I.2) Stratégie de synthèse.....	146
I.3) Synthèse des unités de ciblage des ASGP-R reliées aux bras espaceurs.....	147
I.3.a - Unité de ciblage de T ^{3β} , T ^{1β} et de Chel4.....	148
I.3.b - Unité de ciblage de T ^{3α}	149
I.3.c - Unité de ciblage de Chel3 et Chel6.....	150
I.4) Synthèse des unités de chélation tripodales.....	152
I.4.a - Unité de chélation symétrique.....	152
I.4.b - Unité de chélation asymétrique.....	154
I.5) Assemblage des deux unités et marquage par la cyanine 5.....	154
I.5.a - Assemblage des unités de ciblage avec les unités de chélation.....	154
I.5.b - Marquage à la sulfo-cyanine 5.....	156
II - Etude de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux	157
II.1) T ^{3β} -Cy5 est internalisé sélectivement et efficacement dans les hépatocytes par l'ASGP-R ...	157
II.1.a - Saturation des récepteurs par le glycoconjugué T ^{3β} -Cy5.....	157
II.1.b - Compétition entre le glycoconjugué T ^{3β} -Cy5 et le GalNAc.....	158
II.2) Etude des différents paramètres sur l'efficacité d'internalisation.....	159
II.2.a - Influence du nombre de sucre.....	159
II.2.b - Influence de la configuration anomérique des sucres.....	160
II.2.c - Glycoconjugués analogues de Chel2 : Chel3, Chel4 et Chel6.....	160
III - Conclusion	162
CHAPITRE V- COMPARAISON DES DEUX FAMILLES CP ET T.....	163
I - Comparaison des efficacités d'internalisation des glycoconjugués des familles CP et T dans les hépatocytes par cytométrie en flux	163

I.1)	Saturations des récepteurs ASGP-R.....	164
I.2)	Affinement des résultats par expériences de compétition	165
I.2.a -	Comparaison avec un compétiteur commun : le GalNAc.....	165
I.2.b -	Compétitions inter-familles	165
II -	Etude de l'interaction glycoconjugué-lectine par modélisation moléculaire.....	166
II.1)	Modélisation de l'interaction monovalente des GalNAc avec la sous unité H1 de l'ASGP-R .	166
II.1.a -	Modèle d'interaction monovalente du GalNAc par mutagénèse dirigée.....	167
II.1.b -	Modélisation de l'interaction des GalNAc portés par les glycoconjugués des familles CP et T avec le domaine de reconnaissance de H1	169
II.2)	Interaction multivalente : difficulté de trouver un modèle	171
III -	Conclusion	174
	CONCLUSION GENERALE	175
	PARTIE EXPERIMENTALE	181
I -	Synthèse des composés de la famille CP.....	181
I.1)	Généralités.....	181
I.1.a -	Réactifs.....	181
I.1.b -	Equipements	181
I.2)	Synthèse des sucres modifiés avec une fonction oxyamine en position anomérique.....	182
I.3)	Synthèse peptidique	189
I.4)	Assemblage des glyconconjugués	202
II -	Synthèse des composés de la famille T	214
II.1)	Généralités.....	214
II.1.a -	Réactifs.....	214
II.1.b -	Equipements	214
II.2)	Synthèse de sucres modifiés avec une chaîne Peg en bras espaceur	215
II.3)	Synthesis of the tripodal pseudopeptide unit	230
II.4)	Assemblage des glycoconjugués.....	237
II.4.a -	General procedures.....	237
III -	Cytométrie en flux	245
III.1)	Généralités.....	245
III.2)	Culture cellulaire.....	245
III.3)	Incubation des cellules et expériences de cytométrie en flux	246

Abréviations

Alloc :	allyloxy-carbonyle	Eq. :	équivalent
Ac₂O :	anhydride acétique	ESI :	electrospray Ionisation
Ac :	acétyle	ES-MS :	<i>electrospray Ionisation mass spectrometry</i>
ADN :	acide deoxyribonucléique	FBS :	<i>fetal bovin serum</i>
Arg :	arginine	Fmoc :	fluorenylméthoxy-carbonyle
ASGP :	asialoglycoprotéine	FSC :	diffusion aux petits angles, <i>forward scatter</i>
ASGP-R :	récepteur aux asialoglycoprotéines	Fuc :	fucose
Asn :	asparagine	Gal :	galactose
ASOR :	asialoorosomucoïde	GalNAc :	<i>N</i> -acétyl galactosamine
Asp :	acide aspartique	Glc :	glucose
ATP :	adenosine tri-phosphate	GlcNAc :	<i>N</i> -acétyl glucosamine
BAL :	<i>british anti lewisite</i>	Gln :	glutamine
BET :	bromure d'éthyldium	ITC :	<i>isothermal titration calorimetry</i>
BF₃Et₂O :	éthérate de trifluorure de bore	KCR :	<i>kupffer cell receptor</i>
Bn :	benzyle	Lac :	lactose
Boc :	tert-butyloxy-carbonyle.	LacNAc :	<i>N</i> -acétyl lactosamine
CAN :	cerium ammonium nitrate.	LCBM :	Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
CERMAV :	Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales	LDL :	<i>low density lipoprotein</i>
Cco :	cytochrome C oxydase	Lys :	lysine
ConA :	concavaline A	Man :	mannose
Cy5 :	sulfo-cyanine 5	MBP :	<i>mannose binding protein</i>
Cys :	cystéine.	Met :	méthionine
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole	MGL :	macrophage galactose lectin
DAST :	diéthylaminosulfure trifluoride.	MIF :	moyenne d'intensité de fluorescence
DCC :	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimide	MM-GBSA :	<i>molecular mechanics - generalized born surface area</i>
DCM :	Département de Chimie moléculaire	NeuAc :	acide neuramidique (acide sialique)
DC-SIGN :	<i>cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin</i>	NHS :	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
DE₅₀ :	dose effectrice médiane	NMR :	<i>nuclear magnetic resonance</i>
DIPEA :	diisopropyléthylamine.	NPys :	<i>S</i> -3nitro-2-pyridinesulfenyl.
DL₅₀ :	dose létale médiane	NTA :	acide nitrilotriacétique
DMEM :	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	PEG :	polyéthylène glycol
DMF :	diméthylformamide.	PMT :	photomultiplicateurs
DMSO :	diméthylsulfoxyde	PNA :	<i>peanut agglutinin</i>
D-Pen :	D-pénicillamine	Pro :	proline
DRC :	domaine de reconnaissance des carbohydrates	PYS :	2-pyridyl-sulfanyl
EC₅₀ :	concentration efficace médiane	PyBOP:	benzotriazole-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate.
EDCI :	1-éthyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide		
EDTA :	éthylène diamine tétra-acétique		
ELLA :	enzyme-like lectin essay		

QDs : *quantum dots*
RE : reticulum endoplasmique
RHL : *rat hepatic lectin*
RICC : laboratoire de Reconnaissance
 Ionique et Chimie de Coordination
RMN : résonance magnétique nucléaire
RMSD : *root mean square deviation*
RX : rayons X
RP-HPLC: *reverse phase high pressure liquid
 chromatography*
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*
SCIB : Service de Chimie Inorganique et
 Biologique
Ser : sérine.
SOD : superoxide dismutase
SPPS : synthèse peptidique en phase solide.
SPR : résonance plasmonique de surface
SRLC : *scavenger receptor*
SSC : diffusion aux grands angles,
SideScatter
TASP : Template assembled synthetic
 peptide
tBu : tert-butyl.
TETA : triéthylène tétramine
TFA : acide trifluoroacétique.
THF : tétrahydrofurane.
Thr : thréonine.
TIS : triisopropylsilyl
TLC : *thin layer chromatography*
TMSOTf : trimethylsilyl
 trifluorométhanesulfonate
TNBS : trinitrobenzene-sulfonic acid.
TRIS : 2 amino-2-hydroxyméthyl-1,3-
 propanediol
TRITC : tétrméthyl-rhodamine isothiocyanate
Trp : tryptophane
Trt : trityl
TTM : Tétrathiomolybdate
XAS : spectroscopie d'absorption aux
 rayons X
XIAP : *X-linked inhibitor of apoptosis*

Code des acides aminés

G : glycine
A : alanine
V : valine
L : leucine
I : isoleucine
M : méthionine
P : proline
F : phénylalanine
Y : tyrosine
W : tryptophane
D : acide aspartique
E : acide glutamique
N : asparagine
Q : glutamine
H : histidine
K : lysine
R : arginine
S : sérine
T : thréonine
C : cystéine
M : méthionine

Introduction

Le foie est un organe essentiel de notre organisme, il assure de nombreuses fonctions vitales : métabolisme, production d'énergie et de sucs, filtration du sang... Un dysfonctionnement hépatique est de ce fait lourd en conséquences sur la santé. Or, de nombreuses maladies touchant cet organe ne disposent pas de traitement efficace. Ceci est notamment dû à l'insuffisance de l'accumulation des agents thérapeutiques dans les cellules affectée, ainsi que leur manque de spécificité, entraînant des effets secondaires.¹ Une solution séduisante à ce problème est le ciblage des agents thérapeutiques vers la cible biologique d'intérêt, dans le but de localiser leur action : c'est ce qu'on appelle la **vectorisation**. Face à l'augmentation continue de l'incidence des maladies hépatiques, la recherche d'un système de ciblage des hépatocytes, cellules composant majoritairement le foie, est urgente.²

Le ciblage des hépatocytes est facilité par la forte irrigation du foie, la perméabilité des vaisseaux alimentant cet organe et le fort niveau d'expression de transporteurs et récepteurs à la surface de ces cellules. En particulier, le **récepteur aux asialoglycoprotéines, dit ASGP-R**, suscite un intérêt croissant.³ L'ASGP-R est abondamment et presque exclusivement exprimé à la surface des hépatocytes, ce qui garantit une vectorisation efficace et sélective ces cellules.^{4,5} Cette protéine membranaire fait partie de la famille des **lectines** : elle reconnaît avec une forte affinité et sélectivité des ligands portant des sucres, qu'elle internalise dans la cellule par endocytose. Le ciblage de lectines est une stratégie thérapeutique intéressante, notamment pour la vectorisation de médicaments.^{6,7} Il nécessite la conception de ligands, ou « vecteurs », de structure multivalente parfaitement adaptée à la géométrie de la lectine pour une affinité et une sélectivité de reconnaissance optimales.^{6,8,9} De nombreuses plateformes multivalentes développées à cet effet sont décrites dans la littérature.¹⁰

Le foie est également responsable de la régulation du cuivre (Cu), métal indispensable au fonctionnement d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD1) impliquée dans la respiration. Il arrive qu'une mutation bouleverse cet équilibre finement régulé par diverses protéines. C'est le cas de la **maladie rare de Wilson**, caractérisée par **une incapacité des hépatocytes à excréter le Cu correctement**. Il en résulte une accumulation de Cu qui conduit à de nombreux dommages tissulaires. Les traitements administrés à ce jour sont des chélateurs de Cu, afin de promouvoir l'excrétion de ce métal ; cependant ils provoquent beaucoup d'effets secondaires.¹¹

Dans ce contexte, Delangle *et al.* proposent une stratégie innovante, consistant à piéger le Cu exclusivement dans les cellules hépatiques. Des **chélateurs du Cu(I) ont été conçus et vectorisés vers les hépatocytes par l'intermédiaire de la lectine ASGP-R**, qui représente une cible de choix pour l'internalisation des molécules actives dans ces cellules. Ces molécules sont des glycoconjugués : elles sont composées d'une unité de chélation du Cu(I) inspirée des protéines de l'homéostasie du Cu, fonctionnalisée par des unités glycosidiques reconnues par les ASGP-R. Elles ont montré leur **capacité à faire diminuer le taux de Cu intracellulaire**.^{12,13} Ce projet a été initié avec les travaux de thèse du Dr A. Pujol, qui ont permis le développement de **deux familles de composés**.¹⁴ Depuis, il fait l'objet de travaux incessants dans des domaines aussi diversifiés que la chimie inorganique, organique

ainsi que la biologie cellulaire et animale. Les propriétés de chélation des candidats médicament ont été abondamment étudiées et optimisées. Leur internalisation dans les cellules hépatiques a fait l'objet de ce travail de thèse, qui s'est concentré sur **l'interaction biomoléculaire entre les glycoconjugués et la lectine ASGP-R**. Les **mécanismes d'internalisation** ont été élucidés et **l'efficacité d'internalisation** des glycoconjugués quantifiée dans les hépatocytes humains. Cette analyse a également permis d'identifier les **paramètres de structure moléculaire** influençant l'efficacité d'internalisation afin de concevoir le meilleur candidat médicament possible.

Pour cela, j'ai pris part à un travail hautement collaboratif, dans le cadre du Labex ARCANE. Il m'a été permis de réaliser mon projet de thèse au sein de quatre laboratoires d'expertises différentes, et ainsi développer des compétences complémentaires :

- J'ai effectué la synthèse de composé de la famille T au **laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination (RICC) du Service de Chimie Inorganique et Biologique (SCIB) (INAC, CEA Grenoble)**, qui est par ailleurs le laboratoire porteur du projet.
- J'ai d'autre part accompli la synthèse des composés de la famille CP au sein de l'équipe d'**Ingénierie et Interactions Bio-Moléculaires (I2BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM) (UJF, Grenoble)**.
- J'ai réalisé la culture cellulaire et les expériences de cytométrie en flux au **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) de l'institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV) (CEA, Grenoble)**.
- Enfin, j'ai eu l'occasion de participer à une étude de l'interaction glycoconjugué-lectine par modélisation moléculaire, au **Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS, Grenoble)**.

Ce manuscrit débute par une présentation générale du projet, indispensable à la compréhension du contexte, des avancées et des enjeux de l'ensemble des travaux réalisés sur le sujet. Le chapitre I présente la maladie de Wilson et l'homéostasie du Cu, la conception et l'optimisation des chélateurs de Cu ainsi que la stratégie de vectorisation et l'élaboration des glycoconjugués. La littérature dans le domaine de la vectorisation vers le foie étant très abondante, les exemples les plus pertinents pour ce travail ont été sélectionnés. Le chapitre II décrit ensuite les objectifs de ce travail de thèse et la méthode mise au point pour les atteindre. Les synthèses et études d'internalisation des glycoconjugués dans les cellules hépatiques humaines sont développées dans les chapitres III et IV. Enfin, les meilleurs glycoconjugués de chaque famille sont comparés dans le chapitre V, afin d'identifier le système de vectorisation le plus efficace, avant de conclure sur les apports de cette étude.

Chapitre I-

Vectorisation de chélateurs du Cu(I) vers la lectine ASGP-R pour la détoxification du foie

La **vectorisation de molécules thérapeutiques** vers leur cible biologique d'intérêt répond au problème majeur auquel se heurte la conception de médicaments : celui des effets secondaires du fait de leur manque de spécificité. Les **lectines** sont des récepteurs biologiques attrayants pour la vectorisation parce qu'elles reconnaissent des ligands spécifiques avec une grande affinité et sélectivité. Ces protéines, présentes chez les végétaux et animaux, assurent des fonctions diverses en interagissant avec des sucres ou oligosaccharides. Pour la **vectorisation vers le foie** en particulier, le **récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R)** est une cible de choix parce qu'il est abondamment et majoritairement exprimée à la surface des hépatocytes.

Dans la cadre de la **maladie de Wilson**, une stratégie a été mise au point afin de vectoriser spécifiquement des **chélateurs de cuivre** vers les cellules hépatiques et ainsi détoxifier le foie des patients. Ces chélateurs ont été conçus sur le modèle des protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre. Fonctionnalisés par des unités saccharidiques adéquates, ils sont **reconnus et internalisés dans les hépatocytes** pour une action localisée et spécifique. Cette **stratégie innovante** développée par Delangle *et al.*, à la fois **bio-inspirée et bio-ciblée**, est présentée en détail dans ce chapitre. Ayant fait l'objet de nombreuses années de recherche dans des domaines variés mais complémentaires, les différents aspects de ce projet sont traités dans le but d'apporter une compréhension globale.

I - Le cuivre et la maladie de Wilson

I.1) La maladie de Wilson : définition et épidémiologie

La maladie de Wilson est une maladie orpheline, caractérisée par une **accumulation de cuivre (Cu) principalement dans le foie** et le système nerveux central. Les patients sont atteints de symptômes hépatiques, neurologiques ou psychiatriques, mais les manifestations cliniques sont nombreuses et difficiles à interpréter. Cette **maladie génétique autosomique récessive** résulte d'une mutation portée par un chromosome non sexuel, appelé autosome.^{11,15} Elle touche donc autant les hommes que les femmes, et la mutation des deux allèles du gène est requise pour contracter la maladie : un individu hétérozygote ne portant qu'une seule mutation n'est donc pas affecté par la maladie (figure 1).¹⁶

Découverte en 1912 par Kinnier Wilson,¹⁷ le lien n'a été fait entre cette pathologie et une **rupture de l'homéostasie du Cu** qu'à partir des années 1940.¹⁸ Absorbé dans l'alimentation, le Cu est acheminé vers le foie où il est alors distribué au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine ou éliminé vers les fèces en cas d'excès. Chez les sujets atteints de la maladie de Wilson, le foie est incapable d'évacuer le Cu. Ce métal libre toxique s'accumule

alors et occasionne de sévères dommages non seulement sur les tissus hépatiques mais aussi sur le système nerveux central. La mutation responsable de cette pathologie a été identifiée en 1993.^{15,19,20} Elle touche le **gène codant pour un transporteur de métaux, l'ATP7B**, porté par le chromosome 13. Au sein de cellules hépatiques, cette protéine est responsable de **l'excrétion du cuivre en cas d'excès** et de son **incorporation dans des protéines circulantes pour sa distribution** au reste de l'organisme.

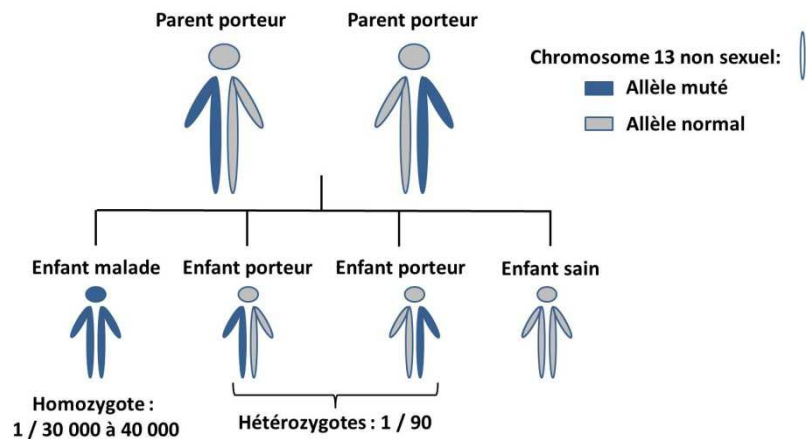


Figure 1 : Schéma de la transmission de la maladie de Wilson, maladie génétique autosomique récessive due à une mutation portée par le chromosome 13. Le terme autosomique signifie que la mutation affecte un chromosome non sexuel ; les individus des deux sexes ont donc la même probabilité d'être porteurs. Le terme récessif indique que la mutation doit toucher les deux allèles du gène pour développer la maladie.

La maladie de Wilson est rare, elle affecte 1 individu sur 30 000 à 40 000 dans le monde, et la fréquence des hétérozygotes, porteurs d'un allèle muté, est de 1/90 naissances.¹¹ En France, le nombre de nouveaux cas par an appelé incidence est estimé entre 1 / 30 000 à 1 / 100 000.²¹

1.2) Biologie du cuivre et physiopathologie

Le Cu est présent dans tous les organismes vivants et participe à leur fonctionnement. Son **homéostasie est finement régulée par des mécanismes impliquant diverses protéines** œuvrant à son transport, son stockage et son acheminement spécifique vers diverses cibles biologiques. Le Cu est néanmoins responsable des dommages cellulaires observés dans la maladie de Wilson. Comprendre les mécanismes mis en œuvre pour sa régulation est donc primordial afin de traiter efficacement la pathologie.²²⁻²⁴

1.2.a - Le cuivre et la vie

Le Cu est essentiel à la vie parce qu'il est impliqué en tant que cofacteur dans de nombreuses réactions enzymatiques. Par exemple il est utilisé dans chaque cellule de notre organisme par la cytochrome c oxydase (CcO) servant à la respiration ou encore la super oxyde dismutase (SOD1) intervenant dans la lutte contre le stress oxydant.²²

Le Cu est un métal de transition de configuration électronique [Ar] 3d¹⁰ 4s¹ et de numéro atomique 29. **Dans le corps, il oscille entre deux états d'oxydation** : l'ion cuivrique Cu(II), et l'ion cuivreux Cu(I). Ces différents états d'oxydation lui confèrent des propriétés oxydo-réductrices, permettant son activité catalytique.

Le Cu libre est toxique pour l'organisme parce qu'il catalyse des réactions de type Fenton formant les espèces réactives de l'oxygène comme HO[•].²² Ces espèces réactives conduisent à la destruction des tissus par stress oxydant. De plus, il induit l'apoptose des cellules en inactivant la protéine anti-apoptotique XIAP (« *X-linked inhibitor of apoptosis* »).²⁵

Dans l'organisme, le Cu n'est donc pas sous forme libre mais il est incorporé à des macromolécules (figure 2). Il est transporté dans la circulation sous forme de complexes avec des protéines telles que l'albumine, la céruloplasmine, et des acides aminés comme l'histidine. Dans les cellules, il est transporté par des métallochaperonnes et piégé notamment par les métallothionéines. Les acides aminés impliqués dans la coordination du cuivre sont :

- les acides aminés soufrés, la cystéine (Cys) et la méthionine (Met),
- les acides aminés portant des fonctions amines, l'histidine (His) et la lysine (Lys),
- les acides aminés portant des fonctions carboxylates, avec le glutamate (Glu) et l'aspartate (Asp).

Enfin les atomes d'oxygène et d'azote des extrémités terminales et des liaisons amides sont également impliqués dans sa coordination. Nous reviendrons sur les sites de coordination et caractéristiques de chélation du cuivre de ces protéines ultérieurement.

Le cuivre dans l'organisme :

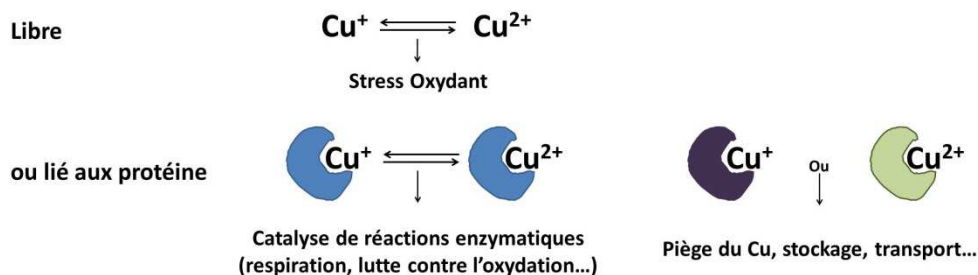


Figure 2 : Les différents états du Cu dans l'organisme.

Les dérèglements de l'homéostasie du cuivre provoquent diverses pathologies. **Une surcharge en Cu tout comme une carence a des effets néfastes pour l'organisme.** L'accumulation de cuivre, observée dans la maladie de Wilson, entraîne de graves lésions hépatiques et neurologiques, tandis que l'impossibilité d'assimiler le cuivre, caractérisant la maladie de Menkes, empêche le développement normal de l'organisme et conduit à de très faibles espérances de vie de l'ordre de quelques années seulement. De plus, le Cu est suspecté d'être impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, comme les maladies à Prion, maladies d'Alzheimer ou encore de Parkinson.²⁶

I.2.b - Métabolisme du cuivre

Un organisme humain adulte contient environ 72 mg de cuivre et en absorbe 0,8 mg/j.^{24,26,27} L'organe crucial responsable de l'homéostasie du cuivre est le foie : il distribue ce métal dans l'organisme et l'élimine en cas d'excès.²²

Le cuivre est absorbé dans l'intestin grêle par les entérocytes sous l'action de l'ATP7A, une ATP-ase transportant le Cu grâce à l'énergie libérée par la rupture d'une liaison phosphate de l'ATP.²⁸ Puis il est incorporé à des protéines, en particulier l'albumine, pour ensuite être acheminé vers le foie *via* la circulation portale (figure 3).

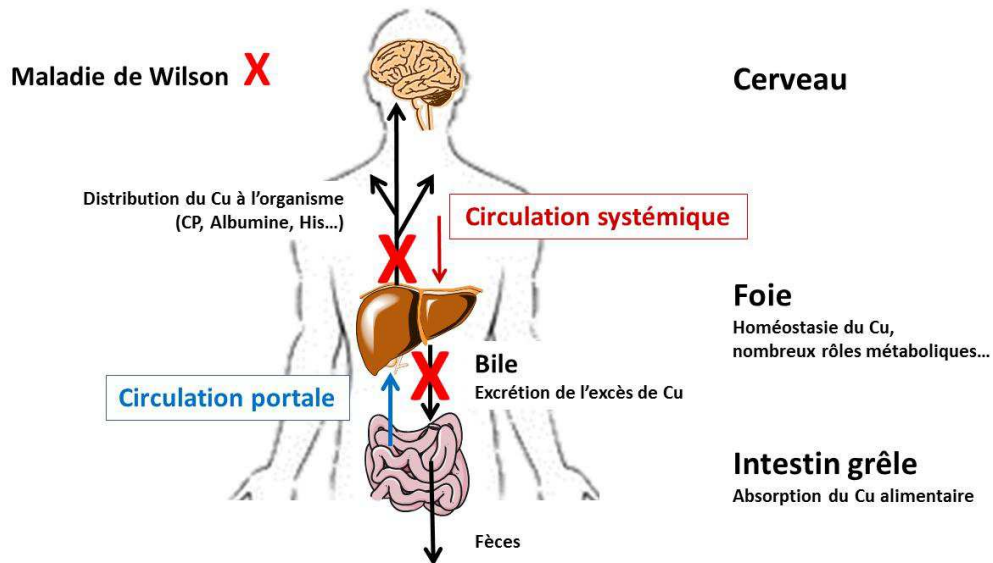


Figure 3 : Schéma de la distribution du Cu dans l'organisme ; CP : Céruloplasmine, His : Histidine.

Le foie possède de nombreux rôles : métabolisme, filtration du sang, production d'énergie et de sucres... C'est le seul organe à être irrigué à la fois par la circulation portale et la circulation systémique. Il est composé majoritairement de cellules hépatiques parenchymateuses, dites hépatocytes, correspondant à environ 80% du volume du foie, et d'autres types cellulaires minoritaires comme les cellules de Kupffer. Ces cellules sont organisées en lobules hépatiques (figure 4).

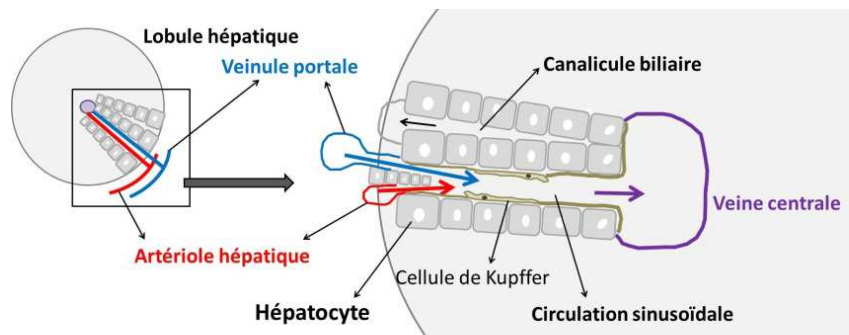


Figure 4 : Organisation d'un lobule hépatique vu du dessus à gauche, et zoom sur trois lames hépatiques à droite. Un lobule est composé d'une multitude d'hépatocytes organisés en lames hépatiques, de manière radiale par rapport à la veine centrale (centre du lobule, en violet). Ces lames sont irriguées par les artérioles hépatiques (sang oxygéné en provenance du cœur, en rouge) et les veinules portales (en provenance de l'intestin, en bleu), puis le sang repart par la veine centrale. Les déchets sont évacués au sein des canalicules biliaires, formés entre les hépatocytes. Les hépatocytes sont des cellules polarisées : une de leurs faces est en contact avec le sang pour l'absorption et la libération de molécules dans la circulation ; l'autre est en contact avec les canalicules biliaires pour l'élimination.

Les hépatocytes sont des cellules polarisées possédant des mécanismes d'absorption par face sinusoidale, en contact avec la circulation, et des mécanismes d'excrétion par les canalicules biliaires (figure 4 et figure 5).

Dans le foie, le Cu est internalisé au sein des hépatocytes par le **transporteur spécifique « copper transporteur 1 » (CTR-1)** situé à la membrane sinusoidale en contact avec le sang.

Puis il est pris en charge par des protéines cytosoliques : les métallochaperonnes. Il en existe plusieurs avec des rôles bien définis, comme la protéine CCS1 délivrant le cuivre à l'enzyme SOD1 mentionnée précédemment ou la métallochaperonne **Atox1** chargée d'apporter le Cu spécifiquement à la protéine ATP7B (figure 5).

L'**ATP7B** est une pompe à Cu(I) également appelée protéine de Wilson car son dérèglement est à l'origine de la maladie de Wilson. Elle transporte le cuivre du cytoplasme vers l'intérieur du Golgi où il est alors incorporé à des protéines de sécrétion, en particulier la céruloplasmine.

Enfin, la **céruloplasmine** transporte le cuivre dans la circulation sanguine. Elle est majoritairement produite et excrétée par le foie. Le complexe Cu-céruloplasmine, dit holocéruloplasmine, est libéré dans la circulation sanguine pour la distribution du cuivre au reste de l'organisme (figure 5).^{22,23}

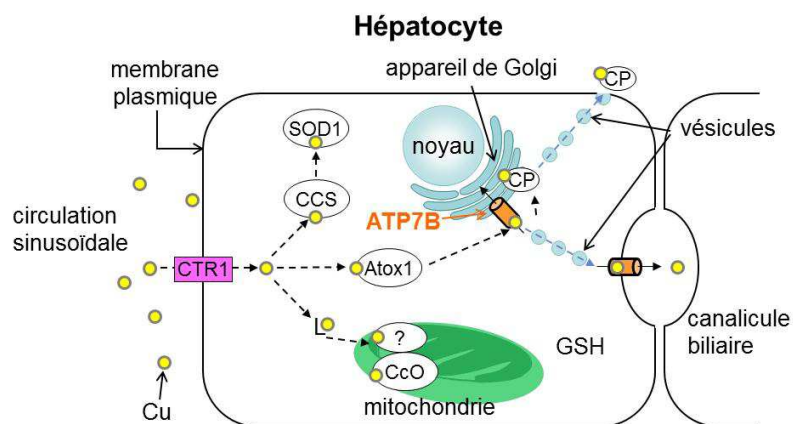


Figure 5 : Schéma reproduit à partir de Delangle *et al.*, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 6359²² représentant les mécanismes de prise en charge Cu dans les hépatocytes.

En cas d'**excès de cuivre**, plusieurs mécanismes se mettent en place, impliquant un changement de localisation des protéines décrites précédemment. Dans un premier temps, si la concentration extracellulaire en Cu excède le micromolaire, l'entrée de cuivre est limitée par la suppression de CTR1 à la membrane plasmique. Cette protéine est internalisée dans des vésicules de manière réversible.^{23,24}

Lors d'une surcharge en cuivre intracellulaire, l'ATP7B se délocalise suite à son hyperphosphorylation. Cette protéine est intégrée à des vésicules chargées en Cu qui se déplacent à la membrane basale autour des canalicules. Après fusion des vésicules avec la membrane, l'ATP7B procède à l'excrétion du cuivre vers la bile, qui est ensuite éliminé de l'organisme *via* les fèces (figure 5).

L'excès de cuivre dans le cytoplasme est piégé par des **métallothionéines**. Ces protéines comportent jusqu'à 20 Cys grâce auxquelles elles forment des clusters de Cu(I),

plus stables que ceux formés avec le Zn(II) également présent dans le cytoplasme. En cas d'excès de Cu, le Zn est donc remplacé par du Cu ; jusqu'à 12 Cu non échangeable peuvent être ainsi piégés au sein des métallothionéines. Le Zn ainsi libéré induit la synthèse de nouvelles métallothionéines.²⁴

I.2.c - Physiopathologie de la maladie de Wilson

Chez les patients atteints de la maladie de Wilson, une mutation conduit au **dysfonctionnement de l'ATP7B**. Comme nous l'avons vu, cette protéine est chargée de l'élimination du cuivre vers le pôle biliaire de l'hépatocyte ainsi que de la distribution du cuivre dans l'organisme *via* son incorporation dans la céruloplasmine. **Les cellules hépatiques ne sont alors plus capables d'évacuer le cuivre, qui s'accumule dans le cytoplasme** sous forme libre ou lié aux métallothionéines. Comme l'ATP7B est également impliquée dans la synthèse de la céruloplasmine, une diminution de la concentration en céruloplasmine sérique est observée.¹¹

La surcharge en Cu affecte également d'autres zones de l'organisme, en particulier les tissus cérébraux, provoquant une myriade d'effets cliniques.

I.3) Diagnostic et symptômes

Le diagnostic de la maladie de Wilson est basé sur une combinaison de signes cliniques phénotypiques, et d'anomalies biochimiques, histologiques et génétiques.^{29,30} Il est difficile à établir du fait de l'hétérogénéité des signes cliniques et du manque de spécificité des paramètres biologiques qui se révèlent parfois contradictoires.³¹ La maladie peut rester silencieuse de nombreuses années, mais se manifeste le plus fréquemment entre 5 et 35 ans, par des symptômes hépatiques chez l'enfant et neurologiques à partir de l'adolescence.^{11,32}

Les symptômes de la maladie de Wilson font l'objet de revues fréquemment mises à jour.^{29,31,33-35} Il est à noter qu'un sujet présentant un ou plusieurs symptômes décrits ci-après n'est pas nécessairement porteur de la maladie de Wilson.

I.3.a - Manifestations cliniques

Les symptômes majeurs de la maladie de Wilson sont à 42% hépatiques, 34% neurologiques, 10% psychiatriques et 12% hématologiques. Dans quelques cas, des troubles rénaux et des manifestations osseuses et cardiaques sont à déplorer.^{11,21,36}

Chez les enfants la pathologie se manifeste le plus souvent sous **forme hépatique**. Les signes les plus habituels sont une hépatite chronique, qui peut évoluer vers une cirrhose. Les symptômes hépatiques peuvent s'accompagner ou non de symptômes neurologiques.

La **forme neurologique** de la maladie de Wilson s'observe généralement à la fin de l'adolescence, voire vers 30 ans. Elle regroupe un ensemble de symptômes polymorphes de type Parkinsonien associant à des degrés variables rigidité, tremblements, et troubles

moteur. Des symptômes neurologiques sont toujours accompagnés de troubles hépatiques souvent silencieux, puisque le cuivre s'accumule d'abord dans le foie.³⁴

Les **formes psychiatriques** peuvent se déclarer avant les affectations neurologiques et hépatiques chez un tiers des patients, ce qui rend le diagnostic compliqué. Des changements comportementaux, une baisse des performances intellectuelles et des troubles psychotiques apparaissent, en particulier la dépression, la schizophrénie et la paranoïa.

Le symptôme le plus caractéristique de la maladie de Wilson et aussi le plus bénin est l'apparition de l'anneau cornéen ou **anneau de Kayser-Fleisher**.³⁴ Un anneau de coloration gris-vert ou dorée, dû à une accumulation de Cu, est observé en périphérie de la cornée, autour de l'iris (figure 6). Cet anneau est constamment présent dans les formes neurologiques et psychiatriques, mais pas toujours dans les formes hépatiques. Il n'affecte pas la vision.

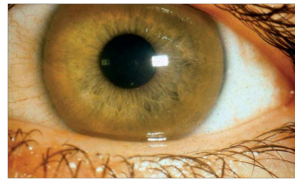


Figure 6 : Anneau de Kayser-Fleisher reproduit d'après la publication d'Ala *et al.* Lancet 2007, 369, 397.³⁴

I.3.b - Paramètres biologiques

Divers paramètres biologiques permettent de préciser le diagnostic établi grâce aux manifestations cliniques ou bien de dépister des patients de manière pré-symptomatique.

Le **dosage de la céruloplasmine sanguine** est une technique largement utilisée. Chez 90% des sujets atteints de la maladie de Wilson, son taux est fortement abaissé.²⁹

Le **bilan cuivrique** est très informatif également. Il repose sur le dosage du cuivre sanguin, du cuivre urinaire et une biopsie du foie. Dans le sérum, 92% du Cu est fixé à la céruloplasmine. Bien que la maladie de Wilson soit caractérisée par une surcharge en cuivre, une diminution de la proportion de cuivre sérique est observée chez les patients du fait de la diminution de céruloplasmine dans la circulation. Le Cu urinaire est à l'inverse toujours élevé, en particulier après l'administration de chélateurs de Cu comme la D-pénicillamine visant à induire l'excrétion de Cu. Enfin, une biopsie hépatique est pratiquée afin de discriminer la maladie de Wilson face à d'autres maladies du foie.³⁶ Aux stades avancés de la maladie, ces prélèvements permettent également de déceler des **anomalies histologiques hépatiques**, comme des lésions ou des cirrhoses. Cependant, à part une présence de Cu diffus dans le cytoplasme, révélé à la rhodamine, aucune caractéristique histologique spécifique n'a été identifiée.

I.3.c - Diagnostic génétique

Le diagnostic génétique consiste à détecter la ou les mutations du gène codant pour l'ATP7B. L'analyse est compliquée par la multiplicité et la diversité des mutations : plus de

500 mutations ont été recensées à ce jour sur la base de donnée « *Human Genome Organisation* » et ce nombre ne cesse d'augmenter.³⁷ Comme nous l'avons vu, la mutation des deux allèles du gène est requise pour développer la maladie. Or, la plupart des malades sont des hétérozygotes composites : ils portent une mutation différente du gène sur chaque chromosome 13. L'identification des deux mutations n'est par conséquent pas une chose aisée ; elle n'aboutit que dans 60 à 70% des cas. En outre, aucune corrélation évidente n'a été établie entre génotype et phénotype.

I.3.d - Mise en place du diagnostic

Le manque de spécificité des symptômes conduit bien souvent à de mauvais diagnostics ou à un dépistage trop tardif, entraînant des aggravations et des dommages irréversibles chez les patients. Pour remédier à cela, le tableau de score suivant est utilisé par les médecins dans le but de faciliter le diagnostic (tableau.1). Celui-ci met en relation les symptômes avec un score de pertinence pour la maladie de Wilson.³⁸ Pour un ensemble de symptômes, un score supérieur à 4 correspond à la maladie de Wilson.

Tableau 1 : Scores diagnostic établi par la communauté médicale pour faciliter le diagnostic de la maladie de Wilson, établi lors du 8^{ème} congrès international sur la maladie de Wilson, Leipzig 2001.³⁸ Reproduit d'après l'*EASRL Clinical Practice Guideline*, J. Hepatol. 2012, 56, 671.²⁹

Symptômes cliniques typiques		Autres tests	
Anneau de Kayser-Fleisher		Cuivre du foie sec (en absence de cholestase)	
Présent	2	> 4 µmol/g	2
Absent	0	0,8-4 µmol/g	1
Symptômes neurologiques		Normal (< 0,8 µmol/g)	-1
Sévères	2	Granules positives à la rhodamine*	1
Moyens	1		
Absents	0		
Céruroplasmine sérique		Cuivre urinaire (en absence d'hépatite aigüe)	
Normale (> 0,2 g/L)	0	Normal (environ 50 µg/24h)	0
0,1-0,2 g/L	1	1-2 × la valeur maximum limite normale (MLN)	1
< 0,1 g/L	2	> 2 × MLN	2
Anémie hémolytiques**		Normal, mais > 5 × MLN après D-pénicillamine	2
Présente	1	Analyse des mutations	
Absente	0	Déecté sur les 2 chromosomes	4
		Déecté sur 1 chromosome	1
		Pas de mutation déectée	0
Score total		Evaluation :	
4 ou plus		Diagnostic établi	
3		Diagnostic possible, tests supplémentaires nécessaires	
2 ou moins		Diagnostic vraiment peu probable	

* Si aucune quantification du Cu n'est possible, permet de révéler qualitativement une présence anormale de Cu dans le cytoplasme. **Anémie hémolytique : baisse du nombre de globules rouges, leucocytes et plaquettes.

Un dépistage systématique s'effectue au sein des familles dont au moins un membre est affecté par la maladie. Ainsi, les individus porteurs de la pathologie sont identifiés afin d'être traités le plus tôt possible, de manière à ralentir les dommages sur les organes.

I.4) Traitements existants

Dans la majorité des cas, une maladie de Wilson non traitée entraîne la mort suite à de sévères lésions du foie et des tissus cérébraux. La première disposition prise est un régime alimentaire adapté pour restreindre les apports de cuivre.¹¹ Ainsi, il est recommandé d'éviter la consommation de crustacés, fruits secs, abats, chocolat noir, noix ou encore champignons. Mais ce régime n'est pas suffisant. Les traitements prescrits aux patients visent à restreindre l'accumulation de Cu dans le corps, afin de rétablir un équilibre sans provoquer de carence. Ils jouent sur deux tableaux : **la limitation de l'absorption de Cu et l'excrétion de l'excédent**. Il n'existe pas de traitement curatif, les médicaments doivent donc être pris à vie. Il est essentiel de pratiquer une observance scrupuleuse ; une rupture des traitements entraîne des aggravations hépatiques et neurologiques brutales et irréversibles. Il est à noter que ces traitements n'ont pas fait l'objet de tests contrôlés aléatoires, et qu'ils présentent pour certains de nombreux effets indésirables.³⁹ Un suivi rigoureux des patients est donc nécessaire pour une constante réadaptation des traitements et posologies.^{11,34} L'instauration d'une vie thérapeutique de manière pré-symptomatique peut permettre de limiter grandement l'évolution de la maladie.³¹ Cependant, l'espérance de vie des patients reste très variable.⁴⁰

I.4.a - Chélateurs de cuivre

Des chélateurs du cuivre sont administrés pour induire l'élimination du cuivre par les urines. Une amélioration nette des manifestations hépatiques et neurologiques peut être observée dès les premiers mois de traitement (figure 7).

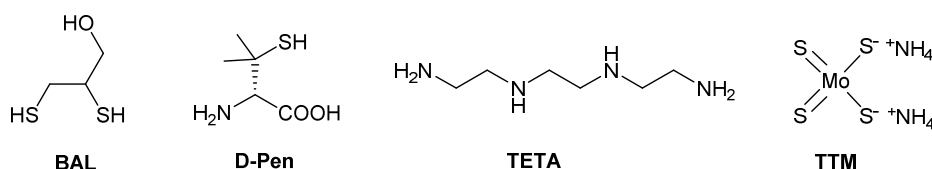


Figure 7 : Les différents chélateurs de cuivre administrés contre la maladie de Wilson : BAL pour « *British Anti Lewisite* », D-Pen pour D-pénicillamine, TETA pour Triéthylène Tétramine et TTM pour Tétrathiomolybdate.

Le premier traitement à voir le jour en 1951 est le chélateur Dimercaprol ou communément appelé BAL (« *British Anti Lewisite* ») ; il est administré par voie intramusculaire.¹⁸ Celui-ci est abandonné ensuite au profit d'autres chélateurs du Cu plus spécifiques, administrés par voie orale, avec des effets secondaires réduits.

La **D-pénicillamine** (D-Pen) ou **Trolovol®** est le traitement de référence, le plus utilisé à travers le monde (figure 7). Il a supplanté le Dimercaprol en 1956, montrant sa capacité à piéger efficacement le Cu *in vitro*.¹⁸ Il entraîne une diminution de Cu sérique en formant des complexes non toxiques éliminés par voie rénale. Ce chélateur est suspecté de détoxifier le foie en séquestrant du Cu intra-hépatique ou en induisant la synthèse de métallothionéines.³¹ Sa biodisponibilité est de 40 à 70% et les doses administrées sont de 1 à 2 g par jour chez l'adulte. C'est le médicament le plus efficace pour les formes hépatiques

mais, dans 10 à 50% des cas, il occasionne une aggravation initiale des symptômes neurologiques.³¹ De nombreux effets secondaires ont été recensés dont :

- à court terme : des troubles digestif, des allergies dans 20 à 30% des cas.
- à moyen terme : des affections auto-immunes, une toxicité rénale manifestée par une protéinurie (présence de protéine dans les urines).
- à long terme : des lésions cutanées et lésions des muqueuses.

Le **triéthylène tétramine dihydrochlorure** (TETA) ou **Trientine**[®] est introduit en 1982 en tant qu'alternative à la D-pénicillamine (figure 7). Ce chélateur de cuivre augmente l'excrétion urinaire du Cu et diminue son absorption intestinale. Cependant, il est moins efficace et biodisponible que la D-pénicillamine. Les doses prescrites sont de 1 à 2 g par jour chez l'adulte. Les effets secondaires sont similaires à ceux de la D-pénicillamine mais moins fréquents et moins documentés. En outre, il chélate aussi le Fer (Fe) et le Zn, provoquant des anémies, et sa co-administration avec le Fe est prohibée car le complexe formé est toxique. Ce médicament est utilisé aux Etats-Unis mais difficilement accessible dans de nombreuses régions du monde comme l'Europe. En France, il n'est pas autorisé sauf temporairement en cas d'échec de la D-pénicillamine.³¹ Cependant, la Trientine tetrahydrochlorure a obtenu en mars 2015 une « *orphan drug designation* » (ODD) par la commission européenne « *European Medicines Agency* » (EMA). Une possible autorisation de mise sur le marché en Europe est donc à envisager pour les années à venir.

Le **tétrathiomolybdate d'ammonium** (TTM) ou **Coprexa**[™] n'est pas encore commercialement disponible ni approuvé par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) (figure 7). Il forme avec le cuivre un complexe non toxique ni absorbable. Cependant de nombreux effets secondaires sont suspectés. Les sels de tétrathiomolybdate d'ammonium sont notamment sensibles à l'hydrolyse en condition acide et peuvent former du sulfure d'hydrogène (H₂S) dans l'estomac, qui est toxique.¹¹ Récemment, en janvier 2013, la commission européenne a accordé une ODD à la **bis-choline tétrathiomolybdate** ou **Decuprate**[™]. Des études cliniques sont en cours.

I.4.b - Les sels de zinc

L'administration d'**acétate de zinc** ou **Wilzin**[®] a été approuvé par la FDA en 1997. Le Zn limite l'absorption du Cu en induisant la production des métallothionéines. Dans les cellules épithéliales intestinales, le Cu est alors séquestré et excrété dans les fèces. Dans les cellules hépatiques, les dommages oxydants et le passage du Cu dans le sang sont réduits.⁴¹

Les doses administrées sont de 150 mg/j chez l'adulte. Le traitement est mieux toléré que les chélateurs, les effets secondaires sont moindres et consistent en des maux de tête et douleurs abdominales. Aucune détérioration neurologiques n'est observée, ce qui en fait un traitement de choix en phase initiale de la thérapie, ou sur les formes résistantes aux chélateurs ou en cas d'intolérance.⁴¹ Cependant, il n'est pas assez efficace pour être administré seul, mais plutôt utilisé en prévention ou en complément d'un autre traitement.⁴²

I.4.c - Transplantations hépatiques

La transplantation hépatique est réservée aux formes fulminantes hépatiques ou aux formes hépatiques s'aggravant malgré les médicaments.³¹ Cependant, c'est une opération lourde, avec un risque de rejet élevé, et elle est limitée par le nombre de donneurs. Le taux de survie post-transplantation à 5 ans est de 80%. Après l'opération, aucun traitement n'est plus nécessaire et aucune récurrence de maladie de Wilson n'est à déplorer chez ces patients. La transplantation peut être utilisée pour les formes neurologiques sévères ne répondant à aucun traitement. Dans ce dernier cas, une amélioration de l'état du patient est possible mais le taux de survie est moins élevé que pour les formes hépatiques.¹¹

I.4.d - Perspectives

Bien qu'aucun nouveau traitement n'ait vu le jour depuis de nombreuses années, la recherche continue.

Une alternative à l'administration de chélateurs est la **transfection de gène**, dans le but de **rétablir la synthèse d'ATP7B fonctionnelle dans les hépatocytes**. Ce sujet a fait l'objet de nombreuses publications ces quinze dernières années et possède l'avantage d'être une thérapie curative. La transfection du gène *Atp7b* humain sur le modèle murin « *Long Evans Cinnamon rat* »⁴³ a montré un effet thérapeutique.⁴⁴⁻⁴⁶ Cependant la transfection sur animal adulte fait preuve d'un succès limité.

Roybal *et al.* ont récemment proposé une technique de transfection prénatale qui conduit à un rétablissement permanent et au moins partiel du métabolisme de l'ATP7B.⁴⁷ Cette transfection par vecteur viral induit une expression sélective et stable dans le temps de l'ATP7B dans les cellules hépatiques. Chez les souris transfectées, le développement du foie est normal, l'incorporation du Cu à la céruloplasmine est restaurée et aucune anomalie histologique n'est observée. Cependant de améliorations sont encore nécessaires avant que cette thérapie génique prénatale ne voit le jour. En effet, l'ATP7B exprimée n'est que partiellement fonctionnelle : elle n'est pas capable de migrer de l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire. De plus, l'administration du gène consiste en une injection intracardiaque sur le fœtus. Cette méthodologie n'est pas applicable cliniquement parce qu'elle est très difficile à réaliser pour le praticien et comporte de hauts risques pour le fœtus. Enfin, le diagnostic prénatal n'est disponible chez l'homme qu'à partir de 12 semaines de grossesse, et pour être efficace l'injection doit survenir entre la 8^{ème} et la 9^{ème} semaine.

Comme pour toutes thérapies géniques, des progrès médicaux doivent donc encore être réalisés.

Pour aller à l'essentiel

La maladie de Wilson est une maladie orpheline caractérisée par une accumulation de Cu affectant principalement le foie, organe responsable de l'homéostasie du Cu. Elle est due à une mutation génétique conduisant à la perte de fonction de la protéine ATP7B. Cette protéine exprimée dans les hépatocytes est un élément clé de l'élimination du Cu hors de l'organisme. Il en résulte une surcharge des hépatocytes en Cu, induisant de graves dommages tissulaires. Cette pathologie est difficile à dépister, mais des avancées sont faites chaque jour dans la découverte de nouveaux éléments diagnostiques.

Des thérapies existent, néanmoins elles entraînent beaucoup d'effets secondaires du fait de leur manque de sélectivité et ne sont souvent pas tolérées par les patients. Aucun médicament novateur n'a été mis sur le marché ces dernières années. C'est dans ce contexte que Delangle et al. proposent une thérapie ciblée vers le foie.

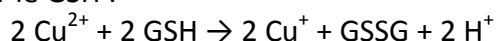
II - Conception de nouveaux chélateurs du Cuivre intracellulaire

La stratégie proposée pour détoxifier le foie de la surcharge en Cu occasionnée par la maladie de Wilson consiste à développer des agents thérapeutiques spécifiques envers le cuivre intracellulaire des hépatocytes. Un chélateur entrant spécifiquement dans les cellules hépatiques pour y piéger le Cu présent dans le cytoplasme permettrait en effet d'éviter les effets secondaires observés sur les traitements existants. Ainsi, plusieurs chélateurs de Cu ont été obtenus en s'inspirant de protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu. Dans cette section il est question des travaux réalisés par Delangle *et al.* sur la conception de chélateurs du Cu intracellulaire bio-inspirés.^{22,24}

II.1) La stratégie de chélation du cuivre intracellulaire

Comme mentionné précédemment, le cuivre est présent dans l'organisme sous deux états d'oxydation : +I et +II. Dans l'alimentation il est sous forme Cu(II). Dans la circulation, il peut être sous forme Cu(II) et Cu(I). Dans le milieu intracellulaire, la présence de glutathion (GSH) à des concentrations de l'ordre du millimolaire rend le milieu réducteur. Dans l'éventualité où il y ait présence de Cu disponible, c'est-à-dire non fortement lié à des protéines, celui-ci se trouve donc à l'état d'oxydation +I.^{23,24}

Réduction du Cu(II) par le GSH :



La maladie de Wilson conduit à une accumulation toxique de Cu dans le cytoplasme des hépatocytes. Une **solution thérapeutique attractive** consiste donc à **piéger sélectivement et efficacement le Cu(I) disponible à l'intérieur des cellules hépatiques**.

Chélater le Cu(I) intracellulaire

La **différence de réactivité chimique entre Cu(I) et Cu(II)** est exploitée. Cette différence est expliquée et décrite par la théorie « *Hard and Soft Acids and Bases* » (HSAB) développée par Pearson dans les années 1960 et résumée dans le tableau ci-après (tableau 2).⁴⁸ Cette théorie décrit les principes qui gouvernent la stabilité des complexes métal-ligand. Un métal peut appartenir à plusieurs catégories : acide mou, acide intermédiaire ou acide dur. Un acide mou est un ion de grande taille, peu électropositif et facile à réduire, tandis qu'un acide dur est à l'inverse de petite taille, fortement électropositif et difficile à réduire. Les acides durs forment des complexes stables avec des bases dures, c'est-à-dire des ligands fortement électronégatifs et peu polarisables. Les acides mous forment à l'inverse des complexes stables avec des ligands mous.

Selon cette théorie, le **Cu(I) est classé comme un acide mou** et le Cu(II) un acide intermédiaire. Leurs propriétés de coordination sont donc différentes. Le Cu(I) forme des complexes stables avec 2 à 4 bases molles telles que les sulfures. Le Cu(II) quant à lui établit des complexes avec 4 à 6 bases allant des sulfures aux bases intermédiaires voire dures.

En modulant le nombre et la nature des fonctions portées par le ligand, il est donc possible de coordonner préférentiellement l'un ou l'autre de ces cations métalliques.

Tableau 2 : Classement des acides et des bases selon la théorie de Pearson.

Théorie de Pearson ou théorie « HSAB »		
	Acides	Bases
Mous	Grande taille, peu électropositifs, faciles à réduire : $\text{Pd}^{2+}, \text{Pt}^{2+}, \text{Cu}^+, \text{Ag}^+, \text{Hg}^+, \text{Hg}^{2+}$	Faiblement électronégatives, très polarisables, faciles à oxyder : $\text{R}_2\text{S}, \text{RSH}, \text{RS}^-, \text{I}^-, \text{CO}, \text{CN}^-, \text{H}^-, \text{SCN}^-, \text{R}_3\text{P}, \text{C}_6\text{H}_6, \text{R}^-, \text{RNC}, \text{C}_2\text{H}_4, (\text{RO})_3\text{P}, \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
Intermédiaires	$\text{Fe}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Pb}^{2+}$	$\text{N}_2, \text{NO}_2^-, \text{Br}^-, \text{N}_3^-, \text{C}_5\text{H}_5\text{N}, \text{SO}_3^{2-}, \text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$
Durs	Petite taille, fortement électropositifs, difficiles à réduire : $\text{H}^+, \text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Sn}^{2+}, \text{Be}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{La}^{3+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{3+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Al}^{3+}, \text{Sn}^{4+}, \text{Ti}^{4+}$	Fortement électronégatives, peu polarisables, difficiles à oxyder : $\text{H}_2\text{O}, \text{OH}^-, \text{F}^-, \text{NH}_3, \text{ROH}, \text{Cl}^-, \text{RO}^-, \text{RNH}_2, \text{R}_2\text{O}, \text{NO}_3^-, \text{N}_2\text{H}_4, \text{PO}_4^{3-}, \text{CO}_3^{2-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{ClO}_4^-$

Pour concevoir des **ligands spécifiques du Cu(I) et de haute affinité**, Delangle *et al.* se sont **inspirés des protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu.**²² Les sites de coordination correspondant font intervenir des fonctions thiols et thioéthers, portées respectivement par des Cys et des Met. Ces protéines montrent une bonne affinité et sélectivité pour le Cu(I) par rapport à d'autres métaux tels que le Zn(II), abondant dans le milieu intracellulaire.

L'affinité pour le Cu(I) de peptides portant les trois acides aminés Met, Cys et His a été étudiée par Franz *et al.*⁴⁹ Il en découle que la **Cys coordine le Cu(I) plus efficacement que l'His et la Met.** De plus, les complexes formés impliquant des Met et Cys sont sélectifs pour le Cu(I) par rapport au Cu(II) et au Zn(II).⁵⁰ Ainsi, ils stabilisent le Cu dans son état d'oxydation +I, et ils ne bouleversent pas l'homéostasie du Zn(II). A l'inverse, des peptides comportant des His complexent le Cu(I) comme le Cu(II) et le Zn(II). Ils sont donc moins sélectifs pour le Cu(I) et catalysent la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Il est à noter que des chélateurs à base d'acides aminés ont l'avantage d'être solubles dans l'eau, ce qui est indispensable pour des applications *in vivo*.

Pro-chélateurs activés dans le cytoplasme

La Cys est sensible à l'oxydation, et les **fonctions thiols sont aisément oxydées en ponts disulfures.** Ainsi il est possible d'élaborer des **pro-drogues** : dans le milieu extracellulaire oxydant, les fonctions thiols sont masquées sous forme de ponts disulfures. Puis, après internalisation dans les cellules, les ponts disulfures sont rompus grâce au milieu réducteur libérant un chélateur de Cu(I).

Vectorisation vers le foie

Une fois les pro-chélateurs à base de Cys conçus, il est nécessaire de localiser leur action dans les cellules hépatiques afin d'**éviter les effets secondaires.** Pour cela, une **unité de ciblage des hépatocytes** est greffée sur les pro-chélateurs. Ainsi, ils sont internalisés sélectivement par un récepteur dans ce type cellulaire pour y délivrer des chélateurs sélectifs du Cu(I) et détoxiquer le cytoplasme (figure 8).

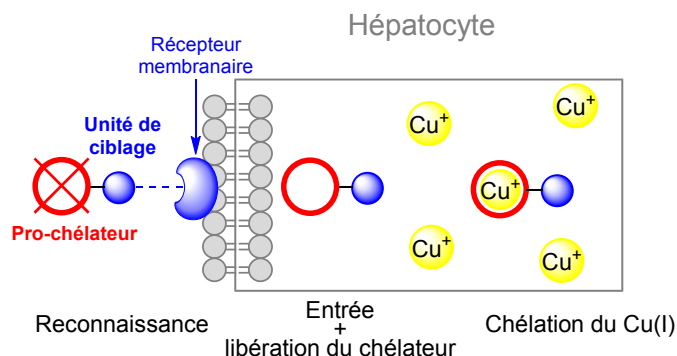


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la stratégie de chélation du Cu(I) intra-hépatocytaire reproduit à partir de Delangle *et al.*, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 6359²². Le pro-chélateur à base de Cys oxydées en ponts disulfures est vectorisé vers les hépatocytes grâce à une unité de ciblage. Suite à son internalisation par un récepteur, les fonctions thiols sont libérées dans le milieu réducteur du cytoplasme et piègent de Cu^+ de manière efficace et sélective.

La conception et les caractéristiques de chélation *in vitro* du Cu(I) par deux familles de chélateurs développées par Delangle *et al.* sont détaillées dans les sections suivantes.

II.2) Chélateurs du cuivre inspirés de métallochaperonnes : la famille CP

II.2.a - Les métallochaperonnes

La première famille de chélateurs développée est la **famille CP**. Elle est inspirée des **métallochaperonnes à Cu**, à ne pas confondre avec les chaperonnes moléculaires qui facilitent le repliement des protéines. Comme évoqué précédemment, les métallochaperonnes sont des protéines qui transportent le Cu(I) au sein des cellules.⁵¹ Elles transfèrent spécifiquement ce métal aux sites de coordination des enzymes, évitant ainsi les effets toxiques du cuivre libre. La plupart d'entre elles ont été découvertes chez les levures et sont hautement conservées entre les levures et les humains. C'est notamment le cas pour la protéine humaine **Atox1**, aussi appelée HAH1, et son homologue Atx1 chez la levure (figure 9).⁵²⁻⁵⁵

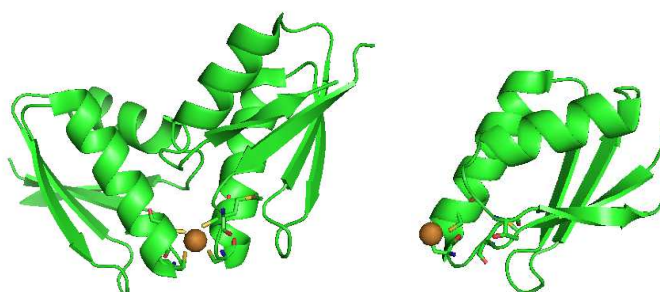


Figure 9 : Structure cristallographique PDB 1FEE d'après Wernimont *et al.*⁵⁵ : HAH1 cristallisé aux rayons X avec une résolution de 1,80 Å ; en présence de Cu^+ (boule marron) ; les acides aminés mis en avant autour du Cu correspondent aux motifs MxCxxC. A gauche : complexe $\text{Cu}(\text{Atox1})_2$, coordination $\text{CuS}_3/\text{CuS}_4$; à droite : complexe $\text{Cu}(\text{Atox1})$, coordination CuS_2 .

Les métallochaperonnes à Cu possèdent sur leur extrémité *N*-terminale des séquences très accessibles et riches en Cys, impliquées dans la fixation de métaux. La **séquence Met-X-Cys-XX-Cys**, où X est un acide aminé quelconque, est **conservée chez toutes les métallochaperonnes et lie le Cu(I)**, le Hg(II) et le Cd(II) grâce aux **fonctions thiols des deux Cys**. Cette séquence est très sélective du Cu(I) par rapport au Cu(II), et elle est capable de réduire le Cu(II) en Cu(I) de manière analogue au GSH.⁵³

La structure du complexe **Cu-Atox1** a été résolue par diffraction des rayons X (figure 9). Elle montre une coordination linéaire de type CuS₂ mais aussi la formation de dimères d'un Cu(I) lié par les Cys de deux protéines Atox1 en géométrie de coordination tétraédrique distordue (CuS₄) ou trigonale (CuS₃). Ceci suggère que le mécanisme d'échange du Cu(I) entre deux protéines de site de coordination Met-X-Cys-XX-Cys passe par une coordination trigonale du Cu par trois fonctions thiols des Cys (figure 10). Dans la forme libre d'Atox1 en milieu oxydant, dite forme apo, les deux cystéines sont impliquées dans un pont disulfure mais ceci n'a pas de réalité biologique, sauf en condition de stress oxydant.^{53,55,56} L'affinité pour le Cu(I) et le Hg(II) est très forte, avec une constante de dissociation K_d de l'ordre de 10⁻¹⁷ pour le Cu(I) à pH physiologique. Les complexes Cu(I)-protéine formés sont donc très stables. Ceci évite l'oxydation et l'échange avec le glutathion abondamment présent dans le cytoplasme.^{53,57}

La **protéine ATP7B** lie le Cu(I) par l'intermédiaire de fonctions thiols de la même séquence Met-X-Cys-XX-Cys, qui est répétée dans six domaines de liaison des métaux. L'échange de Cu entre l'ATP7B et l'Atox1 s'effectue par la formation d'une espèce intermédiaire dans laquelle le Cu est tri-coordiné (figure 10).^{53,55}

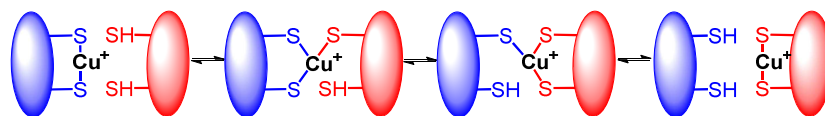


Figure 10 : Mécanisme d'échange du Cu entre la métallochaperonne Atox1 (à gauche) et la protéine ATP7B (à droite), reproduit sur le modèle de Wernimont *et al.*, *Nature Struct. Biol.*, 2000, 7, 766.⁵⁵

Ce motif est également présent sur de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de métaux toxiques, comme MerP transportant le mercure.⁵⁸

II.2.b - Les chélateurs de la famille CP

Un **peptide mimant la boucle de liaison d'Atox1** a été développé par Delangle *et al.* La première version de ce mime, le peptide P^L, porte le motif de liaison Met-Thr-Cys-Ser-Gly-Cys-Ser où les deux Cys correspondent aux fonctions chélatrices (figure 11).^{59,60} Ce peptide de 10 acides aminés est capable de coordonner les métaux d¹⁰ sous forme de complexes monométalliques de stœchiométrie 1:1 (métal:ligand) pour le Hg(II) et le Cu(I) et 1:2 pour le Zn(II), le Cd(II) et le Pb(II). L'échelle d'affinité est la suivante : Hg(II) > Cu(I) >> Cd(II) > Pb(II) > Zn(II).

L'analogue cyclique de P^L a été envisagé de manière à renforcer sa pré-organisation et ainsi obtenir un bon modèle structural d'Atox1 : le peptide P^C (figure 11). Le motif X-Pro-Gly-X contraint le peptide grâce à un coude β de type II, ce qui rigidifie la boucle par ailleurs flexible et rapproche les deux Cys pour une meilleure complexation. La structure de ce

peptide cyclique a été étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) en présence de Hg(II), dont les propriétés de coordination sont très proches de celles du Cu(I) (figure 11).⁵⁹

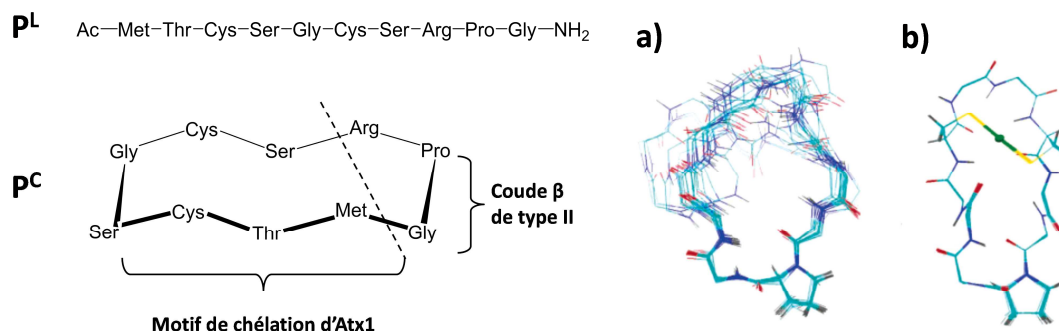


Figure 11 : Peptides modèles P^L et P^C inspirés de la métallochaperonne Atx1 proposés par Delangle *et al.*^{59,60} ; (a-b) Superposition des 20 structures de plus faible énergie obtenues par RMN en solution pour (a) P^C et (b) P^C-Hg.

Les deux intérêts de la cyclisation sont :

- un accroissement de la stabilité des complexes formés avec les métaux en limitant la contribution entropique défavorable,
- et une augmentation de la stabilité du peptide en milieu biologique grâce à une meilleure résistance face aux dégradations enzymatiques comparée aux peptides linéaires.

Le peptide P^C est capable de piéger le Cu(I) avec une constante de dissociation K_d de 10^{-16,6} à pH 7, similaire à celle d'Atox1, qui est de 10^{-17,4} à pH physiologique. Il possède également une forte affinité pour le Hg(II), avec un K_d inférieur à 10^{-18,6}, et une bonne sélectivité vis-à-vis d'autres métaux comme le Zn(II), le Cd(II), ou le Pb(II).⁶⁰ Ces propriétés font donc de P^C un bon candidat pour la chélation du Cu intra-hépatocytaire.

Des modifications ont été apportées à P^C dans le but d'**augmenter sa rigidité** et de pouvoir le **fonctionnaliser avec une unité de ciblage** (figure 12). Celui-ci a été contraint par l'introduction un second coude β, de manière à obtenir une structure plus rigide et possédant **deux faces indépendantes régio-fonctionnalisables**. De plus, les positions des deux Cys ont été modifiées en conséquence.¹³ Ainsi, la face inférieure du cyclodécapeptide P¹ est composée des chaînes latérales des deux Cys pour la chélation du cuivre. Les chaînes latérales des quatre acides aminés composant sa face supérieure peuvent être fonctionnalisées par des unités de ciblage pour la vectorisation vers les hépatocytes.

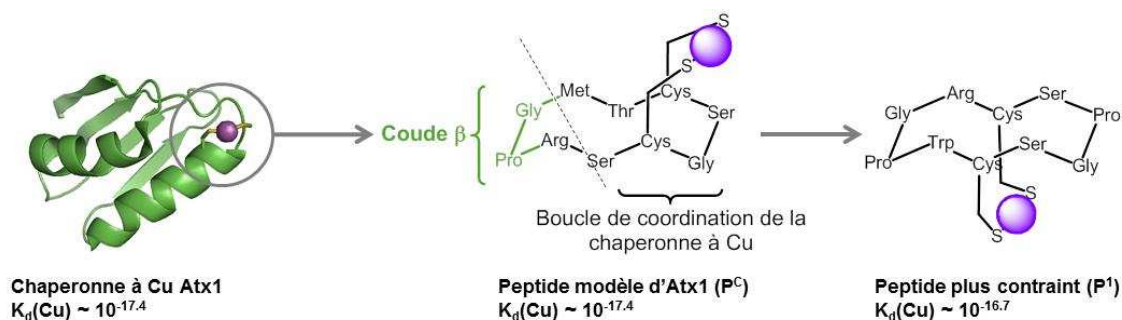


Figure 12 : Cyclodécapeptides P^C et P¹ mimant la boucle de liaison du Cu(I) par la métallochaperonne Atx1. Figure reproduite d'après *Ligand design in medicinal inorganic chemistry*, Wiley, 2014.

A l'image des métallochaperonnes, P¹ forme un complexe Cu(I)-P¹ de type CuS₂ avec le Cu(I), qui a été mis en évidence par spectroscopie UV visible, dichroïsme circulaire et spectrométrie de masse.¹³

L'affinité de P¹ pour différents cations métalliques a été mesurée, afin de s'assurer que la nouvelle unité chélatrice conserve les propriétés de chélation de P^C *in vitro* (tableau 3). Pour le complexe Cu(I)-P¹, un logβ₁₁ de 16,7 à pH 7,4 est obtenu ; il correspond à la constante thermodynamique d'affinité apparente pour la formation du complexe de stœchiométrie 1:1. Cette valeur est proche de celle du complexe Cu-P^C qui est de 17,4, et de celle de la protéine Atx1 elle-même.^{57,61}

La stœchiométrie et la stabilité des complexes ont également été mesurées avec le Hg(II), le Zn(II), le Pb(II) et le Cd(II). Contrairement aux autres cations métalliques, la formation de complexes de stœchiométrie 1:2 est observée pour le Pb(II) et le Cd(II).

L'échelle d'affinité observée pour P^C est conservée, ainsi que la **sélectivité de 10 ordres de grandeur par rapport au Zn(II)**, ce qui garantit une chélation spécifique du Cu(I) à l'intérieur des cellules.

Tableau 3 : Constantes d'affinité apparentes de P¹ et P² pour plusieurs cations métalliques à pH 7 et 298 K, dans 20 mM de tampon Bis-Tris et à pH 7,4 dans 20 mM de tampon phosphate ; β_{pq} = [M_pP_q]/[M]^p[P]^q avec M le métal, P le ligand P¹, P² ou P^C, p la stœchiométrie du métal et q celle du ligand.

M	logβ _{pq}	P ¹	P ²	P ^C
Pb(II)	Logβ ₁₁	7,4(2)	7,1(1)	8,0(1)
	Logβ ₁₂	11,9(5)		12,5(7)
Cd(II)	Logβ ₁₁		7,0(1)	9,2(1)
	Logβ ₁₂	15,0(2)		15,6(1)
Zn(II)	Logβ ₁₁	6,6(1)	5,9(1)	6,8(2)
Hg(II)	Logβ ₁₁	> 19,7 ^a	> 18,5 ^a	> 18,6
Cu(I)	Logβ ₁₁	16,7(1) ^a	15,5(1) ^a	1,6(1)

Echelle d'affinité : Hg(II) > Cu(I) >> Cd(II) ≈ Pb(II) > Zn(II)

Enfin, le cyclodécapeptide P² a également été étudié ; il ne diffère de P¹ que par la présence d'acides aminés chargés négativement sur sa face supérieure (figure 13). Les constantes d'affinité apparentes montrent que cette charge déstabilise légèrement les complexes métalliques (tableau 3).

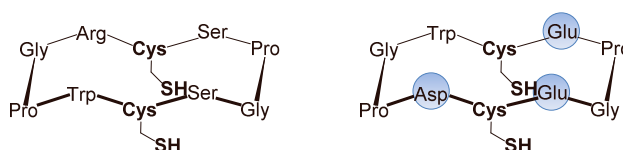


Figure 13 : Structure chimique des deux cyclodécapeptides P¹ et P².

En conclusion, P¹ est un mime des métallochaperonnes piégeant efficacement et sélectivement le Cu(I) dans un environnement de coordination CuS₂. Par ailleurs, les Cys de ce cyclodécapeptide sont oxydées sous forme de pont-disulfure en milieu oxydant. De cette façon, P¹ devient un pro-chélateur : ses fonctions chélatrices sont masquées et ne sont libérées qu'après l'entrée dans les cellules hépatiques.

L'introduction d'une unité de ciblage sur le cyclodécapeptide est la dernière étape pour l'obtention d'un **pro-chélateur** de Cu(I) spécifique des cellules hépatiques. La famille de composés ainsi obtenue est notée CP, pour « cyclodécapeptide » (figure 14).

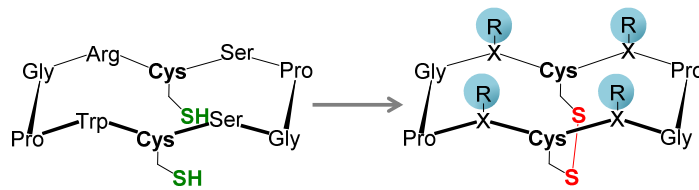


Figure 14 : Stratégie pour changer le cyclodécapeptide P¹ en pro-chélateur ciblant les hépatocytes ; les fonctions thiol chélatrices sont inactivées par leur oxydation en pont disulfure et des unités de ciblage des hépatocytes R sont introduites sur l'autre face du cyclodécapeptide.

II.3) Chélateurs du cuivre inspirés des métallothionéines : la famille T.

II.3.a - Les métallothionéines

Une seconde famille de chélateur a été développée par Delangle *et al.* : la **famille T**. Elle est inspirée des **métallothionéines**. Tout comme les métallochaperonnes, ces protéines sont riches en Cys. Elles ont la capacité de piéger de nombreux métaux libres en excès ou toxiques. Ainsi, une forte expression des métallothionéines a été constatée dans le cytosol des hépatocytes chez des individus présentant des surcharges en Cu comme dans le cas de la maladie de Wilson.⁶²

Ce sont des protéines ubiquitaires de faible poids moléculaire. Leurs séquences sont composées de 60 à 68 résidus, comportant des Cys dont 20 sont hautement conservées, mais aucun acide aminé aromatique ni His. Des ions métalliques aussi variés que le Zn(II), le Cd(II), le Hg(II), le Cu(I), l'Ag(I) et l'Au(I) sont **coordinés exclusivement par les fonctions thiols de Cys** au sein de **motifs Cys-X-Cys ou Cys-XX-Cys**, où X est un acide aminé quelconque sauf une Cys. Chez les mammifères, les sites de coordination sont répartis en deux domaines : le domaine α à l'extrémité C-terminale contenant 11 Cys, et le domaine β à l'extrémité N-terminale contenant 9 Cys. Les chaînes protéiques s'organisent autour des ions métalliques de manière à former des clusters (figure 15).⁶³⁻⁶⁶

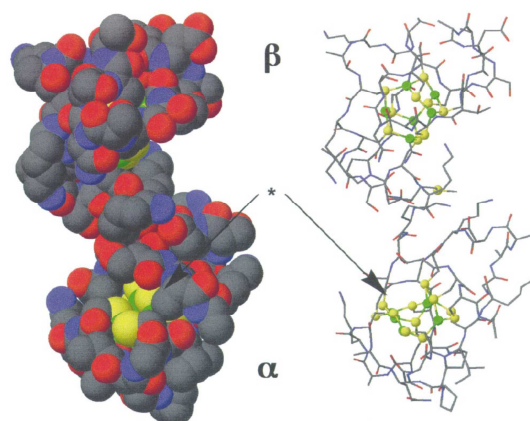


Figure 15 : Représentation de la métallothionéine hépatique de lapin Cu_{12} -MT calculée par modélisation moléculaire ; atomes de soufre en jaune et Cu en vert ; deux clusters différents avec un Cu_6S_9 au domaine β et Cu_6S_{11} au domaine α . D'après Presta *et al.*, *J.Chem.Soc, Dalton Trans.*, 1997, 977.

L'affinité pour les différents métaux et l'organisation des clusters diffèrent suivant les domaines (tableau 4). Le domaine β présente une meilleure affinité pour le Cu(I) et l'Ag(I), et le domaine α pour le Zn(II) et le Cd(II). La structure tri-dimensionnelle des clusters dépend de la nature, du nombre et des préférences de coordination du ou des métaux liés. Des cations métalliques tels que le Cu(I) et l'Ag(I) adoptent des géométries de coordination trigonales et digonales, tandis que le Zn(II) ou Cd(II) sont impliqués dans des complexes tétraédriques.⁶³⁻⁶⁶

Tableau 4 : Exemples de clusters de métaux de transitions (M) formés avec les Cys aux seins des deux domaines de coordination des métallothionéines, d'après Chan *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 233-234, 319.⁶³

Exemples de cluster	Domaine β	Domaine α
Cu(I), Ag(I)	$\text{M(I)}_6\text{S}_9$	$\text{M(I)}_6\text{S}_{11}$
Zn(II), Cd(II)	$\text{M(II)}_3\text{S}_9$	$\text{M(II)}_4\text{S}_{11}$

Seul le Cu(I) est coordonné par les métallothionéines, et la géométrie précise des clusters formés n'a pas encore été clairement identifiée. Chez les mammifères, des clusters de type $\text{Cu}_4\text{S}_{6-9}$, $\text{Cu}_6\text{S}_{9-11}$, $\text{Cu}_{3/4}\text{Zn}_x\text{S}_y$ ont été observés.⁶⁶

Ainsi, les métallothionéines peuvent piéger jusqu'à 12 cations Cu(I) répartis en deux clusters, sur les domaines α et β , au sein desquels tous les Cu(I) sont tri-coordinés (figure 15).⁶⁵

L'affinité des métallothionéines pour les différents métaux suit l'ordre général : $\text{Hg(II)} > \text{Ag(I)} \approx \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$.⁶⁴ L'affinité pour le Cu(I) est très élevée, avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-19} . Les complexes formés sont donc plus stables que ceux présentés précédemment avec les métallochaperonnes. Ceci est cohérent avec le rôle des métallothionéines, qui n'est pas de transférer le Cu à une protéine cible comme le font les métallochaperonnes mais de le séquestrer.^{64,66}

La **géométrie de coordination CuS_3** semble donc être **plus efficace pour coordiner le Cu(I) avec affinité et sélectivité.**

II.3.b - Les chélateurs de la famille T

Dans le but d'imiter l'environnement de coordination de métaux en milieu biologique, l'utilisation d'acides aminés branchés sur des plateformes synthétiques est une stratégie concluante. Gelinsky *et al.* font partie des premiers à avoir développé des chélateurs du Zn(II) utilisant des acides aminés naturels tels que l'His et la Cys.⁶⁷

Des ligands de symétrie C_3 portant 3 Cys ont été développés par Delangle *et al.* : les chélateurs de la **famille T** comme « tripode ». Ils reproduisent la **géométrie de complexation du Cu(I) très stable CuS_3** présente dans les métallothionéines. Les pseudopeptides composés de 3 Cys branchées par lien peptidique sur l'acide nitrilo-triacétique (NTA) ont ainsi donné les résultats les plus prometteurs.^{68,69} La plateforme NTA a été choisie pour induire une orientation convergente des fonctions thiols (figure 16).⁷⁰ L'influence de la fonction carbonyle près des groupes thiols a été analysée au moyen de trois chélateurs: les ligands L^1 , L^2 et L^3 (figure 16). Leurs propriétés de coordination ont été étudiées comme précédemment par des techniques analytiques et spectroscopiques.

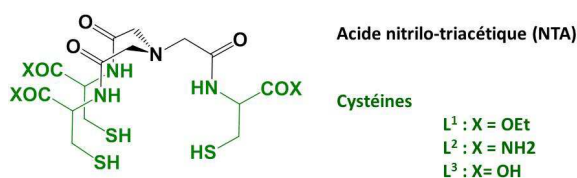


Figure 16 : Mimes tripodaux des métallothionéines à trois Cys sur plateforme NTA. Ils comportent une symétrie C_3 , les trois thiols des Cys convergent pour piéger le Cu(I) dans un environnement trigonal.

Les tripodes L^1 et L^2 , portant respectivement des fonctions ester et amide, possèdent des propriétés très similaires. Tous deux piègent très efficacement le Cu(I) et le Hg(II), et les complexes formés avec un équivalent de Cu(I) sont de géométrie CuS_3 .^{68,69} Les trois sulfures des Cys s'enroulent autour du Cu en géométrie trigonale de symétrie C_3 . Ils adoptent une conformation rigide, stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène entre les liaisons amides (figure 17).

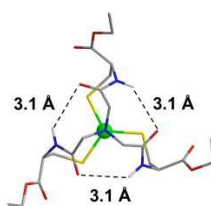


Figure 17 : Structure du complexe Cu- L^1 montrant l'organisation des thiols en géométrie trigonale autour du Cu(I) la stabilisation du complexe par un réseau de liaison H ; C : gris, H : blanc, O : rouge, N : bleu, S : jaune, Cu : vert. Reproduit d'après Pujol, *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 4418.⁶⁹

La formation de clusters par co-oligomérisation a été mise en évidence en excès de Cu(I). La **stœchiométrie de ces clusters est $(Cu_2L)_3$** , semblable aux clusters Cu_6S_9 observé au domaine de coordination β des métallothionéines présenté précédemment (figure 18) .

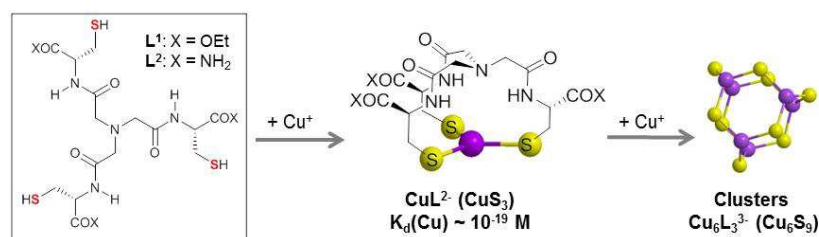


Figure 18 : Formation d'une espèce mononucléaire CuS₃ pour un équivalent de Cu(I) puis apparition de cluster de type Cu₆S₉ lors de l'ajout d'un excès de Cu(I). Reproduit d'après Pujol, *J. Am.Chem. Soc.* 2009, 131, 6928.

Le chélateur L³ portant des Cys-OH se comporte différemment : en présence de Cu(I), il forme des espèces polynucléaires. Ceci est attribué à la déstabilisation des espèces mononucléaires par la présence des carboxylates chargés négativement à pH physiologique, déjà observée pour le chélateur à 2 Cys P².

Les constantes de stabilité apparente logβ₁₁ sont de 19,2 pour L¹ et 18,8 pour L², et sont significativement plus élevées que celles obtenues pour la famille CP qui avoisinent 17, à pH 7,4 (tableau 5).

Les propriétés de chélation de L¹ et L² avec d'autres métaux divalents ont été étudiées. Ces métaux forment avec L¹ et L² des complexes mononucléaires, mais la présence d'espèces polymétalliques Cu₂L₂ a été également caractérisée. Ces complexes bi-moléculaires conviennent à la préférence des cations divalents pour des géométries tétraédriques. L'ordre de préférence établi pour les ligands riches en Cys est maintenu : Hg(II) > Cu(I) >> Cd(II) > Pb(II) ≈ Zn(II). **La sélectivité pour le Cu(I) par rapport au Zn est de 8 à 9 ordres de grandeur.**

Tableau 5 : Constantes d'affinité apparente des complexes formés entre L¹, L² et P¹ avec différents cations métalliques à pH 7,4, 298 K. β₁₁ = [MP]/[M][P] avec M le métal, P le ligand L¹, L² ou P¹.^{68,69}

logβ ₁₁	Cu(I)	Zn(II)	Hg(II)	Cd(II)	Pb(II)
L ¹	19,2	10,3	> 22,7	11,8	10,1
L ²	18,8	11,0	> 22,6	12,1	10,5
P ^C	17,4	7,6	> 19,4	10,0	8,8
P ¹	16,7	6,6	> 19,7	8,0	9,2

L'étude de la complexation du Cu(I) avec L¹ et L² par spectroscopie d'absorption aux rayons X (XAS) confirme la formation d'espèces mononucléaires en faible concentration de Cu et la formation d'une unique espèce polymétallique en excès de Cu.⁷¹ Dans ces deux types de coordination, le Cu adopte exclusivement une géométrie CuS₃ trigonale planaire et symétrique (figure 19). Par ailleurs, les constantes d'équilibre de formation calculées par cette méthode confirment celles obtenues précédemment par spectroscopie UV visible et témoignent de la fiabilité des résultats.

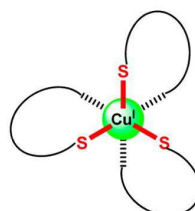


Figure 19 : Géométrie CuS₃ trigonale planaire et symétrique de coordination du Cu(I) par L¹ et L² pour les espèces mononucléaires. Reproduit d'après Jullien *et al. Inorg. Chem.*, 2013, 52, 9954.

En résumé, les complexes formés entre le Cu(I) et les tripodes L¹ et L² ont des constantes de dissociation similaires aux métallothionéines. L'environnement CuS₃ du Cu en géométrie trigonale puis la formation de cluster Cu₆S₉ analogues à ceux présents dans les métallothionéines ont été observés.⁶³ L¹ et L² sont donc de bons mimes de métallothionéines. Ils piègent le Cu(I) plus efficacement que les chélateurs à deux Cys de la famille CP, avec des affinités supérieures de 1,5 ordres de grandeur par rapport à P^C. Leur sélectivité par rapport au Zn est légèrement moins forte mais toujours très bonne, de 8 à 9 ordres de grandeur. L¹ et L² possèdent donc des propriétés de coordination adaptées à la chélation du Cu(I) intracellulaire.

Pour des applications cellulaires, il est préférable d'utiliser L² possédant les fonctions amides. En effet, les fonctions ester de L¹ hydrolysables en milieu biologique donnent des acides carboxyliques tels que ceux présents sur L³. Or, les propriétés de coordination de L³ pour le Cu(I) sont beaucoup moins intéressantes que celles de ses analogues.

Il est à noter que l'influence du remplacement des Cys par des His sur le mode de coordination et l'affinité envers le Cu(I) est en cours. Les résultats montrent une diminution de l'affinité pour le Cu(I) avec l'augmentation du nombre d'His.

Enfin, des **unités D-pénicillamines** ont été introduites sur les noyaux NTA à la place des Cys, donnant les chélateurs L⁴ et L⁵ (figure 20).⁷²

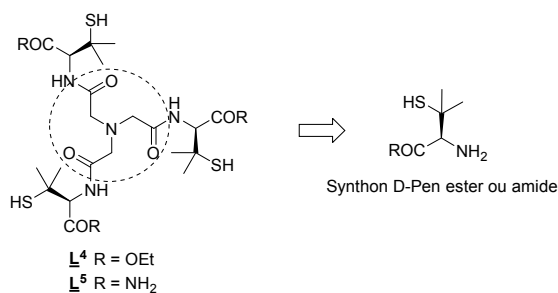


Figure 20 : Chélateurs L⁴ et L⁵ obtenus en introduisant des synthons D-pénicillamine ester ou amide sur une plateforme NTA par lien peptidique. Reproduit d'après Jullien *et al.*, *Inorg. Chem*, 2014, (53), 5229.⁷²

La D-pénicillamine est le chélateur de Cu le plus utilisé actuellement pour traiter la maladie de Wilson. Celle-ci diffère de la Cys par la présence d'un groupement *gem*-diméthyle en α de la fonction thiol. Bien que les complexes formés avec le Cu(I) soit de même nature que pour L¹ et L², l'encombrement stérique apporté par ces groupements méthyles diminue leur stabilité. Les $\log\beta_{11}$ restent tout de même élevés, ils sont respectivement de 17,3 et 16,2 pour L⁴ et L⁵ à pH 7,4 et 298 K. Par ailleurs, contrairement à L¹ et L², les deux chélateurs L⁴ et L⁵ forment uniquement des complexes mononucléaires avec le Zn(II). En effet, ils sont incapables d'accommoder l'environnement tétraédrique du Zn(II) du fait de l'encombrement stérique des D-pénicillamines. Il en résulte une sélectivité accrue pour le Cu(I).

De tous ces chélateurs, les composés L² et L⁵ semblent les plus adaptées à une **chélation efficace et sélective du Cu(I) intracellulaire**. Tout comme les chélateurs de la famille CP, ils peuvent être changés en **pro-drogues** par oxydation de leurs fonctions thiols. En outre, l'introduction d'**unités de ciblage** des hépatocytes permet à la fois l'inactivation réversible des thiols et la vectorisation du pro-chélateur (figure 21).

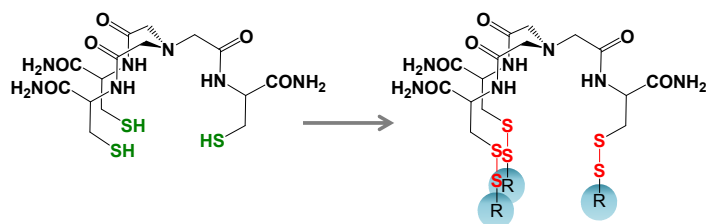


Figure 21 : Pro-chélateur L² oxydé pour le piège du Cu intracellulaire ; les fonctions thiol sont inactivées sous forme de pont-disulfure, qui permettent par la même occasion d'introduire des unités de ciblage des hépatocytes R.

Pour aller à l'essentiel

Des chélateurs soufrés piégeant le Cu(I) avec une forte affinité et une très bonne sélectivité par rapport au Zn ont été développés. Ils sont donc d'excellents candidats à la coordination du Cu en excès dans les hépatocytes des patients atteints de la maladie de Wilson. Inspirés des protéines coordonnant le Cu(I) dans l'organisme, ils piègent ce cation métallique grâce à deux ou trois fonctions thiol de Cys dans des géométries digonales ou trigonales. L'affinité pour le Cu(I) de ces différentes protéines et ligands synthétiques qui en sont inspirés est résumée sur l'échelle ci-après (figure 22).

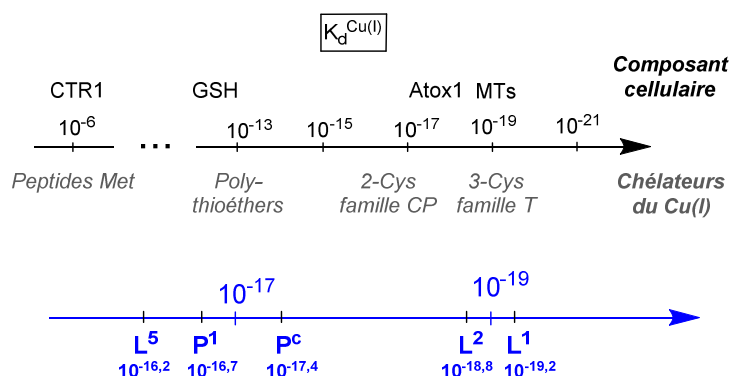


Figure 22 : Echelle d'affinité des différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu et les chélateurs synthétiques qui en sont inspirés.

Ces chélateurs peuvent être transformés en pro-drogue par l'oxydation de leurs thiols en pont disulfures. Ainsi, les fonctions chélatrices ne sont libérées qu'après l'entrée dans les cellules hépatiques, garantissant une sélectivité pour le Cu(I) intracellulaire.

III - Le récepteur aux asialoglycoprotéines est une cible de choix pour la vectorisation de médicaments vers le foie

Le foie est l'organe majoritairement impliqué dans l'accumulation de Cu lors de la maladie de Wilson. La conception de chélateurs de Cu intra-hépatocytaire semble donc être une bonne alternative aux chélateurs systémiques actuellement utilisés.

Voyons comment délivrer les chélateurs de Cu(I) dans le cytoplasme des hépatocytes pour piéger le Cu en excès et promouvoir son élimination.

III.1) La vectorisation de médicaments vers le foie : choix de la stratégie

III.1.a - Pourquoi vectoriser les chélateurs ?

La majorité des médicaments, dont ceux contre les maladies hépatiques, se heurtent communément aux problèmes suivants :

- l'insuffisance de leur accumulation dans les cellules concernées par la pathologie,
- la toxicité due à la non spécificité vis-à-vis d'autres organes,
- la faible perméabilité membranaire des cellules, qui forme une barrière limitant leur efficacité.

Ces problèmes peuvent être surmontés par la vectorisation des médicaments vers des cellules spécifiques.² Elle consiste en la modulation et le contrôle de la distribution du principe actif dans l'organisme en y associant un **vecteur**. La vectorisation présente deux intérêts majeurs : **éviter les effets secondaires** en réduisant l'accès aux tissus non ciblés, et **augmenter l'efficacité** en localisant l'action. Ceci contribue donc à l'augmentation de l'**index thérapeutique** des médicaments, qui correspond à la dose létale pour 50% de mortalité (DL₅₀) rapporté à la dose efficace pour produire 50% de l'effet désiré chez les individus (DE₅₀).¹

La vectorisation vers le foie est facilitée par le rôle prépondérant de cet organe dans diverses voies métaboliques et d'excrétions. Il assure notamment la synthèse et la sécrétion de protéines, et le métabolisme de macromolécules. Hautement irrigué, il filtre le sang et trie ce qui est absorbé dans l'alimentation. De plus, cet organe possède un fort taux d'assimilation de composés, dont les molécules thérapeutiques, du fait de la forte perméabilité des capillaires sinusoides irrigant les lobes hépatiques.

Tous les types cellulaires hépatiques peuvent être ciblés en choisissant le système de vectorisation adéquat. **Les hépatocytes sont touchés par la maladie de Wilson, c'est donc les cellules qui sont ciblées dans ce travail.**² Un ciblage efficace de ces cellules est critique puisque le foie contient également 80% de la population totale des macrophages de l'organisme qui sont susceptibles de dégrader l'agent thérapeutique.¹

La membrane plasmique d'une cellule est dynamique et a pour fonction de délimiter le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Elle régule les échanges entre ces deux milieux de plusieurs façons. Le passage de la membrane plasmique pour la vectorisation de médicaments à l'intérieur de ces cellules peut se faire de deux manières : passive ou active.^{1,2,73}

III.1.b - Vectorisation passive ou active ?

La **vectorisation passive** vers le foie est actuellement utilisée pour traiter des maladies comme des carcinomes hépatocellulaires ou des hépatites C chroniques.^{1,74-76} Par exemple, la vectorisation de médicaments vers les carcinomes hépatocellulaires grâce à l'effet « *enhanced permeability and retention* » (EPR) est une technique qui a fait ses preuves, comme en témoigne le médicament Smancs® approuvé au Japon depuis 1994.^{74,77} Elle utilise les caractéristiques de perméabilité des vaisseaux et rétention de macromolécules et particules lipidiques aux abords des cellules cancéreuses (figure 23). Cette technique ne peut néanmoins être utilisée que pour le traitement de tumeurs.

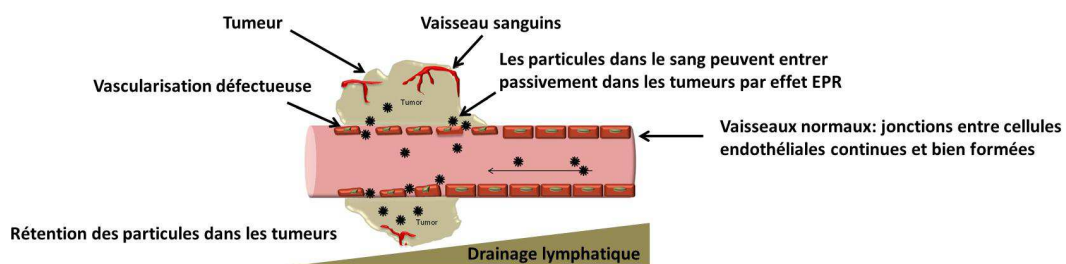


Figure 23 : Effet EPR (Enhanced permeability and retention) et ciblage passif des tumeurs. Les nanoparticules et macromolécules peuvent diffuser dans les tumeurs à travers les interstices entre les cellules endothéliales composant les parois du vaisseau. De plus, en grossissant, les tumeurs compriment les vaisseaux lymphatiques, ce qui conduit à un faible drainage lymphatique et une accumulation des particules. Reproduit d'après Jhaveri *et al.*, *Front. in Pharmacol.*, 2014, 5, 1.⁷⁸

D'autres types de vectorisation sont utilisés en thérapie contre les hépatites B et C sous le nom de Pegasys® et Pegintron®.^{75,76,79} Ces thérapies tirent profit du long temps de circulation conféré par les chaînes polyéthylène-glycol (PEG), mais ne sont cependant pas spécifique d'un type cellulaire.

La **vectorisation active** est beaucoup plus attrayante parce qu'elle permet de cibler un site spécifique : un organe, un type cellulaire voire même un compartiment intracellulaire. Elle nécessite un ligand reconnu spécifiquement par une cible biologique, le plus souvent un récepteur cellulaire ou un épitope, ainsi qu'un poids moléculaire et une lipophilie adaptée à la cible choisie. Les ligands, ou vecteurs, sont associés de manière covalente ou non à la molécule thérapeutique. Ils peuvent être des anticorps, des peptides, des oligosaccharides, des protéines virales ou encore des résidus fusogéniques comme des liposomes, qui ont la capacité de fusionner avec la membrane plasmique et la traverser.¹

Les **récepteurs exprimés à la membrane** plasmique des cellules sont une cible biologique pertinente parce qu'ils sont différemment exprimés suivant le type cellulaire ou le tissu. De plus, ils possèdent une forte spécificité de reconnaissance pour des ligands

particuliers. Enfin, ils conduisent à une internalisation par endocytose efficace et rapide. Tous ces arguments les rendent particulièrement adaptés à la vectorisation de médicaments.^{73,80-82}

De nombreux récepteurs membranaires ont été découverts à la surface des hépatocytes.⁷³ Voyons en quoi consiste le mécanisme d'endocytose et quel récepteur est le plus adapté pour la vectorisation vers les cellules hépatiques.

III.1.c - L'internalisation par endocytose

Les petites molécules peuvent passer la membrane des cellules par diffusion passive, ou à travers des pompes protéiques et canaux. La plupart des macromolécules quant à elles sont internalisées dans les cellules par la formation de **vésicules provenant d'invagination de la membrane et pincement** : c'est le processus d'**endocytose**.⁸⁰

Il requière l'adsorption des macromolécules à la membrane des cellules, accomplie dans la majorité des cas par des récepteurs qui augmentent la concentration locale de la macromolécule d'intérêt. Puis la membrane s'invagine, formant des vésicules tapissées de macromolécules adsorbées à la membrane. Ces mécanismes conduisent donc à une internalisation efficace, avec des concentrations en macromolécules dans des vésicules bien plus fortes que dans le fluide ambiant.^{73,80}

Le mécanisme le plus courant est l'**endocytose dépendante des clathrines** (figure 24). C'est également le plus rapide et le plus étudié. Il est utilisé par les cellules des mammifères pour assimiler les nutriments essentiels de l'environnement, ou pour la communication intercellulaire. Les clathrines ont pour rôle de rassembler les récepteurs à la surface en grappes appelées clusters, de former les vésicules d'endocytose et de guider ces vésicules vers leur destination intracellulaire. Les destinations varient suivant le récepteur impliqué et le type cellulaire.⁸⁰

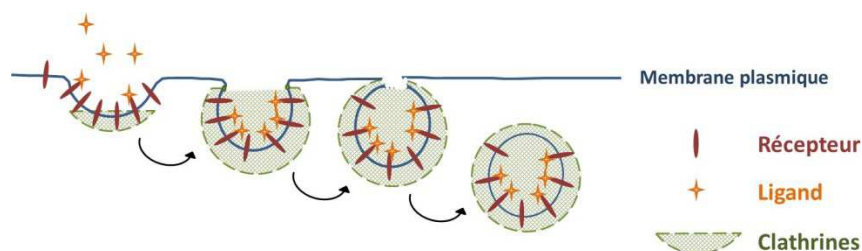


Figure 24 : Endocytose clathrine-dépendante. Les récepteurs sont regroupés dans les puits recouverts de clathrines, puis la membrane s'invagine formant des vésicules d'endocytose sous l'action des clathrines. Ces vésicules, remplies de complexes ligands-récepteurs, sont refermées puis se détachent de la membrane pour aller dans le cytoplasme. Une fois ces vésicules délivrées à leur destination intracellulaires, les protéines impliquées dans l'endocytose retournent à la membrane où elles sont recyclées, c'est-à-dire où elles reprennent leurs fonctions.⁸⁰

Le succès d'une vectorisation de médicament dépend tout autant de sa capacité à cibler efficacement un récepteur spécifique que du **chemin intracellulaire** emprunté par le complexe ligand-récepteur dans la cellule. Ce chemin dépend des récepteurs et des types cellulaires.

Dans la plupart des cas, le ligand internalisé au sein de vésicules est dissocié du récepteur en milieu acide dans les endosomes (pH 5-6). Puis, le récepteur retourne à la

membrane (recyclage), tandis que le ligand est voué à une dégradation par protéolyse dans les lysosomes (figure 25). Il arrive que les ligands soient transportés dans un endosome et retourne à la membrane : c'est la transcytose.

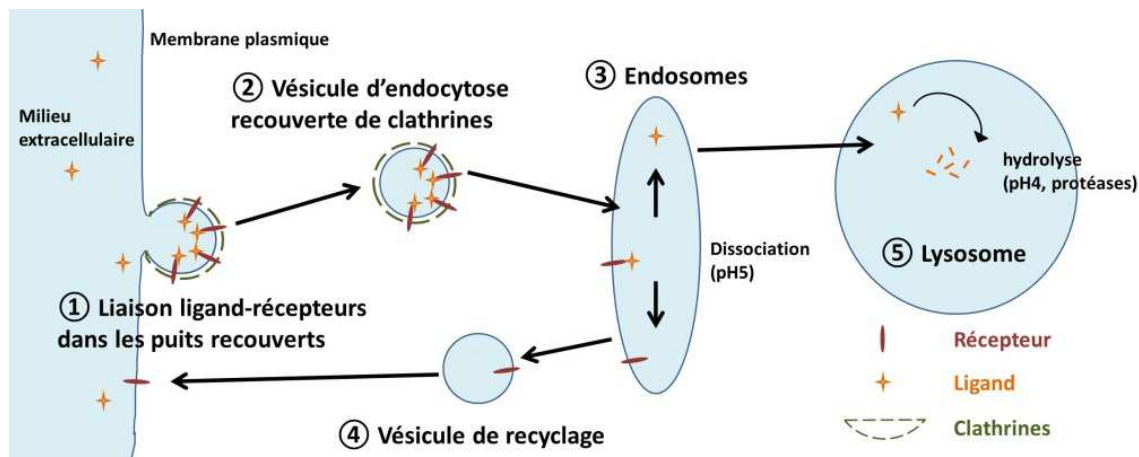


Figure 25 : Schéma du devenir intracellulaire des molécules internalisées par endocytose dépendante de récepteurs ; cas du mécanisme impliquant les clathrines.⁸³

Ainsi, lorsqu'une accumulation de l'agent thérapeutique dans le cytoplasme est souhaitée, il est indispensable d'éviter les lysosomes qui peuvent induire une dégradation (pH acide, protéases). Il est à noter que la membrane des lysosomes est une barrière au passage dans le cytoplasme : seules les molécules de faible poids moléculaire et les produits d'hydrolyse peuvent la traverser. La diffusion des macromolécules dans le cytoplasme doit donc s'effectuer avant la fusion avec le lysosome.^{73,84} Dans le cas où la molécule vectorisée ne soit pas capable de diffuser dans le cytoplasme avant son incorporation au lysosome, la sortie de ce compartiment cellulaire peut être induite à l'aide d'une fonction chimique.⁸⁵

La **durée du processus d'endocytose est rapide**. Elle est estimée de 10 à 15 minutes donc permet plusieurs centaines de cycle d'endocytose pour un même récepteur pendant son temps de vie.^{73,82,86}

III.1.d - L'ASGP-R est la cible idéale pour la vectorisation vers les hépatocytes

Plusieurs systèmes de vectorisation actifs vers le foie par des récepteurs ont été développés.² Différents récepteurs à la surface des hépatocytes sont communément ciblés.^{1,87}

Le **récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R)** est le plus caractérisé et le plus étudié pour le **ciblage des hépatocytes**. Il est connu pour être **abondamment et presque exclusivement exprimé sur la surface de ce type cellulaire**, ce qui est un atout considérable pour l'efficacité et la sélectivité de la vectorisation. Ce récepteur est impliqué dans la clairance de glycoprotéines, c'est-à-dire l'élimination de ces protéines de la circulation.^{82,84,88-90}

L'ASGP-R est localisé à la membrane plasmique de la face sinusoidale des hépatocytes en contact avec la circulation sanguine, et il est absent de la face apicale qui entoure les

canalicules. Il représente 0,4% de la totalité des protéines à la membrane plasmique de ce type cellulaire.⁹¹ Pour comparaison, il est à noter que les clathrines qui recouvrent la membrane des cellules représentent 1 à 2% de la totalité des protéines. Le nombre de site de reconnaissance des ligands est estimé entre 100 à 500 000 par hépatocyte.⁹²

Bien qu'il ait été détecté sur certains macrophages, monocytes ou encore cellules épithéliales intestinales, son expression extra-hépatocytaire est minimes : le niveau d'expression de l'ARNm de ce récepteur est environ 40 fois plus élevé dans le foie que dans les autres organes.^{1,5}

L'ASGP-R réalise une endocytose rapide de ses ligands, par un mécanisme dépendant des clathrines.⁸⁶ Le chemin intracellulaire des glycoprotéines ainsi assimilées passe par l'endosome et le lysosome, comme nous l'avons vu précédemment.⁹³⁻⁹⁶

Dans la cadre de la vectorisation de médicaments, des **ligands synthétiques de ce récepteur** ont montré une **haute affinité de reconnaissance** et des **cinétiques d'internalisation et de trafic intracellulaire proches des cinétiques physiologiques**.^{82,97} Les principes actifs internalisés dans les hépatocytes ne sont pas nécessairement détruits dans les lysosomes, des **preuves de passage des agents vectorisés dans le cytoplasme** existent. Ceci a notamment été confirmé par la vectorisation d'ARNm vers les hépatocytes.⁹⁸ Cet ARNm transporté au sein de cyclodextrines polycationiques amphiphiles galactosylées code pour la « *Green Fluorescent Protein* » (GFP). Il utilise la machinerie cellulaire présente dans le cytoplasme pour induire la synthèse de la GFP. La fluorescence des cellules témoigne donc d'une libération de l'ARNm vectorisé dans le cytoplasme.

De nombreux exemples de vectorisation *in vivo* attestent de la pertinence de cette technique de vectorisation, et un traitement contre le cancer a même atteint la phase II d'essais cliniques.⁹⁹ Nous reviendrons sur ces exemples dans les parties suivantes dédiées à l'ASGP-R.

Néanmoins, la stratégie de ciblage des ASGP-R pour la vectorisation de chélateurs possède notamment les **deux limitations** suivantes.

La première est la présence de ligands endogènes, les asialoglycoprotéines. Les vecteurs employés pour le ciblage doivent donc être d'excellents compétiteurs de ces protéines circulantes afin de conduire à des taux d'internalisation des chélateurs satisfaisants.

La deuxième est l'altération du taux d'expression ou du fonctionnement de l'ASGP-R par des facteurs comme l'éthanol, le diabète, les cirrhoses ou encore une hépatectomie partielle.⁵ Une surcharge en métaux comme le Cu, le Zn et le Fe peuvent également bloquer le processus d'endocytose de ce récepteur de manière réversible.¹⁰⁰ Dans la cadre de la maladie de Wilson, le patient doit donc être traité avant que le foie ne subisse des lésions trop importantes.

III.2) L'ASGP-R : une lectine de type C

III.2.a - Qu'est-ce qu'une lectine ?

Le mot lectine vient du latin « *legere* » qui signifie « sélectionner ».¹⁰¹ Les lectines sont des protéines ubiquitaires de l'organisme unicellulaire à l'animal, qui peuvent être solubles ou accrochées à des membranes. Elles **reconnaissent des carbohydrates** de mono- ou oligosaccharides souvent **de manière fortement sélective**, qu'elles lient réversiblement. Cette reconnaissance est un processus clé dans de **nombreux mécanismes biologiques** comme la fertilisation, l'adhésion cellulaire, l'infection par des virus et l'endocytose de macromolécules. Néanmoins, les lectines ne possèdent aucune activité catalytique.^{102,103} La découverte d'applications utilisant les interactions sucres-lectines est en plein essor.^{8,104} Par conséquent ces protéines suscitent un intérêt croissant.

Une des caractéristiques des lectines permettant de les reconnaître est leur capacité d'agglutination des érythrocytes, qui sont des cellules sanguines couvertes de nombreux saccharides.¹⁰² Par reconnaissance de ces sucres, les lectines en solution induisent la formation d'agrégats de ces cellules. Cette propriété est appelée hémagglutination, et elle est utilisée pour des tests d'inhibition de lectines.⁸

L'ASGP-R est la première lectine animale à avoir été identifiée et isolée, par G. Ashwell et A. Morell en 1974.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Sa capacité à l'érythroagglutination a été mise en évidence par Stokert *et al.*, certifiant ainsi son appartenance à la famille des lectines.¹⁰⁸

Il existe une grande variété de lectines avec des structures et organisations moléculaires différentes. Cependant, toutes sont des protéines ou glycoprotéines oligomériques. Elles possèdent au moins deux **domaines de reconnaissance des carbohydrates** (DRC), dont plusieurs peuvent être portés par une même protéine. Ces domaines correspondent au site d'interaction sélective avec le ligand saccharidique, alors que les autres domaines sont responsables de la structuration de la protéine et des réponses consécutives aux événements de reconnaissance.¹⁰⁹

III.2.b - La classification des lectines animales

La classification des lectines animales est basée sur la **structure des domaines de reconnaissance des carbohydrates**. Les différents types de domaines de reconnaissance possèdent des résidus caractéristiques, conservés au cours de l'évolution et qui déterminent leur repliement général. Ces résidus forment un cœur hydrophobe, et sont parfois impliqués dans la coordination de cations divalents ou l'établissement de ponts disulfures. Outre des homologies de séquence et une structure semblable, les domaines de reconnaissance d'une même famille ont tendance à partager des propriétés similaires de liaison avec les sucres. Ceci n'empêche pas dans certains cas une diversité de ligands reconnus au sein d'une même famille. Les types majeurs de domaine de reconnaissance de lectines animales sont résumés dans le tableau ci-après (tableau 6).^{83,109}

Tableau 6 : Exemples de différents types de domaines de reconnaissance des carbohydrates pour les lectines animales. Glc = glucose ; Man = Mannose. D'après Taylor *et al.*, *Introduction to Glycobiology*, troisième éd., 2012, Oxford University Press.

Type de DRC	Structure	Ligands types	Exemples de fonctions
Calnexine	Feuillet β	Glc ₁ Man ₈	Contrôle du repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique
Type M	Tonneau d'hélice α	Man ₈	Reconnaissance des protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) pour leur dégradation
Type L	Feuillet β	Man ₅₋₉	Tri des protéines dans le RE
Type P	Unique structure riche en feuillets β	Man 6-phosphate	Tri des protéines dans le post-Golgi
Type C	Unique structure mélange hélice α / feuillet β	Variés	Adhésion cellulaire (sélectines) Clairance des glycoprotéines Immunité innée (collectines)
Type S ou galectines	Feuillet β	β -galactosides	Pontage de glycanes à la surface des cellules, interactions cellules-cellules ou cellules-matrice
Type I	Famille des immunoglobulines	Acide sialique	Adhésion cellulaire (siglecs)
Type R	Trèfle β	Variés	Ciblage d'enzyme, toxine bloquant le ribosome après son internalisation dans la cellule

L'ASGP-R fait partie des lectines de types C ; il reconnaît les résidus **galactosides terminaux** portés par les asialoglycoprotéines (ASGP).¹⁰⁶ Chez l'homme, plusieurs protéines de type C, comme la « *macrophage galactose lectin* » (MGL), le « *scavenger receptor* » (SRLC), le récepteur des cellules de Kupffer et les galectines sont également capables de reconnaître les galactosides.

Au cours de nos travaux, nous avons focalisé notre intérêt sur la lectine ASGP-R de mammifère. Nous ne traiterons pas de la lectine aviaire dont les propriétés de reconnaissance diffèrent : elle lie préférentiellement les résidus *N*-acétylglucosamine (GlcNAc).^{95,110}

III.2.c - Les lectines de type C

La famille des lectines de type C, dont fait partie **l'ASGP-R**,¹⁰⁵ est entre autres caractérisée par une **liaison du sucre dépendante du calcium (Ca)**.¹¹¹ Mais cette seule propriété ne suffit pas à distinguer les lectines de type C, puisque c'est également le cas pour les calnexines et pour la plupart des lectines de type L. Le **domaine de reconnaissance** des lectines de types C a la particularité d'être fortement conservé. Il est composé de 115 à 130 acides aminés, avec **14 résidus invariants et 18 très conservés**. Ses propriétés structurales sont la présence de **deux ponts disulfures, deux sites de coordination du Ca²⁺, plusieurs coudes** et un **cœur hydrophobe étendu**.¹¹² Malgré ces homologies et similarités structurales, les ligands reconnus sont divers, comme le D-mannose (Man), le D-glucose (Glc) ou le D-galactose (Gal) et leurs dérivés (figure 26).¹¹²

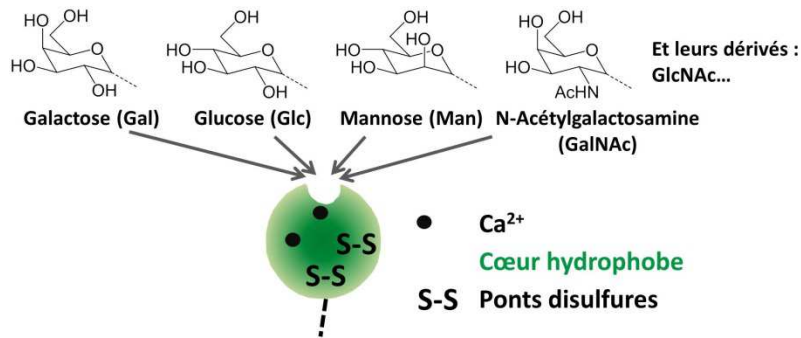


Figure 26 : Schéma d'un domaine de reconnaissance de type C.

Les lectines de type C sont classées en sous familles, selon leur architecture globale et la position relative de leurs domaine de reconnaissance par rapport aux autres domaines. Cette classification corrèle avec les homologies de séquences des domaines de reconnaissance.¹¹²

Le groupe II est le plus diversifié des lectines de type C. Il contient une douzaine de membres d'origine humaine, dont les plus connus sont l'**ASGP-R** et la « *cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* » (DC-SIGN), une lectine notamment impliquée dans la propagation du virus d'immunodéficience humaine (VIH). Les fonctions des protéines de ce groupe sont variées : interactions entre cellules, interaction hôte-pathogène, clairance de glycoprotéines... Ces récepteurs sont des polypeptides transmembranaires de type II composés d'une extrémité C-terminale extracellulaire portant le domaine de reconnaissance, une « tige » ou « cou » servant de séquence d'oligomérisation et de point d'ancrage transmembranaire, et enfin une extrémité N-terminale intracellulaire pour la transduction de signaux (figure 27).

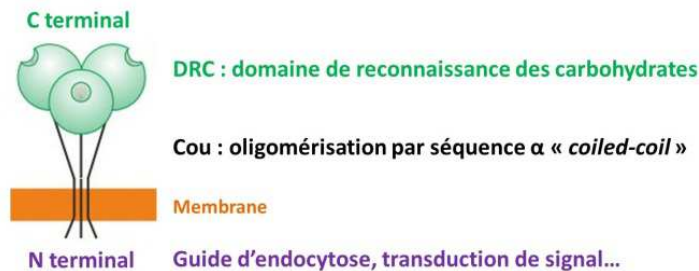


Figure 27 : structure d'une lectine transmembranaire de type II.

Deux sous-types de **domaines de reconnaissances** des **extrémités C-terminales** sont recensés chez les protéines du groupe II : ceux reconnaissant le Gal ou ceux reconnaissant le Man. Certains domaines de reconnaissance ne lient qu'un seul sucre tandis que d'autres ont des spécificités de reconnaissance plus complexes. Par exemple, l'ASGP-R n'interagit qu'avec le résidu terminal de type Gal des ASGP, alors que DC-SIGN reconnaît des oligosaccharides composés de Man et N-acétylglucosamine (GlcNAc).¹¹³

Contrairement au domaine de reconnaissance, **le cou** est soumis à une grande diversité entre les membres du sous-groupe. Par exemple, DC-SIGN possède un cou beaucoup plus long et flexible que celui de l'ASGP-R, et s'oligomériser en tétramère.¹¹⁴ Le récepteur SRLC quant à lui possède un cou étendu avec une insertion de type collagène.¹¹⁵

Enfin, **l'extrémité N-terminale** sert de guide lors de l'endocytose ou interagit avec des protéines intracellulaires pour la transduction de signal. C'est la région la moins conservée, elle conditionne la fonction assurée par la protéine en fonction de son état de phosphorylation.

Au sein de ce groupe, l'ASGP-R partage beaucoup de similarités avec la « *mannose binding protein* » (MBP), lectine reconnaissant les oligomannosides.^{116,117}

III.3) Structure et fonction de l'ASGP-R

III.3.a - Structure de l'ASGP-R

Une glycoprotéine oligomérique

L'ASGP-R est un complexe hétérooligomérique composé de deux polypeptides différents mais hautement homologues.

Les premiers ASGP-R ont été isolés à partir d'hépatocytes de lapin, puis de rats et enfin d'humain.^{94,107,118} Les compositions des protéines solubles obtenues sont très semblables et ont permis l'étude de la structure des deux sous-unités. Il est à noter que le niveau d'oligomérisation des sous-unités en solution n'est pas représentatif de celui à la membrane.

La **lectine hépatique de lapin** est composée de deux sous-unités de 48 et 40 kDa, qui s'auto-assemblent en solution en des complexes de 260 kDa avec une stœchiométrie 2:4.^{107,110} Les deux sous-unités sont des glycoprotéines contenant divers acides aminés et des Gal, Man, GlcNAc et de l'acide sialique. La **lectine ASGP-R de rat** est quant à elle un peu différente.^{94,119} Elle est composée de trois sous unités notées RHL pour « *rat hepatic lectin* » : RHL-1 de 41 kDa, RHL-2 de 49 kDa et RHL-3 de 54 kDa dans un ratio de 8:1:1. Néanmoins, les deux polypeptides RHL-2 et 3 sont pratiquement identiques et pourraient être considérés comme une seule et même sous-unité. Seules des différences de glycosylation post-traductionnelles sur leurs extrémités N-terminales les distingueraient.¹²⁰

Enfin, **l'ASGP-R humain** a d'abord été considéré comme composé d'une seule sous unité **H1 de 46 kDa**.^{118,121} Puis une seconde protéine a été découverte, **H2 de 50 kDa, partageant 58% d'homologie de séquence** avec la première.⁴ Ces deux protéines sont codées par deux gènes différents très conservés.⁴ Les deux sous-unités H1 et H2 forment majoritairement des **complexes au minimum trimériques, avec des stœchiométries de 2-5:1**, bien que d'autres ratios soient rapportés (figure 28).¹²²⁻¹²⁵

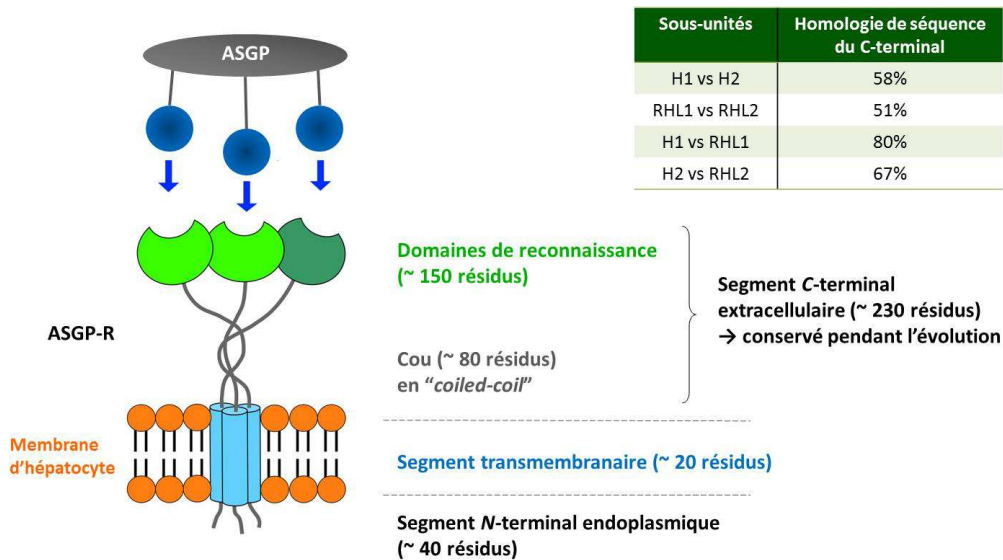


Figure 28 : Structure de l'ASGP-R ; ASGP = asialoglycoprotéine.^{4,126,127}

L'extrémité **N-terminale** comporte environ 40 résidus. Elle favorise la formation des puits recouverts de clathrines, qui rassemblent les récepteurs à la membrane et accomplissent leur endocytose.

Le **cou**, d'environ 80 acides aminés, comporte plusieurs motifs répétés hxxhcx de sept acides aminés, où h est un résidu hydrophobe, c est un résidu chargé et x un résidu variable.¹²⁸ Cette heptade répétée induit une trimérisation des polypeptides par la formation d'une superhélice ou « *coiled-coil* » d'hélices α .

Enfin, l'**extrémité C-terminale** est composée de 230 résidus et contient le domaine de reconnaissance de type C, d'environ 150 résidus.¹⁰⁶

Les protéines de rat et d'humain ont une très forte homologie de séquence, supérieure à 60% pour les extrémités C-terminales. Les homologies sont plus fortes entre les sous-unités majoritaires des deux espèces, notée 1, qu'entre les deux sous-unités différentes d'une même espèce : H1 est plus homologue avec RHL1 qu'avec H2. (figure 28).⁴

Les deux sous-unités sont nécessaires pour avoir un récepteur fonctionnel.^{96,124} La sous-unité H1 seule a la capacité de s'homo-oligomériser, cependant elle ne peut réaliser l'endocytose. La glycoprotéine H2 seule n'est quant à elle pas capable de s'homo-oligomériser ni de quitter le Golgi pour se rendre à la membrane ; elle y est rapidement dégradée. Les deux sous-unités sont impliquées dans la liaison avec le ligand.¹²⁹ Leur capacité à reconnaître le Gal a notamment été montrée sur la lectine de rat.¹²⁰ Il est à noter que H1 présente une meilleure affinité pour les galactosides que H2. Par ailleurs la sous-unité mineure H2 est plus accessible que la majeure à la membrane des hépatocytes.^{129,130}

Pour conclure, le modèle le plus simple et satisfaisant consiste en une **lectine trimérique transmembranaire de type II**, résultant de l'**oligomérisation de H1 et H2 dans une stœchiométrie 2:1**, s'organisant en cluster à la membrane des cellules hépatiques.¹³¹

Le domaine de reconnaissance de l'ASGP-R

Le **domaine de reconnaissance de la sous unité H1 a été cristallisé** par Meier *et al.*¹²⁷ N'ayant pu être cristallisé en présence de ligand, la séquence impliquée dans la reconnaissance du sucre a été déterminée par analogie avec d'autres lectines homologues de type C, en particulier la MBP. Cette dernière est la première lectine de type C à avoir été cristallisée, donnant les bases de compréhension de structure et de reconnaissance des sucres pour toutes les lectines de cette catégorie.^{132,133} Comme nous l'avons évoqué, les caractéristiques communes à tous les domaines de reconnaissance de type C sont : **deux ponts disulfures, deux sites de coordination de Ca²⁺, et un cœur hydrophobe étendu**. Les acides aminés impliqués à la fois dans la coordination d'un Ca et du sucre ont été mis en évidence, élucidant ainsi le mode de d'interaction avec le sucre dépendant du Ca²⁺.^{112,134}

Le domaine de reconnaissance de H1 a la particularité de comporter **trois sites de coordination du Ca²⁺ et trois ponts disulfures** ; il est dit domaine de reconnaissance de forme longue. Ces Ca²⁺ et ponts disulfures stabilisent la structure du domaine de reconnaissance. Deux Ca²⁺, les sites 1 et 2, sont localisés dans la région de reconnaissance du sucre, et le troisième est proche de l'extrémité *N*-terminale du domaine de reconnaissance. Chaque Ca²⁺ est coordonné par huit atomes d'oxygène appartenant à la protéine, au sucre ou à des molécules d'eau en absence de sucre.

Le domaine de reconnaissance de H1 peut être divisé en deux domaines (figure 29) :

- L'un est composé par le *C*-terminal et le *N*-terminal assemblés en 2 hélices α et un feuillet β (figure 29 ; partie inférieure).
- L'autre est le domaine fonctionnel, composé de 2 feuillets β et 5 boucles. L'une de ces boucles, proéminente et riche en glycine, fait partie du site de liaison du sucre.¹¹⁷

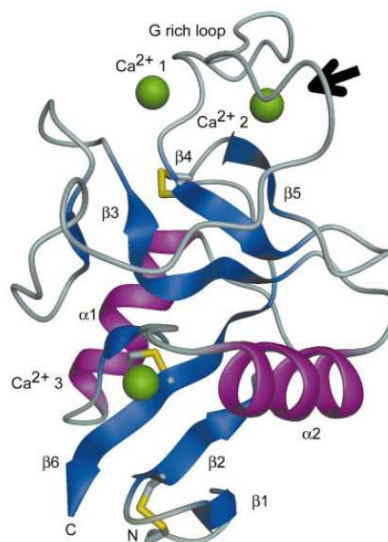


Figure 29 : Diagramme en ruban de la structure cristallographique du domaine de reconnaissance de H1. Les deux hélices α sont en magenta, les feuillets β en bleu, les Ca²⁺ en vert, et les trois ponts disulfures en jaune. La division en deux sub-domaines est visible au niveau du feuillet β 3. Le site de liaison du sucre est signalé par la flèche, au niveau du Ca²⁺ du site 2. D'après Meier *et al.*, *J. of Mol. Biol.*, 2000, 300, 857.

Le **site de liaison du sucre** se trouve au niveau du **Ca²⁺ du site 2**, proche de la **boucle riche en glycines** (figure 30). Elle comprend les peptides 236 à 268, dont les caractéristiques de liaison du sucre et coordination du Ca²⁺ sont détaillés dans la section III.4).

Site de liaison du sucre de l'ASGP-R humain H1:

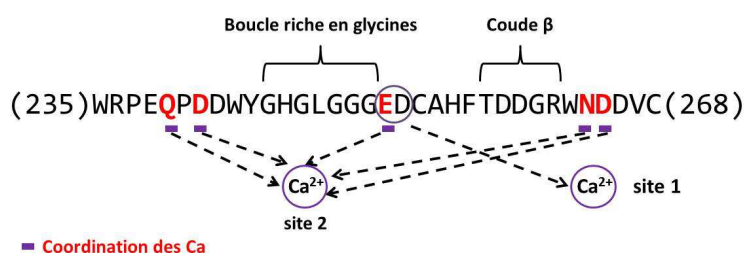


Figure 30 : Séquence peptidique du site de reconnaissance du sucre de l'ASGP-R sur la sous unité H1.

III.3.b - Fonction de l'ASGP-R

Les fonctions de l'ASGP-R ne sont pas encore toutes clairement définies. Sa fonction la plus évidente est la **clairance des glycoprotéines du sang** pour leur dégradation.

Les glycoprotéines sont des protéines portant des sites sur lesquelles des mono-, oligo- et/ou polysaccharides ont été accrochés lors de modifications post-traductionnelles, appelées glycosylations. Ces glycosylations ont de nombreux rôles biologiques et concernent la majorité des protéines destinées à des fonctions extracellulaires. Beaucoup de ces protéines portent des **acides sialiques** (NeuAc) en bout de chaîne saccharidique. Sous l'action d'une enzyme appelée neuraminidase (ou sialidase), ces acides sialiques sont coupés, laissant le pénultième sucre accessible. Ces protéines sont alors appelées les **asialoglycoprotéines (ASGP)**. Parmi les ASGP reconnues par l'ASGP-R se trouvent d'asialoorosomucoïde (ASOR)¹³⁵, l'asialofétuine¹³⁶ et l'asialocéruleplasmine,¹³⁷ provenant de la céruleplasmine évoquée précédemment dans le cadre du transport du Cu dans la circulation (figure 31).⁸³ Toutes ont en commun d'exposer un **résidu Gal terminal** après leur désialylation.

La durée de vie de ces ASGP dans la circulation est très courte, de l'ordre d'une dizaine de minutes pour l'asialocéruleplasmine. Ceci est dû à leur clairance par le foie pour leur dégradation. Ainsi, dans les années 70, G. Ashwell et A. Morell ont découvert le récepteur ASGP-R en étudiant le métabolisme des glycoprotéines du sérum.¹⁰⁵ Ces deux chercheurs travaillaient sur le rôle de la céruleplasmine dans la maladie de Wilson.¹³⁸ Ils ont démontré que les ASGP dont la désialylation conduit à **l'exposition d'un résidu galactosyl** sont **rapidement et sélectivement assimilée par les cellules hépatiques parenchymateuses**. La cinétique de clairance dépend **du nombre et de l'intégrité des résidus terminaux Gal** portés par leur ASGP : elle est efficace et rapide pour un minimum de deux résidus galactosyl désialylés.^{139,140}

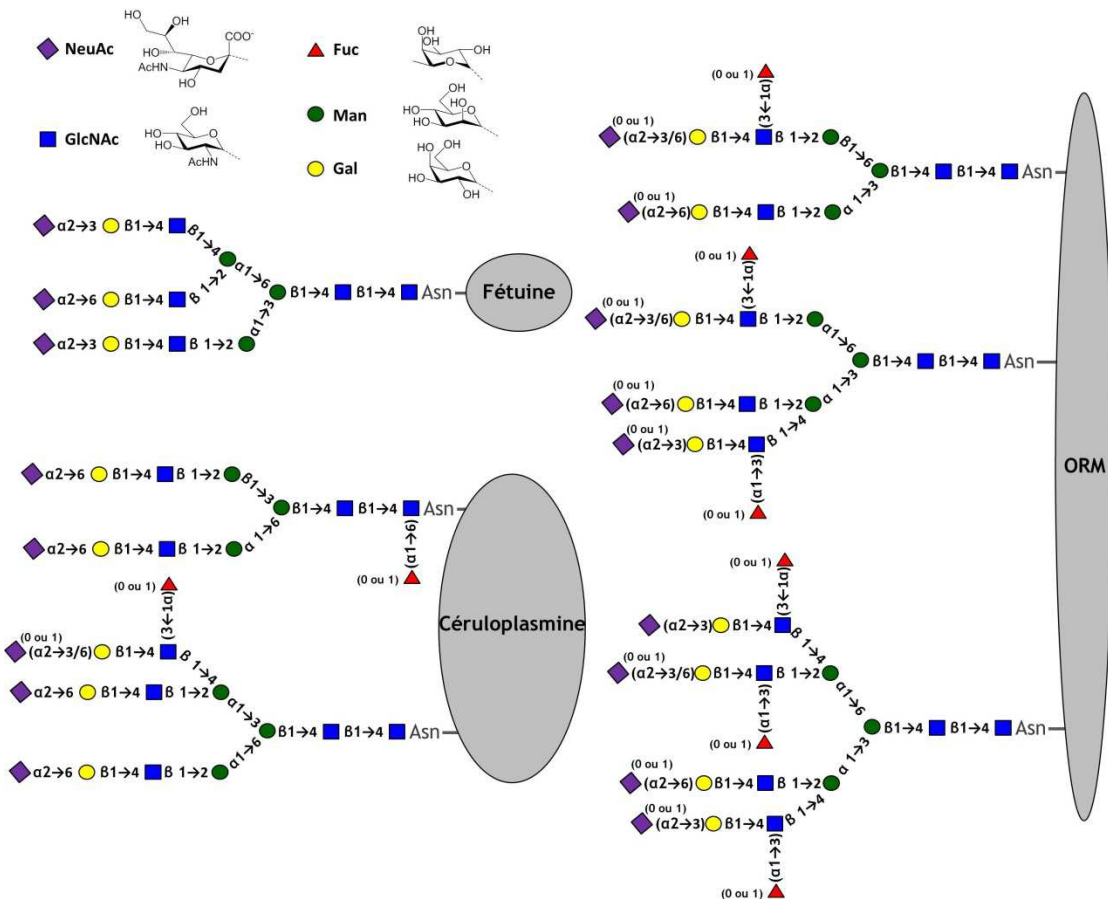


Figure 31 : Structure des chaînes oligosaccharidiques portées par la fétuine, la céruloplasmine et l'orosomucoïde (ORM). Celles-ci ne sont efficacement reconnues qu'après décrochage de l'acide sialique terminal par la neuraminidase. NeuAc = acide sialique ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Man = Mannose ; Gal = Galactose ; Fuc = Fucose.

La régulation du taux de protéines circulantes n'est cependant pas la seule fonction du récepteur. Son implication est évoquée dans des processus d'immunorégulation, d'infection virale ou encore de clairance de lipoprotéines, mais aucune autre fonction n'a été clairement identifiée pour l'instant.¹⁴¹ Comme ceci est visible sur les compositions des oligosaccharides portés par les ASGP (figure 31), le GalNac n'est pas très courant sur les glycoprotéines circulantes. Il est par contre abondant sur les surfaces cellulaires. Or, il est reconnu avec une très forte affinité par les ASGP-R ; ceci laisse supposer que l'ASGP-R pourrait jouer un rôle dans des interactions cellulaires.¹¹⁸

Par ailleurs, il est à noter que le domaine de reconnaissance de l'ASGP-R est lui-même une glycoprotéine. L'intégrité des acides sialiques du C terminal de l'ASGP-R est nécessaire pour l'interaction avec les ASGP.¹⁴² Il a été démontré qu'un traitement de l'ASGP-R à la neuraminidase conduit à une perte partielle voire totale de son activité en libérant un résidu Gal. Ce résidu inhibe l'interaction avec les ASGP en occupant le site de reconnaissance.¹⁴³

L'acide sialique a donc deux niveaux de régulation :

- il contrôle la clairance des glycoprotéines en masquant leur pénultième résidu Gal reconnu pas les ASGP-R.¹⁴⁴
- il contrôle l'activité de reconnaissance des ligands par les ASGP-R soit en masquant, soit en libérant le résidu auto-inhibiteur Gal porté par le domaine de reconnaissance. Ce processus est réversible.

III.4) Les propriétés de reconnaissance de l'ASGP-R

Les lectines reconnaissent un ligand selon un mécanisme à deux composantes (figure 32) :⁸

- une **composante monovalente**, qui correspond à l'interaction d'un sucre ou une chaîne saccharidique dans le domaine de reconnaissance,
- et une **composante multivalente**, qui correspond à l'interaction entre un ligand multivalent portant plusieurs sucres et une lectine multivalente présentant plusieurs domaines de reconnaissance généralement identiques.

L'interaction entre une lectine et son ligand suit le concept « clef-serrure » de Fisher, donnant un complexe plus stable que que les deux molécules séparées.

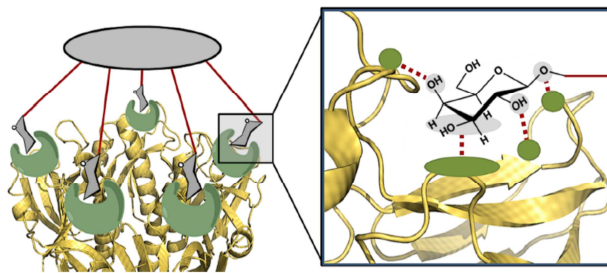


Figure 32 : La liaison d'un sucre au sein du domaine de reconnaissance provient d'une composante monovalente, avec des interactions non covalentes entre le sucre et les résidus de la lectine, et multivalente, avec un ajustement du ligand à la géométrie de la lectine. D'après Cecioni *et al.*, *Chem. Rev.*, 2015, 115, 525.⁸

La caractérisation de l'interaction monovalente et multivalente entre un ligand et une lectine est essentielle pour l'approche thérapeutique ou la vectorisation. Celle-ci peut être évaluée de manière empirique par la détermination de constante de dissociation K_d des complexes ligands-lectines. Mais elle n'est pas toujours possible à obtenir et ne reflète pas le pouvoir inhibiteur du candidat en condition *in vivo*. La **mesure de potentiel inhibiteur** ou concentration pour 50% d'inhibition d'un ligand de référence (IC_{50}) est très informative et plus facile à mesurer. **Dans les études présentées ci-après, les IC_{50} sont évalués par des compétitions avec l' ^{125}I -ASOR, donnant une idée de l'affinité relative des ligands par rapport à cette glycoprotéine.**¹⁴⁵ De nombreuses techniques sont utilisées pour les déterminer, mais la comparaison d' IC_{50} n'a du sens que lorsque les valeurs sont obtenues dans les mêmes conditions d'expérimentation.

Les études d'interaction de divers ligands avec la lectine ASGP-R ont été réalisées dans des **conditions expérimentales très variées**, utilisant soit des hépatocytes entiers, des lectines solubilisées ou encore la membrane plasmique isolée. La structure de la lectine diffère en termes de degré d'oligomérisation, organisation des sous-unités et accessibilité des domaines de reconnaissance selon les conditions choisies, ce qui modifie les phénomènes de reconnaissance. De plus, les expérimentations ont été effectuées avec des ASGP-R de trois origines : lapin, rat et homme. Bien qu'hautelement homologues, des différences d'interaction ne sont pas à exclure.

Bien que difficiles à mettre en relation, toutes ces études ont permis de mettre en évidence les **structures monovalentes et multivalentes de haute affinité pour les ASGP-R.**

III.4.a - Mécanismes de reconnaissance monovalente

La reconnaissance d'un monosaccharide au sein de domaines de reconnaissance est un équilibre dynamique et rapide. Elle s'effectue par l'établissement d'un **réseau de liaisons hydrogènes** entre les résidus de la protéine et les hydroxyles du sucre. Il n'est également pas rare d'observer des **interactions hydrophobes** entre des chaînes latérales d'acides aminés aromatiques et l'une des faces apolaires du sucre (α ou β), ou encore les fonctions déoxy et *N*-acétylés (figure 33). En général les carbohydrates sont des molécules neutres, mais dans certains cas ils peuvent être chargés et induire de **contacts ioniques électrostatiques** ; c'est par exemple le cas pour l'acide sialique (figure 33). Les **ions métalliques Ca^{2+}** jouent un rôle dans l'intégrité structurale de la lectine et dans le cas des lectines de type C, ils interviennent directement dans l'interaction avec le sucre (figure 33).

Enfin, la **solvatation** par des molécules d'eau sert de « relai » au sein du réseau de liaison hydrogène. Les hydroxyles du sucre prennent la place des molécules d'eau, ce qui produit un phénomène de désolvatation très favorable d'un point de vue entropique, qui est une force motrice dans de nombreuses interactions biomoléculaires.⁸

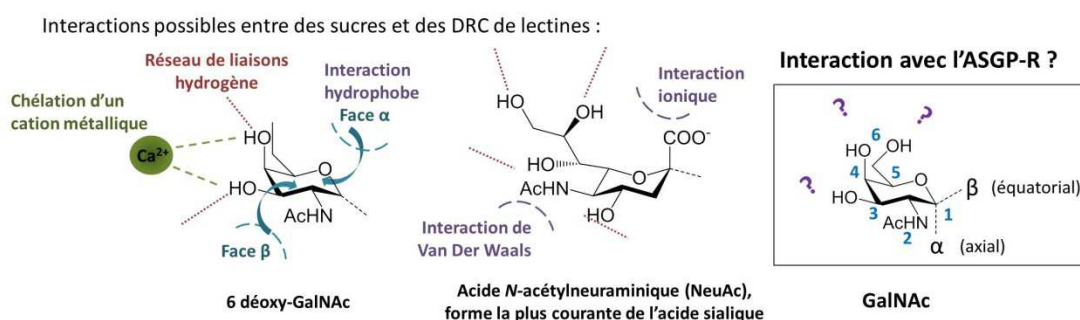


Figure 33 : Exemples de points de contact entre un monosaccharide et le domaine de reconnaissance (DRC) d'une lectine lors de la reconnaissance du sucre.

Le domaine de reconnaissance de l'ASGP-R reconnaît spécifiquement les **résidus galactosides terminaux** des glycoprotéines selon un processus saturable, dépendant du pH et de la concentration en Ca^{2+} .^{142,144} De plus, **son affinité pour le GalNAc est 10 à 50 fois supérieure à celle envers le Gal.**^{118,146} N'ayant pas pu être cristallisé en présence du ligand, ses caractéristiques de liaison du sucre ont été déterminées par analogie entre RHL-1 et d'autres lectines de types C dont le mode de liaison des sucres a été déterminé. D'élégantes études par mutagenèse dirigée ont été réalisées par Drickamer *et al.*^{116,117,133,147,148} Elles reposent sur le principe que tous les domaines de reconnaissance des lectines de types C partagent les mêmes acides aminés très conservés alors que leur spécificité de reconnaissance diffèrent. L'analyse des différences entre les séquences de ces domaines de reconnaissance permet donc de comprendre quels acides aminés sont essentiels dans la discrimination pour un type de sucre particulier.

Spécificité pour les sucres de type galactosides

Les deux acides aminés **Gln239** et **Asp241** sur RHL-1 sont responsables de la reconnaissance du Gal. Ils sont impliqués dans un réseau de liaisons hydrogènes avec les **hydroxyles 3 et 4** du sucre (figure 34). Ainsi, ils établissent la préférence pour le Gal par rapport au Man en favorisant l'accès à la poche aux sucres portant un 3-OH équatorial et un

4-OH axial. Ces deux seuls acides aminés suffisent à induire une affinité 10 fois plus forte pour les galactosides comparé au Man.^{133,149,150}

Par ailleurs, le **Ca du site 2** participe à la liaison du sucre : les hydroxyles 3 et 4 du sucre ainsi que le Gln239 et l'Asp241 font partie de sa sphère de coordination (figure 34). Chez toutes les lectines de type C, la préférence pour les sucres est attribuée à la formation du complexe ternaire site de reconnaissance-Ca-carbohydate.¹³³

Deux caractéristiques supplémentaires sont nécessaires et suffisantes pour obtenir la haute affinité et sélectivité pour les galactosides observés chez l'ASGP-R :

- l'affinité est apportée par le résidu **Trp243**. Sa chaîne latérale indolique interagit avec la face apolaire α du galactoside, stabilisant considérablement l'interaction entre la protéine et le sucre (figure 34).^{116,117,151}

- la spécificité est attribuée à la **boucle riche en glycines**. Celle-ci n'est pas en contact avec le sucre mais joue un rôle purement structural : elle immobilise le cycle indolique du Trp243 par un repliement local bien défini, empêchant ainsi l'entrée des sucres autres que les galactosides dans la poche de reconnaissance par exclusion stérique.¹¹⁶

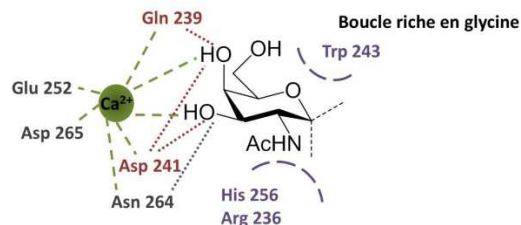


Figure 34 : Schéma récapitulatif le mode de liaison du sucre dans le domaine de reconnaissance de la sous-unité majoritaire de l'ASGP-R ; mise en évidence des interactions induisant la spécificité pour les galactosides et la préférence pour le GalNAc.

Préférence pour le GalNAc par rapport au Gal

La préférence de l'ASGP-R pour le GalNAc provient de l'interaction du groupement acétamide en position 2 du sucre avec une région hydrophobe de la protéine (figure 34).

Le résidu le plus crucial est l'**His256**, dont le cycle imidazole est directement impliqué dans des interactions de Van Der Waals avec l'acétamide en position 2. Son remplacement par une Ala diminue de 25 fois l'affinité relative pour le GalNAc mais n'affecte pas celle pour le Gal. Le positionnement de cette His est maintenu par l'Asn208.^{147,148}

Il en va de même pour le résidu **Arg236**, dont la disposition est stabilisée par la Gly238. Ce motif double l'affinité relative pour le GalNAc. Enfin, plusieurs autres résidus ont montré leur participation à la sélectivité mais leur impact est moins décisif et leur rôle n'est pas clairement défini.^{147,151}

Il est important de noter que cette interaction est fortement **dépendante du pH**, optimal entre 6 et 7,8.^{142,148} L'effet du pH est crucial pour la dissociation du complexe ligand-récepteur dans l'endosome. Il est attribué à une perte d'affinité du domaine de reconnaissance pour le Ca^{2+} au site 2 à cause de la protonation de certains résidus. Celle-ci change le repliement général de la protéine et bouleverse la sphère de coordination du Ca^{2+} . En particulier, la protonation de l'His256 altère son interaction avec l'Asn254. Ce dernier n'est alors plus dans un positionnement adéquat pour la coordination du Ca^{2+} .^{148,152}

III.4.b -Reconnaissance monovalente des résidus terminaux des ASGP

Comme nous l'avons vu, les ligands naturels endogènes reconnus par l'ASGP-R sont des protéines *N*-glycosylées. Ce sont des glycoprotéines portant des oligosaccharides mono à tétra-antenne accrochés sur des azotes des fonctions amides d'Asn (figure 31). Après retrait de leur résidu terminal acide sialique par la neuraminidase, certaines de ces glycoprotéines présentent un résidu terminal Gal ou parfois GalNAc qui interagit avec le site de reconnaissance de la lectine.

Bien qu'il soit établi que seul le résidu terminal entre dans la poche de reconnaissance et interagisse avec elle,¹¹⁸ une petite partie du reste de la molécule influence l'affinité de la liaison. Comme le montrent des études dédiées à l'impact de la chaîne oligosaccharidique sur la reconnaissance par la lectine, le **sucre attaché en position 1 de ce galactoside terminal** a une influence sur le potentiel inhibiteur du ligand.¹⁵³

Par exemple, Lee *et al.* ont révélé que les ligands portant un Lac, qui correspond à un Gal β (1 \rightarrow 4)Glc, ont un potentiel inhibiteur de l'¹²⁵I-ASOR environ 6 fois meilleur que les ligands galactosylés, sur hépatocytes de lapin.^{146,154} De plus, le LacNAc semble meilleur que le Lac, avec un potentiel inhibiteur 1,6 fois meilleur pour le Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc comparé au Gal β (1 \rightarrow 4)Glc.¹⁵³ Il est à noter que sur les ASGP, le disaccharide terminal est très souvent un Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc (figure 35).

L'**influence du lien glycosidique** sur le potentiel inhibiteur des oligosaccharides est avérée, bien qu'aucune conclusion générale n'ait pu être établie. L'effet de la configuration anomérique et de la position du point d'ancrage sur le sucre précédant semble dépendre de la composition de l'oligosaccharide et des conditions d'expérimentation. Il est à noter que des glycoprotéines α et β galactosylées montrent indifféremment de fortes affinités pour l'ASGP-R.^{146,154,155}

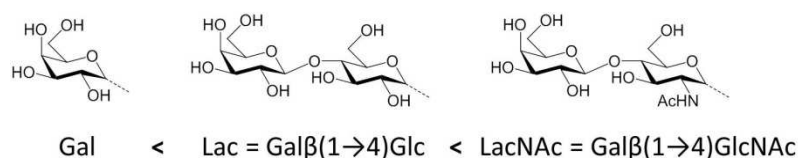


Figure 35 : Carbohydrates communément portés par les ASGP ; ordre de préférence par l'ASGP-R.

Enfin, le **résidu terminal acide sialique** des glycoprotéines gêne la reconnaissance par l'ASGP-R. Il est introduit en position 3 ou 6 du galactoside, et protège ainsi les ASGP de la dégradation dans les hépatocytes (figure 31). Lorsqu'il est en position 3, la reconnaissance est bloquée par l'impossibilité pour le galactoside d'entrer dans la poche et d'établir l'interaction avec la Ca²⁺.

La position 6 du galactoside terminal peut quant à elle être substituée par un autre sucre.^{146,153,156} Néanmoins, le disaccharide NeuAc α (1 \rightarrow 6)Gal n'est que faiblement reconnu par la lectine à cause d'une répulsion dans le site de reconnaissance due à la charge du carboxylate, empêchant l'interaction hydrophobe entre la face α du sucre et le Trp243.^{155,157,158}

III.4.c - Mécanismes de reconnaissance multivalente

La multivalence est un paramètre clé dans les phénomènes d'interaction bio-moléculaires, et tout particulièrement en glycobiologie. D'une manière générale, les lectines sont des récepteurs multimériques. Leur affinité pour un ligand monovalent est faible, avec des K_d de l'ordre de 10^{-3} . Elles privilégient les interactions avec des **ligands multivalents** comme les glycoprotéines (figure 31), qui présentent de **très fortes affinités** ($K_d \approx 10^{-9}$) et **sélectivités** *in vivo*.

Le terme « **cluster glycoside effect** » ou **effet cluster** désigne l'augmentation d'affinité par l'interaction multivalente entre une lectine et un ligand. C'est un phénomène complexe composé de plusieurs mécanismes de reconnaissance, parfois combinés et en équilibre dynamique, pour lequel aucun model prédictif n'a pu être établi pour l'instant. Voici les mécanismes d'interactions multivalentes les plus courants (figure 36) ^{8,159}.

- **l'effet chélate**, pour lequel plusieurs sucres du ligand lient simultanément plusieurs domaines de reconnaissance de la lectine (figure 36 a). Cet effet est l'un des plus étudiés ; l'augmentation d'affinité apportée par ce phénomène est considérable. Pour le décrire, le terme d'avidité remplace celui d'affinité de la lectine pour son ligand.

- le **rassemblement de récepteur en clusters** correspond au recrutement des lectines membranaires par un ligand multivalent. Sur la bicouche lipidique, lors de l'interaction d'un premier ligand, les récepteurs se déplacent vers le lieu d'interaction, formant des clusters où plusieurs lectines sont liées par un même ligand multivalent (figure 36 b).

- la liaison d'une partie du ligand sur un **site de reconnaissance secondaire** de la lectine est parfois observée (figure 36 c). Elle requiert l'association d'un ligand hétérobivalent à la fois sur le site principal de reconnaissance et sur un second site de liaison possédant une affinité et une spécificité de reconnaissance différentes du site principal.

- enfin, la **réassociation statistique** décrit le phénomène par lequel un ligand de haute densité de sucre s'associe avec un domaine de reconnaissance selon un équilibre d'échange dynamique, entre les différents sucres très proches les uns des autres et le domaine de reconnaissance (figure 36 d). Il est également appelé effet de concentration locale du ligand.

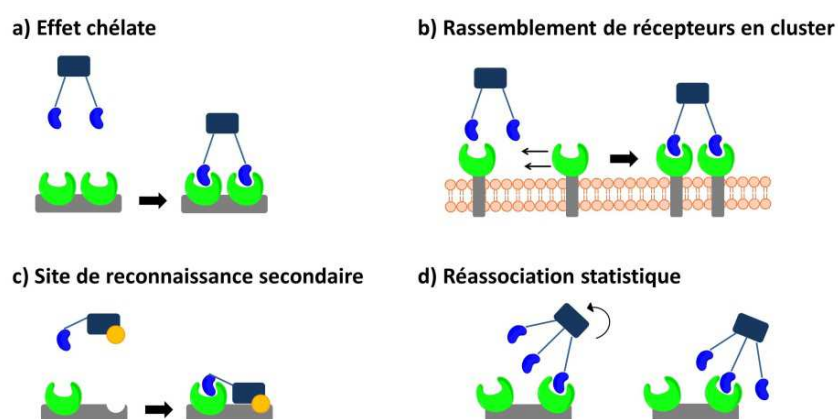


Figure 36 : Mécanismes non-agrégatifs de l'interaction entre des ligands multivalents et des récepteurs multivalents. D'après S. Cecioni *et al.*, Chem. Rev., 2015, 115, 525.

Il est possible que la liaison d'un ligand sur un récepteur, de manière multivalente ou non, influence l'affinité de liaison sur un second site de liaison, de manière positive ou négative. Ceci est dû à des changements stériques, de conformation ou de polarisation dus à la première interaction. C'est le **phénomène de coopérativité chélate**.⁸

Il est important de souligner que **la multivalence augmente non seulement l'affinité pour un ligand mais aussi la spécificité de reconnaissance**. Les lectines sont des protéines aux structures et fonctions très variées, qui sont déclenchées par la reconnaissance de ligands très spécifiques. Or la diversité des monosaccharides est limitée et les lectines sont parfois peu spécifiques vis-à-vis de ces derniers. La spécificité de reconnaissance est alors apportée par la diversité des oligosaccharides et des géométries de présentations.⁸ Ainsi, des paramètres comme la **densité de sucres, la flexibilité ou la conformation de la molécule porteuse des sucres** est déterminante pour la reconnaissance multivalente. Ceci implique que les lectines reconnaissent spécifiquement des ligands dont l'architecture s'adapte parfaitement à leur conformation.

La lectine ASGP-R reconnaît des ligands galactosides présentés de manière multivalente. La valence et la géométrie du ligand doivent donc être adaptées à la structure de la lectine, autorisant ainsi potentiellement les mécanismes présentés dans ce paragraphe.

III.4.d - Reconnaissance multivalente des oligosaccharides portés par les ASGP

Des études empiriques sur l'effet de la multivalence des ASGP ont été réalisées. Les résultats obtenus avec des lectines solubilisées sont qualitativement similaires à ceux obtenus avec les lectines sur membrane cellulaire. Cependant, d'un point de vue quantitatif, les valeurs d'IC₅₀ sont supérieures pour l'utilisation de lectines solubilisées. Les contrastes entre les inhibiteurs puissants et faibles sont moins prononcés, et l'effet de la multivalence est également moins marqué.¹⁴⁶ Comme mentionné précédemment, ceci s'explique par le fait que les lectines solubles n'ont pas le même niveau d'oligomérisation, la même accessibilité aux domaines de reconnaissance de leurs différentes sous-unités ni la même organisation que celle observée à la membrane. De plus, la structure de la lectine diffère suivant son origine entre les différents mammifères couramment utilisés (rat, lapin, homme...).¹⁶⁰

Influence de la densité de Gal sur l'efficacité de reconnaissance

L'affinité de l'ASGP-R est **fortement dépendante du nombre de galactosides** portés par le ligand. Cette observation a été effectuée dès la découverte de la lectine, soulignant notamment que la capacité des lectines de rat à être retenues sur gel de polyacrylamide fonctionnalisé par des Gal requiert un nombre minimal de sucres et un arrangement particulier de ces derniers.¹⁶¹

Il a été démontré que l'affinité de liaison des ASGP à la lectine ASGP-R augmente avec le nombre de galactosides par moles de protéines. Par exemple la protéine ASOR, qui comporte 20 Gal par moles de protéines, a une affinité 50 fois plus élevée pour l'ASGP-R humain que celles de l'asialoceruloplasmine qui n'en contient que la moitié, environ 12 Gal/mol.¹¹⁸

Des ligands oligosaccharidiques mono-, bi-, et tri-antenne portant des LacNAc ont été construits sur le modèle de l'ASOR et de l'asialofétuine. Ils reproduisent les oligosaccharides branchés portés par ces glycoprotéines (figure 31). Ces derniers possèdent des IC₅₀ de l'¹²⁵I-ASOR respectivement de 1.10⁻³, 1.10⁻⁶ et 5.10⁻⁹ M (tableau 7). la présence d'un

Les études de Lee *et al.* ont permis de déterminer les **distances optimales entre galactosides**, correspondant à la distance entre les domaines de reconnaissance à la surface des hépatocytes de lapin et de rat. Parmi les ligands oligosaccharidiques présentés précédemment (tableau 7), NONA I possède une affinité comparable à celle de l'ASOR dont il est inspiré : son affinité est seulement 10 fois inférieure à l'ASOR alors que cette dernière possède 5 motifs oligosaccharidiques de type NONA I (figure 31). La **structure de NONA I** est donc nécessairement **très proche de la conformation du récepteur**, et optimale pour interagir par effet cluster. Le complexe ligand-récepteur est stabilisé dans la configuration la plus probable pour le récepteur, qui a une organisation précise et rigide à la surface. Il a été montré que le bras le plus court de ligands de types NONA I interagit avec des sous-unités mineures et le deux autres bras plus longs avec des sous-unités majeures.^{165,166} Les distances entre les sucres au sein de cet oligosaccharide sont 15, 22 et 25 Å, et sont aujourd'hui considérées comme les distances optimales pour l'interaction avec les récepteurs (figure 37).^{167,168} Comme il est établi que l'interaction ligand-ASGP-R s'effectue par effet cluster et non une simple recombinaison statistique, **la distance entre les domaines de reconnaissance est donc d'environ 15 à 25 Å**. Ceci a été également montré sur l'ASGP-R humain, pour laquelle la distance entre les domaines de reconnaissance a été déterminée entre 25 et 30 Å.¹¹⁸ Bien entendu, un certain niveau de flexibilité des ligands est requis pour permettre l'adaptation à la lectine.

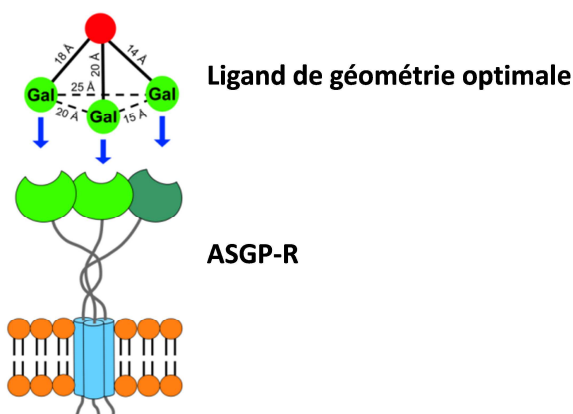


Figure 37 : Architecture optimale de ligand d'ASGP-R, reproduit d'après Khorev *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 5216.

Il est important de souligner que toutes les études empiriques de la lectine ASGP-R, telles que celles présentées ici, participent à la compréhension de sa structure et des phénomènes d'interaction avec les ligands au même titre que la cristallographie ou la mutagenèse dirigée. C'est cette mise en relation entre la structure de ligands synthétiques et celle de la lectine qui a permis de déterminer en premier lieu le mode de reconnaissance des sucres dans le domaine de reconnaissance, l'organisation des sous-unités de l'ASGP-R et le mode de présentation des domaines de reconnaissance à la membrane des hépatocytes.¹⁶⁹

III.5) Ciblage des ASGP-R par des ligands synthétiques

La compréhension de la structure et des propriétés de reconnaissance des sucres par l'ASGP-R est essentielle en vue de concevoir des ligands synthétiques de haute affinité pour cette lectine. Maintenant ces caractéristiques établies, voyons la mise au point des stratégies pour obtenir des **ligands multivalents efficacement reconnus par le récepteur hépatique**. Dans un but de vectorisation d'agent thérapeutique, il est également question de **spécificité** envers l'ASGP-R.

Le sujet étant très vaste et abondamment documenté, l'étude bibliographique proposée dans ce paragraphe est loin d'être exhaustive. Elle donne la philosophie générale d'une approche de ciblage efficace, spécifique et applicable *in vivo*.

Dans un premier temps, nous allons voir comment optimiser la liaison d'un sucre à un domaine de reconnaissance. Puis, nous allons présenter les critères chimiques permettant de concevoir des architectures adaptées à la reconnaissance de l'ASGP-R.

III.5.a - Modifications des sucres

Des **carbohydrates modifiés chimiquement sur les fonctions portées par les carbones 1 à 6** ont été synthétisés afin de renforcer l'efficacité et la sélectivité d'interaction, et ainsi obtenir des affinités supérieures aux ligands endogènes et un ciblage exclusif de la lectine d'intérêt. Il est à noter que les O glycosides et les S glycosides sont reconnus de façon similaire. Par contre, le remplacement de l'oxygène par un carbone diminue l'affinité pour la lectine (figure 38).¹⁴⁶

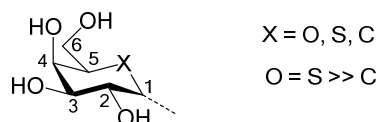


Figure 38 : Ordre d'affinité pour l'ASGP-R suivant le type de glycoside.

L'influence de diverses modifications chimiques sur les positions 1 à 6 a été abondamment étudié. En voici au préalable un bref récapitulatif :

- La **position 1** peut servir de point de rattachement du galactoside au reste de la molécule. Il est préférable que le substituant soit linéaire et peu encombré.
- Un acétamide en **position 2** augmente grandement l'affinité pour l'ASGP-R comparé au Gal. L'affinité peut encore être améliorée par l'introduction d'un trifluoroacétamide. Néanmoins il ne peut être remplacé par un groupement plus encombré, sauf dans certains cas où ce groupement est relié au sucre par un lien triazole.
- Il est primordial de conserver les fonctions hydroxyles aux **positions 3 et 4** : leur remplacement par d'autres fonctions diminue l'affinité de manière drastique.
- Enfin, le **CH₂ porté en C5** est requis. La **position 6** quant à elle tolère des substituents encombrés, et certains comme le triazole peuvent même renforcer l'interaction.

Comme nous l'avons vu, la **position anomérique** n'est pas impliquée dans la reconnaissance au même titre que les positions 2, 3 et 4 (tableau 8). Sur les ligands monosaccharidiques, elle n'a pas beaucoup d'influence lorsqu'elle porte un substituant linéaire de structure simple.^{146,170} Cependant, Lee *et al.* ont montré qu'un amide ou cyanure en γ de la position anomérique peut augmenter l'affinité d'un facteur 5 à 10.¹⁵⁵ Pour des substituants encombrés, une perte d'affinité est observée. Par exemple, l'affinité du dérivé GalNAc- β -Ph ρ OMe est 5 fois plus faible comparée au GalNAc ou au GalNAc- β -Me.¹⁷¹

Concernant la configuration anomérique, il est impossible de conclure, chaque cas est particulier. Il est néanmoins possible de souligner que d'après les informations obtenues par modélisation moléculaire, la configuration β semble être favorisée par rapport à la configuration α .^{172,173} En effet, une substitution du carbone anomérique en configuration β pointe vers le solvant alors qu'en configuration α elle pointe vers la protéine, ce qui peut engendrer une gêne stérique. Cette théorie est étayée par l'expérimentation. Par exemple, lors de plusieurs expériences différentes, le Gal- α -OMe a montré une affinité 1,6 fois plus faible que le Gal- β -OMe.^{146,173} Néanmoins, plusieurs études sont en désaccord avec cette hypothèse. D'après Wong *et al.*, le GalNAc- α -Oallyl possède un potentiel inhibiteur 1,7 fois supérieur au GalNAc- β -Oallyl, montrant que le dérivé en α est meilleur que celui en β .¹⁷⁴ Ceci a été confirmé par Sarkar *et al.* pour le GalNAc- α/β -Me.¹⁵³

Quoi qu'il en soit, l'influence du substituant et de la configuration anomérique en position 1 reste minime.¹⁷⁰

Tableau 8 : Exemples de modifications en positions 1 de galactosides et leur influence sur l'affinité.

Position 1						
Substituant	R1	R1'	R2	IC ₅₀ (mM)	rIC ₅₀	Ref.
Linéaire	Galactose			1.7	1	155
	H	SCH ₂ CN	OH	0.13	0.1	
	H	SCH ₂ C(NH)NH ₂	OH	0.3	0.2	
	H	SCH ₂ C(NH)NHCH ₂ CO ₂ H	OH	0.6	0.4	
				K _d (H1) (μM)	rK _d	
Encombré	OH	H	NHAc	40	1	171
	CH ₃	H	NHAc	41	1	
	Ph ρ OMe	H	NHAc	202	5	
				IC ₅₀ (mM)	rIC ₅₀	
α/β	OMe	H	OH	1.8	1	155,173
	H	OMe	OH	2.8	1,5	

IC₅₀ calculés par compétition avec I¹²⁵I-ASOR ($\approx 6.10^{-10}$ M) ; rIC₅₀ = IC₅₀ relatif ; K_d mesurés par résonance plasmonique de surface (SPR) avec immobilisation du domaine H1 sur surface.

L'effet du remplacement du groupement acétamide en position 2 du GalNAc a également été étudié (tableau 9). Le groupement propanamide ne change pas l'affinité par rapport à un acétamide, alors que des groupements plus encombrés comme le benzamide ou le phthalimide diminuent l'affinité de 4 à 40 fois.¹⁷⁴ Ce phénomène peut être attribué à un encombrement stérique, et pour le phthalimide à une intrusion d'un carbonyle vers la face α du sucre, déstabilisant ainsi l'interaction hydrophobe avec le Trp.

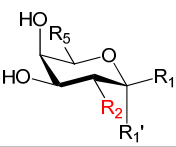
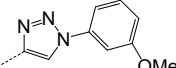
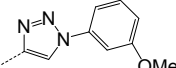
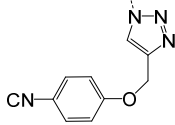
L'amélioration la plus probante d'affinité en position 2 a été apportée par le groupement **trifluoroacétamide**. Celui-ci augmente l'affinité de 3 à environ 50 fois par

rapport aux dérivés acétamides. Ceci a été confirmé par plusieurs études utilisant des techniques différentes.^{171,174}

Certaines études récentes se sont penchées sur l'apport d'une fonctionnalisation par un triazole ; les résultats sont variables. Le lien triazole en position 2 permet d'introduire des substituants encombrés sans diminuer l'affinité. De manière générale, si l'affinité peut être légèrement augmentée de 1 à 5 fois avec des dérivés triazole substitués par de gros groupements polaires, elle reste néanmoins équivalente au groupement acétamide.^{171,173}

A l'inverse, un groupement azoture en position 2 n'est pas aussi bien toléré à cause de la perte du contact hydrophobe avec l'His256, avec une affinité 14 fois inférieure à celle du GalNAc.¹⁷³

Tableau 9 : Exemples de modifications en positions 2 de galactosides et leurs impacts sur l'affinité.

Position 2							
							
	R1	R1'	R2	R5	IC ₅₀ (mM)	rIC ₅₀	Ref.
Dérivés d'acétamide	OCH ₂ CH ₂ OH	H	NHAc	CH ₂ OH	0.2	1	¹⁷⁴
	OCH ₂ CH ₂ OH	H	NHCOEt	CH ₂ OH	0.2	1	
	OCH ₂ CH ₂ OH	H	NHBz	CH ₂ OH	0.8	4	
	OCH ₂ CH ₂ OH	H	NPhth	CH ₂ OH	8	40	
					K _d (H1) (μM)	rK _d	
Trifluoro-acétamide	CH ₃	H	NHAc	CH ₂ OH	41	1	¹⁷¹
	CH ₃	H	NHCOCF ₃	CH ₂ OH	14.8	0,4	
	OMePh	H	NHAc	CH ₂ OH	202	1'	
	OMePh	H	NHCOCF ₃	CH ₂ OH	9.8	0,05'	
	H	OCH ₂ CH(OH)CH ₂ NHBn	NHAc		66.2	1''	
	H	OCH ₂ CH(OH)CH ₂ NHBn	NHCOCF ₃		1.2	0,02''	
						rIC ₅₀	
Lien triazole	OH	H	NHAc			1	¹⁷³
	H	H	N3			13.7	
	H	H					0.5

IC₅₀ calculés par compétition avec l'¹²⁵I-ASOR ; rIC₅₀ = IC₅₀ relatif ; K_d mesurés par SPR avec immobilisation du domaine H1.

L'importance capitale des **hydroxyles en position 3 et 4** a déjà été largement exposée. Il est simplement à noter que la substitution des hydroxyles par des fluors ou des éthers comme la fonction OMe conduit à une perte considérable, voire totale de l'affinité pour la lectine.¹⁷⁴

Enfin, l'importance de l'alcool primaire porté en **position 5** est avérée : son absence entraîne une perte d'affinité d'un facteur 10 environ.¹⁵⁵ Par ailleurs, la présence d'un éther, d'un azoture ou d'un triazole en **position 6** augmente légèrement l'affinité d'un facteur 3 environ.^{171,174} Comme nous l'avons vu, un groupement chargé diminue cependant l'affinité.

En conclusion, la **modification de la position 2 est la plus efficace** pour augmenter l'affinité de reconnaissance monovalente. C'est également celle pour laquelle les résultats obtenus au cours des différentes études sont les plus unanimes. La substitution de la position 6 et le greffage du sucre sur la molécule porteuse en position 1 avec une chaîne linéaire peu encombrée semblent également de bonnes stratégies, même si les effets de telles modifications chimiques sont moins prévisibles (figure 39).

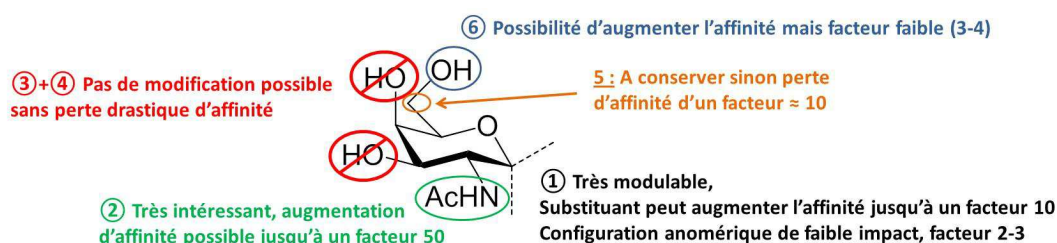


Figure 39 : Schéma récapitulatif des modifications chimiques possibles pour augmenter l'affinité et la sélectivité de la reconnaissance monovalente.

L'affinité de la lectine ASGP-R pour son ligand ne dépend pas seulement de l'affinité de liaison du sucre avec un domaine de reconnaissance. Elle est majoritairement fonction de la présentation multivalente des galactosides et de la structure de la molécule porteuse. Voyons maintenant comment concevoir un ligand de géométrie adaptée à celle de la lectine pour présenter ces monosaccharides.

III.5.b - Conception de ligands multivalents

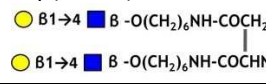
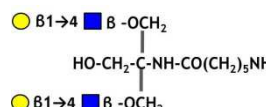
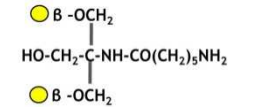
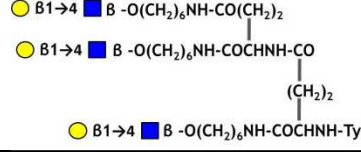
A l'image de toutes les lectines, l'affinité de l'ASGP-R pour ses ligands dépend fortement de leur **valence et de leur géométrie**. De la même manière que pour les asialoglycoprotéines, l'affinité augmente avec le nombre de Gal portés par les ligands synthétiques.^{146,154} Nous avons vu que la densité de galactosides n'est pas le seul paramètre important. En effet, la géométrie de présentation des sucres détermine l'affinité pour la lectine.¹⁷⁵



Des ligands de nature totalement synthétique et non plus oligosaccharidiques ont été développés par Lee *et al.* (tableau 10).¹⁷⁶ Ils peuvent être désignés par le terme glycoconjugués, qui regroupe les composés comportant un ou plusieurs carbohydrates attachés de manière covalente à une molécule d'une autre nature, comme des peptides, des lipides, ou des plateforme synthétiques.¹⁷⁷ Les glycoconjugués obtenus par Lee *et al.* ont une distance inter-sucres d'environ 30 Å. Les ligands synthétiques portant trois GalNAc présentent de fortes affinités pour l'ASGP-R, similaires aux oligosaccharides. Ils sont donc de bonnes alternatives aux mimes des glycoprotéines présentés précédemment.

La comparaison des différents ligands en fonction des **distances entre leurs Gal** souligne qu'à valence identique, de courtes distances entraînent de faibles affinités (tableau 10). De plus, cette comparaison montre que la distance entre les sucres n'est pas le seul critère d'affinité : **la flexibilité** intervient également. Par exemple, pour les ligands

bivalents, bis-Lac-AHT a une affinité 30 fois inférieure à celle du Asp(LacAH)₂ parce que ce dernier est plus flexible. A l'inverse, sur les ligands trivalents, Tyr-Glu-Glu-(LacAH)₃ est le plus flexible alors que l'oligosaccharide NONA I possède la meilleure affinité (tableau 7). Comme mentionné précédemment, il s'agit donc de trouver le meilleur compromis.

Tableau 10 : Valeurs d'IC₅₀ obtenues par compétitions avec l'¹²⁵I-ASOR (1 µg / 0,5 mL) sur hépatocytes (rat/lapin). D'après Lee *et al.*, *Biochemistry*, 1984, 23, 4255.¹⁶⁷

ligand	Valence	Max Gal-Gal distance (Å)	IC ₅₀ (µM)
Asp(LacAH) ₂ 	2	28	0.3
Bis-Lac-AHT 	2	17	9
Bis-Gal-AHT 	2	9	87
Tyr-Glu-Glu-(LacAH) ₃ 	3	33 ; 41 ; 43	0,05
NONA I (oligosaccharide de référence)	3	15 ; 22 ; 25	0,007

Légende :  Gal  GlcNAc

En s'inspirant de ces travaux, Biessen *et al.* ont développé des glycodendrimères de première génération composés d'unités trimériques de forte affinité pour l'ASGP-R. L'affinité de tels ligands est fortement dépendante de la distance entre les sucres et le point de branchement sur la molécule porteuse : elle augmente significativement avec la longueur des bras espaceurs. Une molécule trimérique avec des bras espaceurs flexibles de type poly-éthylène glycol (PEG) de 20 Å avec des distances entre les Gal de 32 Å conduit à une affinité 2000 fois supérieure à celle d'un ligand dont les bras espaceurs sont de 4 Å (figure 40).^{178,179} De plus, l'affinité est multipliée par 50 lors du remplacement des Gal par des GalNAc.¹⁸⁰

Enfin, la **taille du ligand** est également un critère structural de ciblage des ASGP-R. Partant de l'observation qu'*in vivo* les particules de plus de 90 nm de diamètre ne sont pas assimilées par les hépatocytes, Biessen *et al.* ont déterminé la taille limite de particule pour une reconnaissance efficace des ASGP-R.¹⁸⁰ Celle-ci doit être inférieure ou égale à 70 nm. Cette restriction de taille serait due à la taille limite des endosomes lors d'internalisations dépendantes des clathrines et non à la fenestration des vaisseaux sinusoides, qui est d'environ 100 nm.

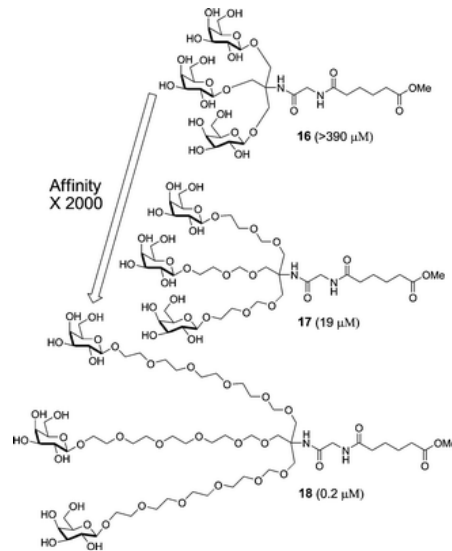


Figure 40 : Ligands trimériques conçus par Biessen *et al.*, avec des bras espaceurs flexibles de type PEG ; affinité mesurée par compétition avec l'¹²⁵I-ASOR de 0,5 à 20 nM. Reproduit d'après Deniaud *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 966.^{179,181}

Ces structures trimériques ont été reprises par Khorev *et al.* Elles conduisent à une vectorisation efficace et sélective des ASGP-R.^{87,126,182}

Quelques exemples de systèmes multivalents sont présentés dans la section ci-après portant sur les applications thérapeutiques des tels ligands.

III.5.c - Sélectivité par rapport à d'autres lectines

Dans le cadre de la vectorisation de médicaments, la conception de ligand de forte affinité pour la lectine ASGP-R n'a de sens que si une **spécificité de ciblage** toute aussi élevée est atteinte. L'augmentation de spécificité d'un ligand repose sur le même principe que l'augmentation d'affinité ; elle implique les paramètres de reconnaissance monovalente et multivalente spécifiques de la lectine.

Les galactosides sont également reconnus par la grande famille des galectines et plusieurs lectines de type C.¹⁸³ Voici quelques de lectines les plus susceptibles de reconnaître les ligands des ASGP-R.

Récepteur au galactose des cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont des macrophages exclusivement présents dans le foie. Elles expriment une lectine qui reconnaît les Gal, GalNAc et Fuc, avec une affinité moindre pour ce dernier. Cette lectine lie des ligands similaires à ceux de l'ASGP-R mais de manière moins sélective.¹⁸⁴

Plusieurs paramètres influencent une reconnaissance préférentielle par l'ASGP-R ou le récepteur des cellules de Kupffer. Ceci a été illustré par Biessen *et al.* dont les travaux sur la vectorisation de liposomes vers l'ASGP-R ont été introduits précédemment. Les paramètres mis en avant par Biessen *et al.* pour promouvoir la sélectivité vers les hépatocytes sont la nature et la densité de sucres, la longueur des bras espaceurs et enfin la taille de la particule.

Sur des ligands trivalents galactosylés, des bras espaceurs courts de 4 Å favorisent leur internalisation par les cellules de Kupffer, comparé à ceux de 20 Å qui induisent une

reconnaissance efficace par l'ASGP-R. **L'augmentation de la longueur des bras espaceurs augmente donc également la spécificité de reconnaissance.**¹⁷⁹ Par ailleurs, une densité de surface en Gal trop importante sur ces ligands de type liposomes entraîne une perte de sélectivité, en favorisant la reconnaissance par les cellules de Kupffer.¹⁸⁵ Ceci peut être évité par la **substitution des Gal par des GalNAc**, qui conduit à une très forte augmentation de la spécificité envers l'ASGP-R ; les liposomes portant des GalNAc sont beaucoup moins efficacement reconnus par les cellules de Kupffer même à de fortes densités de sucre.^{180,186} Enfin, les cellules de Kupffer sont capables d'internaliser de grosses particules, comme des érythrocytes désialylés, ou des liposomes lactosylés. Leur affinité pour les particules augmente avec la taille de ces dernières jusqu'à atteindre un maximum pour 15 nm. De **petites particules** sont donc préférables pour cibler les ASGP-R.¹⁸⁰

Récepteur au galactose des macrophages : MGL

La « *Macrophage galactose lectin* » ou MGL est un récepteur à Gal situé sur les macrophages.¹⁸⁷ La MGL et l'ASGP-R sont fortement homologues ; la principale différence est une insertion de 24 résidus sur la région d'oligomérisation de la MGL, et sa formation d'homotrimères à la surface des cellules.¹⁸⁸ Cette insertion est à l'origine d'une flexibilité et un éloignement entre les domaines de reconnaissance accrues par rapport à l'ASGP-R. La MGL est également moins abondamment exprimée à la membrane plasmique, avec environ 1000 récepteurs sur les macrophages contre 10^5 ASGP-R sur les hépatocytes.¹⁸⁹

Des études théoriques par RMN suggèrent une préférence de la MGL pour le GalNAc et plus précisément pour le glycopeptide MUC1, épitope présenté sur les cellules tumorales, dont les acides aminés avoisinant le sucre créent des contacts avec le site de reconnaissance.¹⁹⁰

D'un point de vue expérimental, la présence d'un **groupement en position 2 du galactoside semble diminuer l'affinité de liaison pour cette lectine**.¹⁴⁷ La MGL préfère le Gal, ou reconnaît le Gal et le GalNAc avec la même affinité, quelle que soit la densité de sucre.^{183,189} De plus, pour les différents ligands de Lee *et al.* présentés dans la partie précédente, aucune structure en particulier ne stabilise l'interaction multivalente comme observé avec l'ASGP-R.¹⁸⁹ La MGL lie préférentiellement des ligands avec des distances entre Gal plus grandes du fait de sa flexibilité supérieure à celle de l'ASGP-R. Par conséquent, l'utilisation de la géométrie de ligand proposée par Lee *et al.* est un bon moyen de cibler spécifiquement l'ASGP-R.

Le « Scavenger Receptor » SRLC

Le SRLC est exprimé sur cellules endothéliales, les macrophages et certaines cellules musculaires. Son domaine de reconnaissance est très homologue du domaine H1 de l'ASGP-R, mais son cou contient une région collagène supplémentaire.¹⁹¹ Ce récepteur lie plus sélectivement ASOR que les autres ASGP, et fait preuve d'une **forte spécificité pour le trisaccharide Lewis X** (Gal β 1-4(Fuc1-4)GlcNAc).^{115,183} Le Gal est reconnu avec plus d'affinité que le Fuc parce qu'il interagit avec le site principal de reconnaissance alors que le Fuc interagit avec le site secondaire. De plus, la présence de ce Fuc est requise pour une bonne affinité de liaison ;¹⁸³ elle est donc déconseillée pour le ciblage des ASGP-R.

Les galectines

Les galectines ne sont pas des lectines de type C, et elles ne sont pas capables d'internaliser leurs ligands par endocytose. Elles sont impliquées dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice.

Cette famille de lectines est composée de nombreux membres pour lesquels une partie du site de reconnaissance est très conservée. Elles reconnaissent le galactose et plus particulièrement des disaccharides, avec une nette préférence pour des ligands lactosylés.¹⁹² Contrairement à l'ASGP-R, la distance entre les Gal ne semble pas importante pour la reconnaissance.¹⁹³ Le pouvoir inhibiteur du GalNAc est faible sur les galectines, et leur affinité est minimale pour les clusters triantennes comparé aux lectines de type C.

La sélectivité envers l'ASGP-R est donc possible avec des ligand trivalents présentant des unités GalNAc séparés de 20 Å environ.¹⁹⁴

III.5.d - Applications pour la vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique ou diagnostique vers les ASGP-R

La vectorisation de macromolécules vers les lectines suscite un intérêt grandissant. Pour cela, une grande variété de ligands glycosylés multivalents a été conçue, avec des paramètres architecturaux optimisés pour de hautes affinités et sélectivités de reconnaissance.¹⁸¹

Les exemples de vectorisation vers la lectine ASGP-R dans un but thérapeutique ou diagnostique sont très nombreux. Nous ne traiterons ici que de quelques exemples parmi les plus prometteurs, et les plus proches de notre objectif lié à la maladie de Wilson.

La clairance du cholestérol

Une des nombreuses applications de la vectorisation vers l'ASGP-R est la clairance du cholestérol. Le cholestérol est un lipide qui possède de nombreuses fonctions dans l'organisme. C'est notamment un composant majeur des membranes cellulaires. Il est transporté dans le sang par des lipoprotéines, nommées « *Low Density Lipoprotein* » et « *High Density Lipoprotein* » (LDL/HDL). Le LDL distribue le cholestérol à l'organisme tandis que le HDL le ramène vers le foie où il est dégradé. Cependant, l'accumulation de cholestérol dans la circulation entraîne des problèmes vasculaires comme l'athérosclérose.¹⁹⁵ L'idée est donc de le vectoriser vers le foie pour son élimination, et plus précisément vers les cellules parenchymateuses parce que ce sont les seules cellules qui sont impliquées dans le processus de sécrétion par la bile. Comme évoqué précédemment, Biessen *et al.* ont conçu des molécules amphiphiles solubles dans l'eau. Celles-ci ont la capacité de s'auto-assembler spontanément en solution avec le LDL et le HDL en liposomes (figure 41). Ces molécules sont galactosylées et ont une géométrie trivalente optimisée qui leur permet d'être reconnues par l'ASGP-R. Injectées en intraveineuse sur des souris, elles ont une action hypocholestérolémique en induisant la clairance du cholestérol par les cellules hépatiques.^{186,195} Ces résultats très prometteurs attestent de l'efficacité *in vivo* des ligands triantennes présentés précédemment.

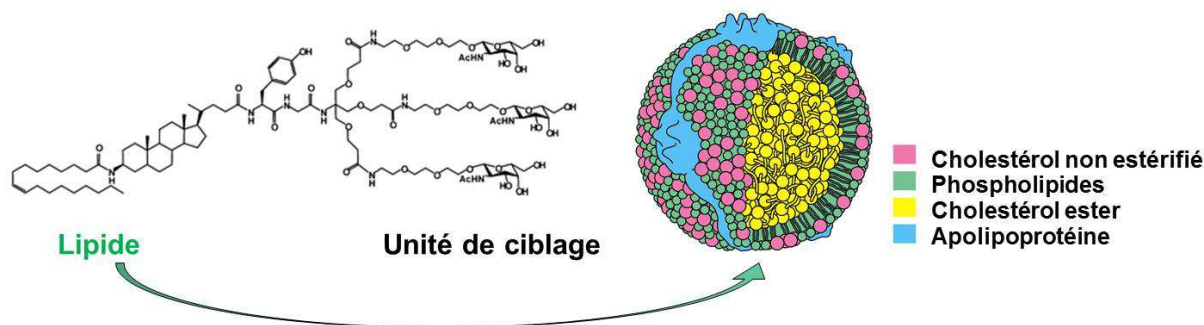


Figure 41 : Assemblage des liposomes ciblés vers les ASGP-R pour la clairance du cholestérol. La partie lipidique du système de ciblage¹⁸⁶ s'insère dans la couche phospholipidique du LDL représenté à droite¹⁹⁶ de manière à ce que l'unité de ciblage portant trois GalNAc soit exposée à la surface du liposome.

La vectorisation de gènes

La vectorisation de gènes est très étudiée. Elle peut permettre de palier à une déficience induite par une mutation, comme par exemple dans la maladie de Wilson, ou pour l'extinction d'un gène responsable d'une pathologie.

Plusieurs systèmes ont été développés pour la thérapie génique dirigée vers le foie, allant des vecteurs viraux aux vecteurs synthétiques dirigés vers les ASGP-R.¹⁹⁷ De nombreux modèles ont vu le jour sur les animaux mais des limitations dues à des réponses immunitaires ou une courte durée de l'effet thérapeutique restent à résoudre avant d'appliquer de telles thérapies à l'homme.

L'avantage de vecteurs synthétiques non viraux est leur faible immunogénicité. Leur principale limitation est la rétention de ces ligands dans les endosomes, qui conduit à leur dégradation et de faibles taux de transfection. Or, nous avons vu précédemment un exemple de vectorisation de gène vers ASGP-R développé par Fernández *et al.* pour lesquels la sortie des endosomes et le taux de transfection se sont révélés efficaces.⁹⁸ Cette vectorisation d'ARNm est réalisée au moyen de cyclodextrines polycationiques amphiphiles, fonctionnalisées de manière dendrimérique par des unités de ciblage galactosylées trivalentes (figure 42).

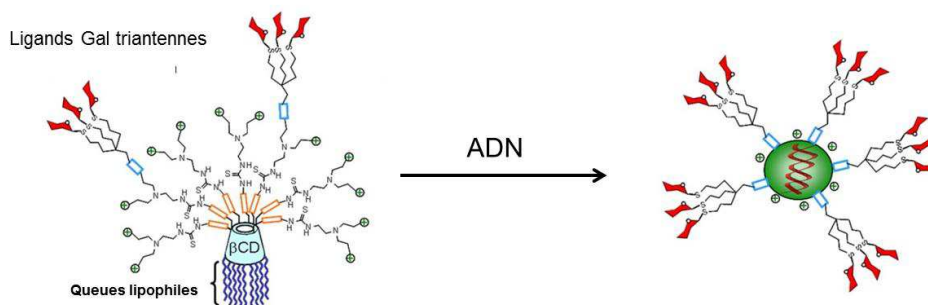


Figure 42 : Vectorisation de gènes par des cyclodextrines polycationiques amphiphiles. Reproduit d'après Symens *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2012, 23, 1276.

D'autres vecteurs synthétiques ont notamment été conçus en utilisant les ligands trivalents optimisés par Biessen *et al.*^{87,182} Ceux-ci ont montré leur capacité à vectoriser des siARN (« *small interfering RNA* ») dans les hépatocytes (figure 43 A). Ces siARN sont utilisés pour inhiber l'expression du gène codant pour la « transthyretine » (TTR), qui est produite

dans le foie. En cas de mutation, une formation aberrante de fibres entraîne des dépôts dans les tissus périphériques conduisant à des neuropathies et/ou cardiopathies. Une technique de conjugaison covalente avec le ligand glycosylé trivalent compatible avec la synthèse d'oligonucléotides a été développée. En administration sub-cutané, le système triantenne-oligonucléotide induit une robuste extinction de gènes spécifiquement dans le foie chez le rat, sans effets secondaires.

Ce système a été optimisé pour une synthèse d'oligonucléotide simplifiée, efficace et complètement automatisable. Des monomères monovalent portant des GalNAc ont été créés, et sont utilisable en synthèse supportée d'oligonucléotides (figure 43 B). L'assemblage de ces monomères reproduit l'orientation spatiale et la distance entre les sucres optimisés par Biessen *et al.* Ce système de vectorisation des siARN est aussi efficace *in vitro* et *in vivo* que celui précédemment présenté, bien que son affinité pour l'ASGP-R soit légèrement plus faible.¹⁹⁸

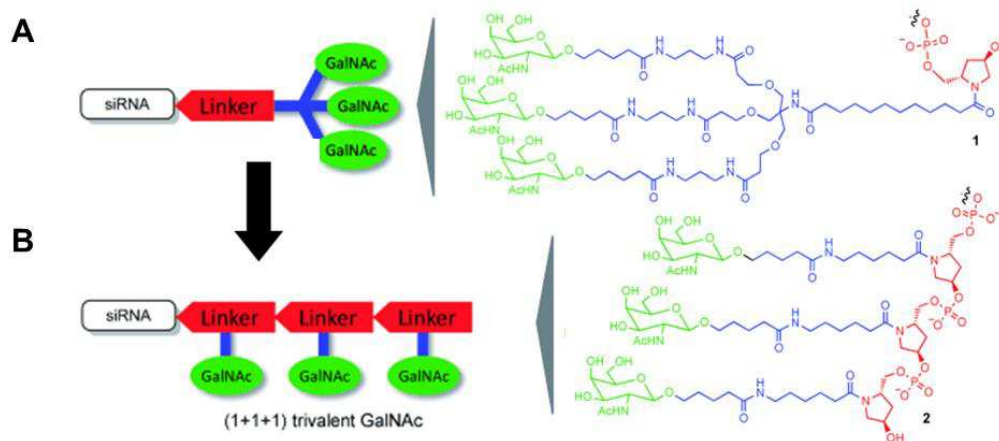


Figure 43 : Deux strategies de conception de ligand trivalent pour la vectorisation de siARN par des glycoconjugués siRNA-GalNAc : (A) le ligand triantenne portant des GalNAc dans une géométrie optimisée est attaché à l'oligonucléotide par un (3R,5S)-3-hydroxy-5-hydroxyméthylpyrrolidine (rouge) ; (B) assemblage séquentiel de GalNAc monovalents sur des chaînes adéquates (bleues). Ces ligands sont accrochés de manière covalente à l'extrémité 3' du brin sens (S) du siARN par liaison phosphodiester. Reproduit d'après Rajeev *et al.*, *Chem. Bio. Chem.*, 2015, 16, 903.

De nombreux autres systèmes sont employés pour la vectorisation de gène comme l'encapsulation dans des nanoparticules galactosylées, lactosylées ou encore la vectorisation par la protéine ASOR couplée à un polymère chargé PLL (polylysine).^{5,199,200}

La vectorisation d'agents thérapeutiques

Le carcinome hépatocellulaire et les hépatites sont des problèmes de santé majeurs.

L'agent chimiothérapeutique doxorubicine (DOXO) est très utilisé pour lutter contre les hépatocarcinomes mais sa toxicité ne permet pas de l'injecter à des doses suffisantes pour qu'il soit efficace. Sa vectorisation vers l'ASGP-R augmente son efficacité et protège des effets secondaires causés par l'accumulation dans des tissus non ciblés comme la moelle osseuse. Plusieurs systèmes de vectorisation ont été développés à partir du copolymère HMPA (*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) galactosylé (figure 44).^{201,202}

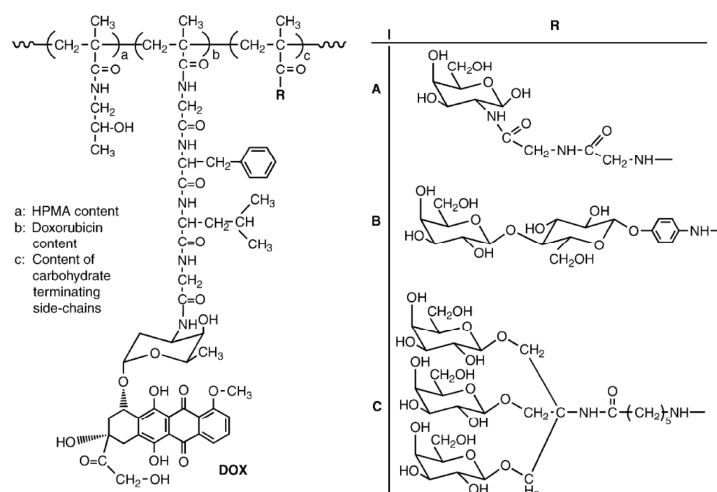


Figure 44 : Structure du copolymère HMPA-DOXO et les unités saccharidiques correspondantes (R). d'après David et al., *Eur. J. Cancer*, 2004, 40, 148.

L'un de ces systèmes, le composé PK2, est allé jusqu'en phase d'essai clinique II.⁹⁹ Cependant, ces systèmes n'ont pu être développés avec succès à cause de plusieurs limitations. En effet, le taux de fonctionnalisation du polymère par la DOXO et les Gal sont limités par des gênes stériques, ce qui en oblige l'administration de fortes concentrations de polymère et induit une toxicité. D'autre part, les tissus sains autour des tumeurs sont également touchés.

De nouvelles études se tournent vers l'utilisation de vecteurs à base d'albumine humaine lactosylée (L-HSA), qui a déjà fait ses preuves en traitement chronique chez des patients atteints d'hépatite B.^{203,204}

L'imagerie médicale

La vectorisation de ligands vers l'ASGP-R pour l'imagerie médicale sur l'homme est en plein essor. En effet, l'étude du taux d'expression d'ASGP-R permet d'évaluer l'état de fonctionnement du foie. Une diminution de ce taux d'expression révèle une faible prolifération des hépatocytes, et donc un foie en mauvais état, non fonctionnel.²⁰⁵ L'analyse clinique du niveau d'expression d'ASGP-R est accomplie par scintigraphie, à l'aide d'injections de technétium 99m couplé à l'albumine bovine galactosylée (^{99m}Tc-GSA), une glycoprotéine spécifiquement reconnu par l'ASGP-R.²⁰⁶ Cette technique de tomographie à émission de positrons est utilisée sur des patients ayant subi une chirurgie du foie afin d'estimer son fonctionnement post-opératoire. Elle a donné des résultats concluants et corrélés avec les techniques d'estimation utilisées jusqu'alors.^{207,208}

Des agents de contraste pour l'IRM vectorisés vers les ASGP-R pour l'imagerie du foie sont également en développemet.²⁰⁹

Pour aller à l'essentiel

La lectine ASGP-R est le récepteur le plus attrayant pour cibler les cellules hépatiques. Dans le but de concevoir des glycoconjugués sélectivement et efficacement reconnus par cette lectine, les paramètres structuraux les plus pertinents ont été sélectionnés.

*Concernant l'interaction monovalente de carbohydrates avec l'ASGP-R, il est unanime que le **GalNac** est reconnu de manière 50 fois plus efficace que le Gal, et apporte une sélectivité vis-à-vis d'autres lectines comme le récepteur des cellules de Kupffer ou les galectines. La modification de la fonction portée en position 2 du sucre est celle qui apporte les meilleures améliorations d'affinité et de sélectivité.*

*Une géométrie optimale a par ailleurs été définie et permet une très forte affinité et spécificité pour l'ASGP-R. Toutes les études s'accordent sur la préférence de valences suivante : **tétravalent** \approx **trivalent** \gg **bivalent** \gg **monovalent**. Les **bras espaceurs** reliant le sucre au reste de la molécule doivent être assez longs et **flexibles** pour permettre une interaction multivalente par effet cluster. La longueur optimale est d'environ **20 Å**, et une **distance entre les sucres d'environ 20 Å** également. Enfin, la **taille des ligands ne doit pas excéder 70 nm**.*

La vectorisation d'agents thérapeutiques par ce type de ligands a déjà fait ses preuves in vivo et est actuellement utilisée chez l'homme pour des applications telles que l'imagerie médicale.

IV - Approche appliquée à la maladie de Wilson

Des chélateurs efficaces et sélectifs du Cu(I) ont été conçus sur le modèle des métalloprotéines. Ils visent à piéger le Cu(I) au sein des hépatocytes pour détoxifier le foie des patients atteints de la maladie de Wilson. Deux familles de chélateurs ont été développées par Delangle *et al.* : les familles CP et T.

Nous avons vu que l'ASGP-R est une cible de choix pour vectoriser ces agents thérapeutiques vers les hépatocytes. Il peut être ciblé efficacement et sélectivement par des ligands tri- à tétravalents portant des GalNAc situés à environ 20 Å les uns des autres.

Les chélateurs optimisés présentés précédemment ont donc été fonctionnalisés par des unités de ciblage répondant aux préférences de la lectine. Voyons maintenant comment ont été adaptés les systèmes de ciblage à chacune des deux familles.

IV.1) Vectorisation d'un chélateur de la famille CP

La famille CP est composée de cyclodécapeptides, dont P¹ est le composé pour lequel le meilleur compromis a été trouvé entre organisation structurale de la plateforme peptidique et affinité ainsi que sélectivité pour le Cu(I).

IV.1.a - Une plateforme cyclodécapeptidique possédant deux faces régiosélectivement fonctionnalisables

Grâce au squelette cyclodécapeptidique de P¹, une structure bifonctionnelle régiosélectivement fonctionnalisée a été développée. Celle-ci utilise le châssis moléculaire élaboré par Mutter *et al.* et permet l'obtention d'un **système comportant deux faces indépendantes**.²¹⁰ Sur une face plusieurs ligands à propriété de ciblage biologique sont introduits sélectivement, et sur l'autre des unités fonctionnelles ou effectrices d'intérêt thérapeutique ou diagnostique (figure 45).²¹¹ L'avantage de ce type de plateforme est non seulement de répartir les fonctions sur deux faces distinctes, mais aussi et surtout de présenter les **unités de ciblage de manière multivalente**. Ceci renforce les interactions ligand-récepteur que l'on souhaite promouvoir pour la vectorisation vers les cellules hépatiques.

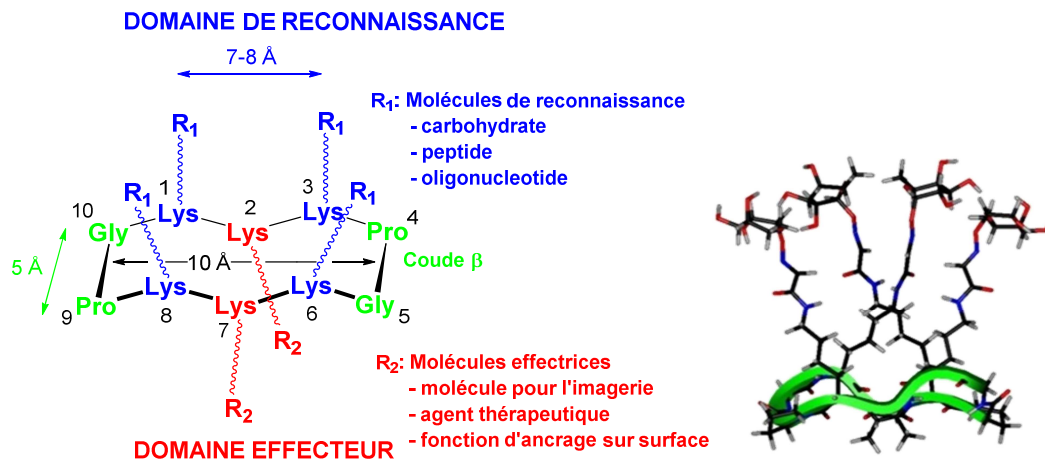


Figure 45 : Structure du cyclodécapeptide régiosélectivement fonctionnalisable utilisé au DCM.

Structure du cyclodécapeptide

Ce cyclodécapeptide forme une plateforme rigide et structurée, qui a été mise en évidence par RMN et diffraction des rayons X.^{212,213} Il possède deux coudes β (xPGx) qui contraignent sa conformation en feuillet β antiparallèles. De plus, la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les acides aminés en position 3-6 et 1-8 accentuent la rigidité du squelette (figure 45). Grâce à cette structuration, les chaînes latérales des acides aminés s'orientent de part et d'autre du plan moyen du cycle pour donner deux faces indépendantes et fonctionnalisables :

- les quatre chaînes latérales en position 1, 3, 6 et 8 s'orientent vers la partie supérieure dit « domaine de reconnaissance » (figure 45 en bleu)
- les deux chaînes latérales en position 2 et 7 s'orientent vers la partie inférieure dit « domaine effecteur » (figure 45 en rouge)

Le premier châssis cyclodécapeptidique contraint par deux coudes β a été élaboré par Mutter *et al.* afin de développer une plateforme capable de mimer les propriétés structurales de protéines naturelles : la plateforme TASP (« *Template Assembled Synthetic Peptide* »).²¹⁴⁻²¹⁶ En greffant des chaînes peptidiques sur les chaînes latérales des acides aminés de la plateforme, des mimes peptidiques de structure tertiaire sont obtenus (figure 46).²¹⁷

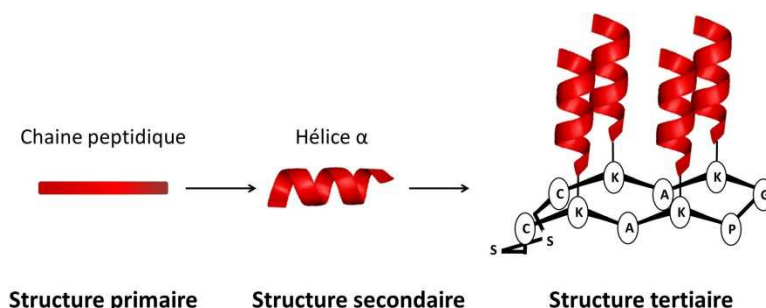


Figure 46 : Mime peptidique d'épitope sur plateforme TASP.²¹⁸

Ces mimes reproduisent les interactions entre des bio-molécules, en particulier dans le cadre de la recherche en immunologie. Par exemple, quatre séquences peptidiques en hélices α accrochées sur la plateforme ont montré leur capacité à mimer les caractéristiques

structurales d'un épitope. Ce mime peptidique ainsi que l'épitope natif sont reconnus par les mêmes anticorps, avec la même sélectivité.²¹⁸

La fonctionnalisation régiosélective du peptide TASP étant compliquée, des optimisations ont été réalisées afin de rendre les synthèses plus simples et versatiles.^{210,217} La mise en place d'une synthèse supportée du peptide linéaire autorise une large combinaison de groupements protecteurs sur les chaînes latérales des acides aminés. Ainsi, par un jeu de protections et déprotections orthogonales et l'utilisation de méthodes chimiosélectives, une **fonctionnalisation sélective des acides aminés** est dorénavant possible donnant la nouvelle plateforme représentée en figure 45. Ces nouvelles plateformes ouvrent la voie à de multiples applications, comme en témoignent les nombreux systèmes développés au DCM dont quelques-uns sont présentés ci-après.²¹¹

Applications thérapeutiques

Boturyn *et al.* proposent un système efficace de ciblage des cellules tumorales par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un récepteur transmembranaire surexprimé à la surface de cellules endothéliales à proximité des tumeurs. Cette intégrine a une forte affinité pour la séquence peptidique RGD (Arginine, Glutamine, Acide Aspartique). Boturyn *et al.* ont montré que la fonctionnalisation du cyclodécapeptide par des séquences RGD permet un endocytose sélective intégrine-dépendante dans les cellules tumorales.^{219,220} Les applications sont nombreuses, comme la confection d'outils diagnostiques pour l'imagerie des tumeurs, ou la mise au point de détection sur puces de cellules cancéreuses (figure 47).²²¹⁻²²³

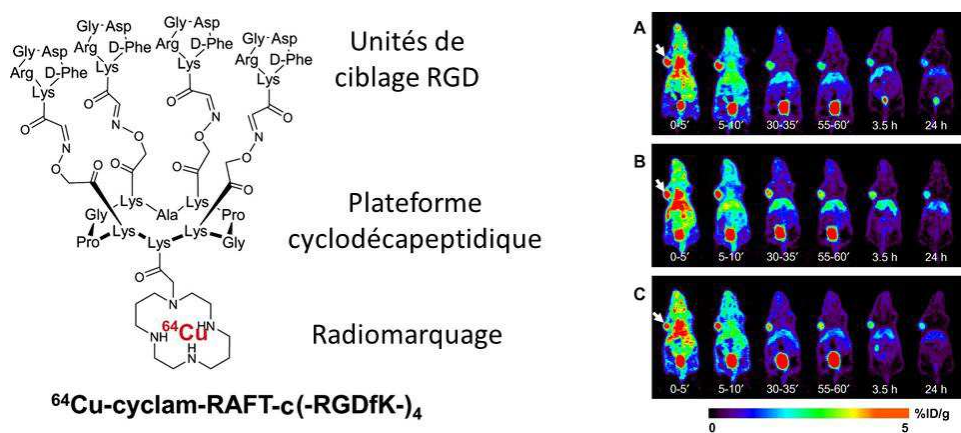


Figure 47 : Imagerie des tumeur *in vivo* réalisées à l'aide du système cyclodécapeptidique portant quatre motifs peptidiques RGD :²²¹ le $^{64}\text{Cu-cyclam-RAFT-c}(-\text{RGDfK})_4$ (à gauche). Sur les clichés à droite (A-C) : images PET d'un lot de souris U87MG portant une tumeur montrant l'assimilation du $^{64}\text{Cu-cyclam-RAFT-c}(-\text{RGDfK})_4$ dans la tumeur (signalée par une flèche). Remarque : le point rouge brillant près de la queue correspond aux reins. Reproduit d'après Jin *et al.*, *Eur. Pharm. Biopharm.*, 2014, 86, 478.

Ainsi, la visualisation des tumeurs par ce système couplé à un fluorophore a été commercialisé sous le nom d'AngiostampTM et sert de guide au geste chirurgical pour l'excision de tumeur.²²⁴ Les tests précliniques étant concluants, les essais sur l'Homme sont prévus courant 2015. Enfin, la vectorisation de molécules anti-cancéreuses est également envisagée.

Les propriétés de reconnaissance par des lectines de ce type de présentation multivalente ont également été étudiées avec différents sucres.²²⁵⁻²²⁷ Par exemple, les lectines végétale de type C « *peanut agglutinin* » (PNA), et la concavaline A (ConA), ainsi que la lectine d'invertébré « *helix promatia lectin* » (HPA) lient sélectivement et avec de fortes affinités ces ligands tétravalents fonctionnalisés respectivement par des galactosides pour les deux premières, et mannosides.

Ces différents exemples montrent que la plateforme cyclodécapeptidique est un outil puissant pour concevoir des biomolécules multifonctionnelles d'intérêts biologiques. Son caractère hautement modulable rend son utilisation adaptable à de nombreuses problématiques, dont le ciblage de lectines.^{225,227} De plus elle est **stable *in vivo*, non toxique ou peu immunogène et a fait ses preuves en tests précliniques** ; elle peut donc entrer dans l'élaboration de candidats médicaments.

Nous avons vu que les GalNAc sont des sucres très efficacement reconnus par l'ASGP-R. De ce fait, un cluster de GalNAc développé au DCM et ciblant les lectines présenté ci-dessus a servi de point de départ à l'élaboration d'un glycoconjugué bi-fonctionnel pour la chélation du cuivre dans les hépatocytes.

IV.1.b -Chel1 : un pro-chélateur du cuivre ciblé vers les hépatocytes

Afin de vectoriser l'unité pro-chélatrice P¹, quatre lysines sont introduites sur la face supérieure de ce cyclodécapeptide. Les chaînes latérales de ces acides aminés sont fonctionnalisées par **quatre unités GalNAc en configuration α** . Ces carbohydrates présentés de manière multivalente ciblent les cellules hépatiques grâce à leur reconnaissance par la lectine ASGP-R. Le glycoconjugué **Chel1** a été obtenu avec les carbones en position anomérique de configuration α (figure 48).

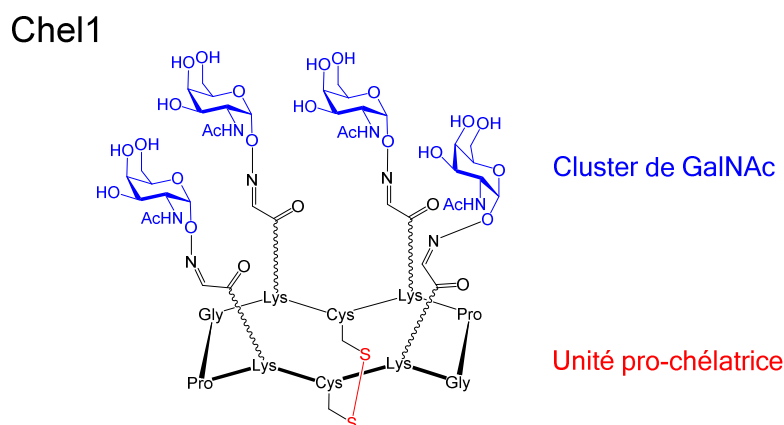


Figure 48 : Structure du glycoconjugué Chel1, pro-chélateur du Cu(I) vectorisé vers les cellules hépatiques.

Les distances entre les sucres et la flexibilité des bras espaceurs de Chel1 correspondent aux exigences géométriques de la lectine. Les distances entre les sucres sont évaluées à **20 Å en moyenne** (figure 49).

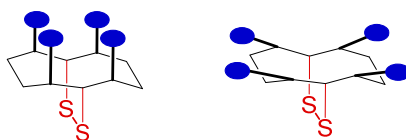


Figure 49 : Flexibilité de présentation des sucres sur la face supérieure du cyclodécapeptide.

De manière à ne piéger le cuivre qu'après l'entrée dans les cellules hépatiques, les thiols des deux cystéines sont oxydés en pont disulfures (figure 48). Ils sont libérés après leur entrée dans la cellule, dans le cytoplasme qui est un milieu réducteur (figure 50). Le **pro-chélateur Chel1** peut ainsi être considéré comme une pro-drogue.

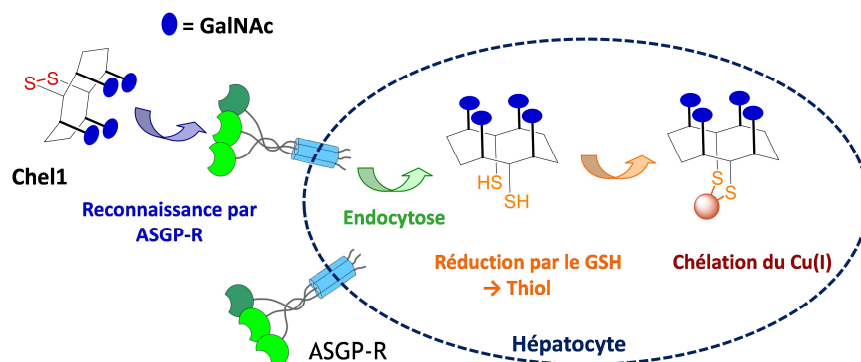


Figure 50 : Mécanisme d'action de Chel1 sur les cellules hépatiques.

L'utilisation de ponts disulfures coupés dans le milieu intracellulaire est fréquente pour la conception de pro-drogues et de chimio-senseurs.²²⁸ Les ponts disulfures sont réduits dans le cytoplasme en présence de GSH en concentration de 1 à 10 mM. Leur intégrité dans les fluides extracellulaires est assurée par une faible concentration en réducteur, de l'ordre de 20 à 40 μ M.

La stabilité *in vivo* de tels ponts disulfures et leur capacité à être réduit dans le milieu intracellulaire ont déjà été montrés, notamment dans le cadre de l'imagerie de tumeur présentée précédemment. Un cyclodécapeptide fonctionnalisé par quatre RGD et d'une sonde fluorescente activable a permis l'observation de tumeurs chez les souris. Sa sonde activable est composée d'un fluorophore, la Cyanine 5 (Cy5), reliée par pont disulfure à un « *quencheur* » (ou extincteur) de fluorescence. Ainsi, la fluorescence de la sonde n'est activée qu'après l'entrée dans la cellule ciblée, lors de la rupture du pont disulfure qui dissocie la Cy5 de son « extincteur ».²²⁹

Un chimio-senseurs du stress oxydant sélectivement délivré par l'ASGP-R dans les cellules hépatiques humaines a également été développé (figure 51).²³⁰ Il souligne la faisabilité du système de pro-drogue, mais pointe également du doigt le problème du stress oxydant. En effet, en cas de stress oxydant élevé qui peut être induit par un large excès de cuivre, la balance GSH/GSSG est rompue. Il n'y a donc plus assez de GSH dans le cytoplasme pour réduire les ponts disulfures. Par conséquent, les pro-chélateurs de Cu doivent être administrés dans le foie avant que les surcharges en Cu ne soient trop élevées.

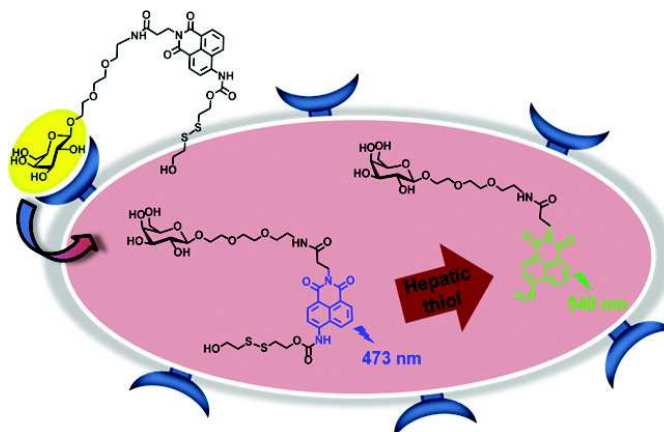


Figure 51 : Chimio-senseur du stress oxydant intra-hépatocytaire. Cette molécule est internalisée dans les hépatocytes grâce à une endocytose ASGP-R-dépendante. Puis, en conditions normales, le pont disulfure est brisé et la fluorescence du groupement naphthalimide a un maximum d'émission à 540 nm. En condition de stress oxydant, le pont disulfure n'est pas rompu et le maximum d'émission du naphthalimide est de 473 nm. D'après Lee *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 1316.

IV.1.c - Propriétés cellulaires de Chel1

La **capacité de Chel1 à être internalisé dans les hépatocytes** a été vérifiée sur les cellules hépatiques HepG2 et WIF-B9 polarisées. Ces cellules WIF-B9 ont la particularité de former un épithélium organisé en quelques jours, avec des canalicules biliaires analogues à ceux présents dans le foie pour les mécanismes d'excrétion vers la bile.

Après marquage de Chel1 avec le fluorophore TRITC, les images obtenues par microscopie de fluorescence montrent que le glycoconjugué est bien internalisé dans les cellules.¹³ De plus, après 2h, la fluorescence se rassemble dans les canalicules biliaires, signalant un mécanisme d'excrétion.

Les propriétés de chélation du cuivre *in vitro* et *in cellulo* de Chel1 ont été évaluées.¹³

Il a été établi que Chel1 sous sa forme oxydée n'est pas un agent complexant du Cu. Cependant, une fois réduit en présence de GSH, le nouveau système élaboré **conserve la forte affinité et sélectivité *in vitro* pour le Cu(I) observée pour P¹**, avec une constante de dissociation K_d d'environ 10^{-16} à pH 7,4.¹³

Sa **capacité à piéger le Cu intracellulaire** a été étudiée sur cellules hépatiques WIF-B9.¹³ La concentration intracellulaire en Cu est estimée grâce à la localisation de la protéine ATP7B, servant de sonde du Cu. En effet, comme nous l'avons vu dans la description de l'homéostasie du Cu, l'ATP7B est localisée dans le Golgi en condition normale en Cu et migre à la membrane des canalicules en cas de surcharge afin de promouvoir son excrétion. Le marquage fluorescent de l'ATP7B ainsi que celui des canalicules permet d'évaluer le taux de Cu intracellulaire par co-localisation des fluorescences. Ainsi, pour des cellules en condition d'excès de Cu, les fluorescences du marqueur de l'ATP7B et de celui des canalicules se superposent. De cette manière, il a été montré que Chel1 est capable de diminuer le taux de cuivre à l'intérieur des cellules hépatiques (figure 52). Lorsque ce glycoconjugué est introduit sur des cellules hépatiques WIF-B9 surchargées en Cu, il induit le retour de l'ATP7B de la membrane des canalicules biliaires vers la membrane du Golgi.

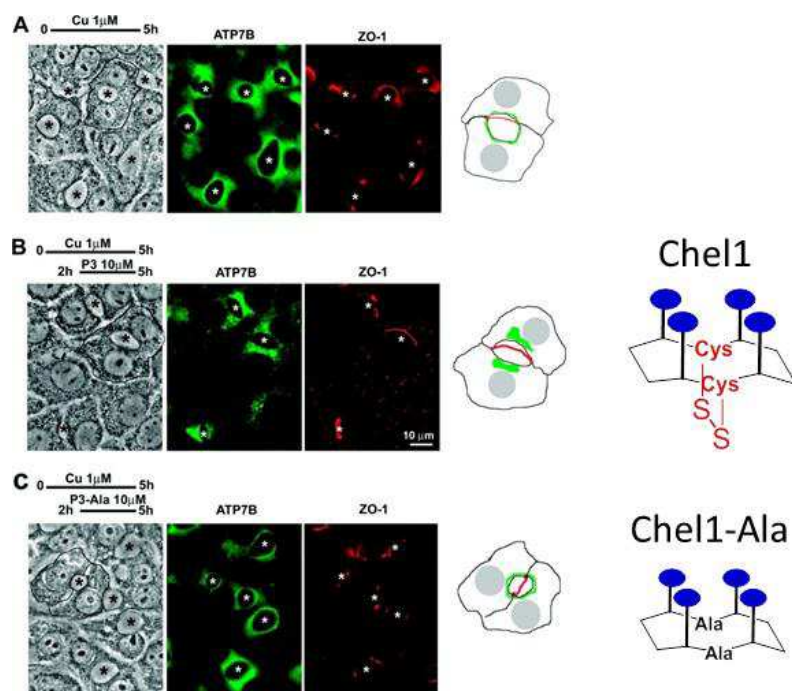


Figure 52 : Localisation de l'ATP7B dans les cellules WIF-B9 ; effet de Chel1, ici appelé P3. L'ATP7B et ZO-1, marqueur des jonctions serrées à la membrane des canalicules, ont été localisés par immunofluorescence indirecte. Les images ont été acquises par microscopie confocale. Les cellules WIF-B9 ont été incubées en présence de 1 μ M de Cu pendant 5 h (A,B,C) puis 10 μ M de Chel1 (B) ou de Chel1-Ala (substitution des alanines par des Cys) (C) ont été ajoutés après 2 h et pour une durée de 3h. L'image en contraste de phase (panel de gauche) permet la visualisation directe des canalicules biliaires indiqués par des astérisques. La localisation de ZO-1 permet la visualisation des jonctions serrées scellant les canalicules. L'ATP7B est répartie différemment sur B, comparé à A et C, comme cela a été représenté schématiquement sur le panel de droite sur un doublet de cellules WIF-B9 formant un canalicule biliaire (ce doublet schématisé est souligné par une fine ligne noire sur les images en contraste de phase correspondantes). D'après Pujol *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 286.

IV.2) Vectorisation de chélateurs de la famille T

Au sein de la famille T, deux chélateurs ont été sélectionnés : L² portant trois Cys et L⁵ portant trois D-Pen. Voyons maintenant comment les vectoriser vers l'ASGP-R.

IV.2.a - Introductions d'unités de ciblage sur L² et L⁴

Comme nous l'avons vu, des systèmes de ciblage des ASGP-R portant trois GalNAc dans une géométrie optimale ont été conçus.^{126,178,186} Ces derniers sont composés de bras espaceurs de type poly-éthylène glycol (PEG) branchés sur un point d'ancrage tel que le 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS). Delangle *et al.* ont donc adapté ces systèmes de ciblage aux tripodes L² et L⁵ précédemment présentés.

Il s'avère que la géométrie des tripodes L² et L⁵ dérivés du NTA satisfait à la géométrie triangulaire nécessaire au bon ciblage des ASGP-R. Des unités de **ciblages portant des GalNAc** sont introduites sur chacun des trois bras des tripodes, et une **distance entre les sucres de 20 Å** est obtenue grâce à des espaceurs flexibles de longueurs adéquates (figure 53).

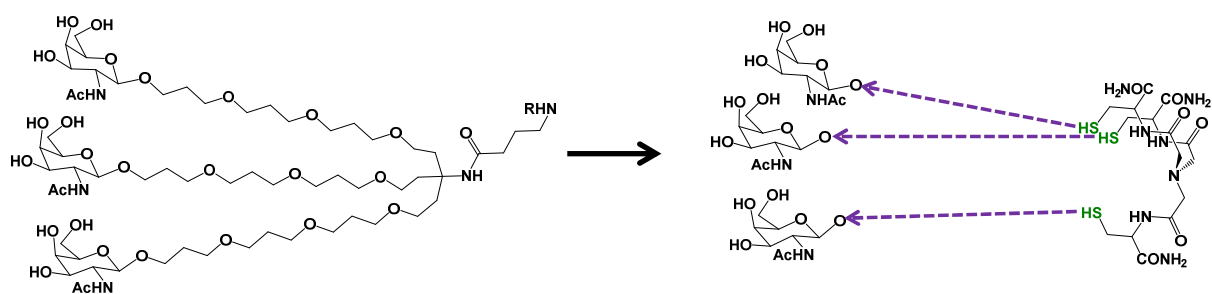


Figure 53 : Insertion d'un système de ciblage des ASGP-R optimisé sur la famille T. A droite le ligand trivalent possédant le point d'ancrage TRIS ;¹²⁶ à gauche l'adaptation de cette géométrie de ligand au chélateur L².

Pour réaliser de tels ligands trivalents, l'azote apical du NTA est utilisé comme point d'ancrage, et les sucres sont introduits sur les fonctions thiol des Cys par l'intermédiaire d'espaceurs PEG. Ces bras espaceurs PEG ont l'avantage d'être flexibles, stables et biocompatibles.²³¹ Ils sont faiblement immunogènes et permettent l'obtention de molécules « furtives ». Ils sont très utilisés dans la conception de médicaments, comme en témoignent les exemples cités tout au long de ce chapitre. Ces espaceurs sont introduits en position 1 des GalNAc avec une configuration anomérique β , qui comme nous l'avons vu semble la plus favorable pour l'interaction avec le site de reconnaissance de l'ASGP-R.

La distance entre l'azote apical du NTA et les thiols des Cys est estimée à environ 7-8 Å. De ce fait, le bras 2[(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol] (PEG) d'environ 11-12 Å a été choisi pour le greffage des sucres. Il en résulte une distance totale de l'azote aux sucres d'environ 20 Å.

L'introduction des unités PEG-GalNAc sur les tripodes s'effectue par des ponts disulfures sur les Cys. Ainsi, **deux pro-chélateurs Chel2 et Chel4 sont obtenus** (figure 54).

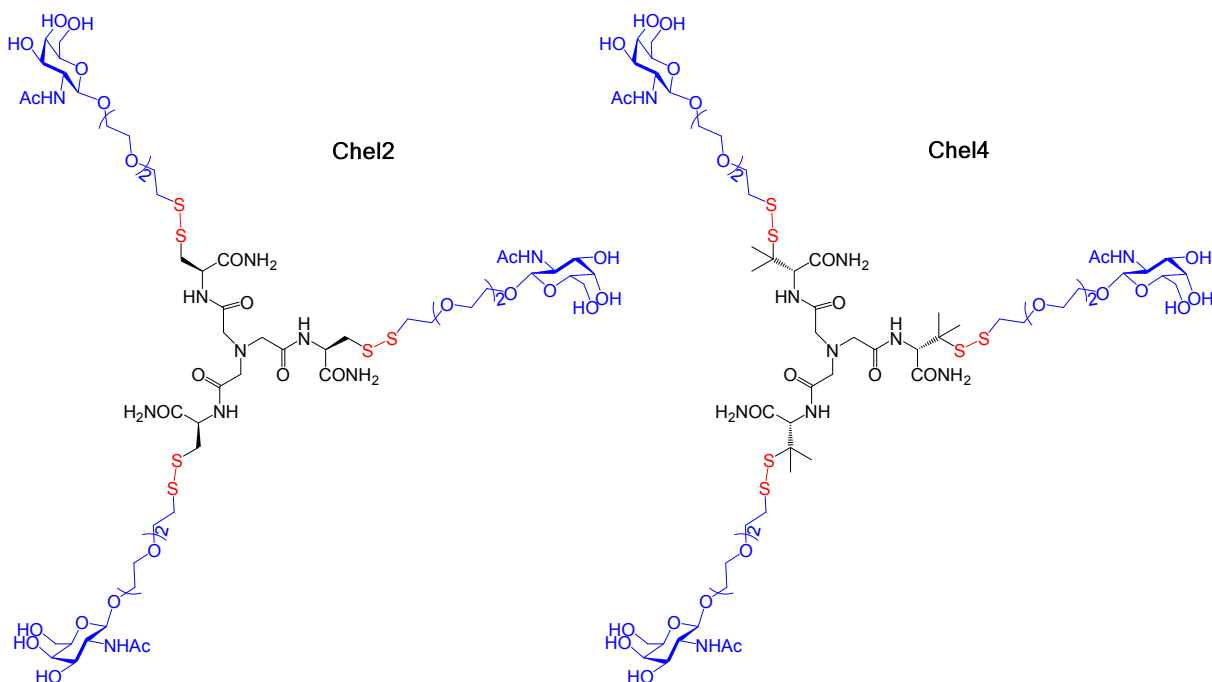


Figure 54 : Glycoconjugués de la famille T issus de L² et L⁵ : Chel2 et Chel4.

Ces deux molécules sont des pro-drogues. Les fonctions thiols masquées en pont disulfure ne sont pas capables de piéger le Cu dans le milieu extracellulaire. Puis, après l'endocytose dans les hépatocytes par l'ASGP-R, les ponts disulfures sont réduits, libérant les unités chélatrices L² et L⁵ (figure 55). A la différence de Chel1, les unités de ciblage sont ici décrochées de l'unité chélatrice qui les porte.

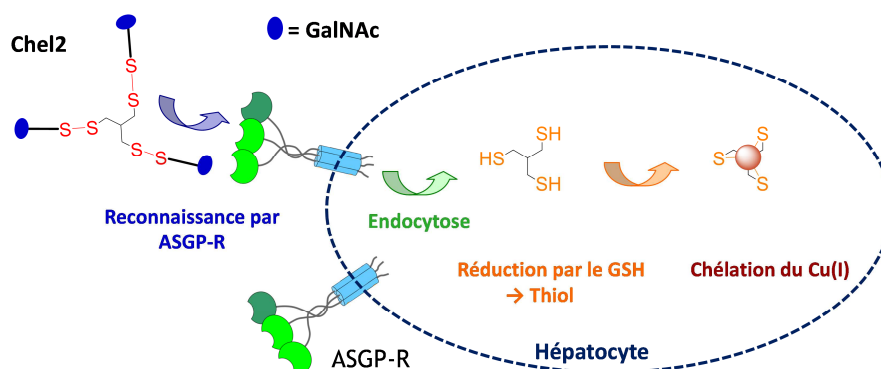


Figure 55 : Mécanisme d'action de Chel2 sur les cellules hépatiques.

La capacité de Chel2 à entrer sélectivement dans les cellules hépatiques a été vérifiée.¹² Pour cela, Chel2 a été marqué par le fluorophore TAMRA et introduit sur trois types cellulaires :

- les HepG2 et les WIF-B9 exprimant l'ASGP-R.
- les HeLa, qui sont des cellules humaines endothéliales n'exprimant pas cette lectine.

Les images de microscopie de fluorescence obtenues montrent que Chel2 est internalisé dans les cellules hépatiques mais pas dans les cellules endothéliales. Ceci laisse entendre que **Chel2 est donc internalisé sélectivement dans les cellules hépatiques grâce à l'ASGP-R**. Comme avec Chel1, la fluorescence se rassemble dans les canalicules après 2h d'incubation.

Dans le but de comparer l'efficacité d'un chélateur aux unités de ciblage détachables du chélateur en milieu intracellulaire par rapport à des unités de ciblages permanentes, le dérivé **Chel3** a été synthétisé (figure 56). Il est composé de l'unité chélatrice L² sur laquelle les **unités de ciblage sont introduites par lien amide**, sur les fonctions amides adjacentes aux thiols des Cys. Les thiols sont quant à eux masqués sous forme de pont disulfures avec des fonctions thio-ter butyls, afin de conserver la propriété de pro-drogue.

Enfin, l'influence du type de glycosylation en position anomérique a été également étudié. Des unités de ciblage différentes ont été réalisées, avec **l'introduction de la chaîne PEG sur le sucre par lien triazole** au lieu du lien O-glycosidique. Ce triazole a été choisi pour avoir montré une augmentation d'affinité en position 2, et pour être plus stable à l'hydrolyse qu'une O-glycosylation.¹⁷³ Le greffage de ces unités sur le chélateur L² a donné le composé **Chel6** (figure 56).

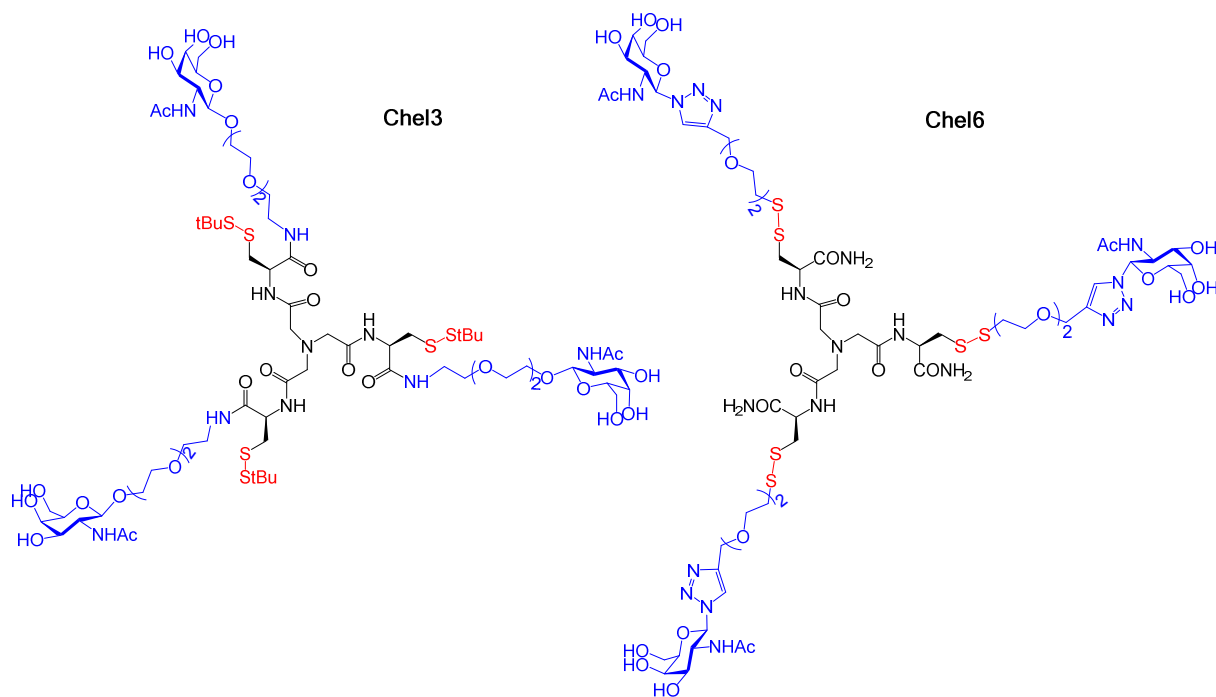


Figure 56 : Variation des systèmes de ciblage sur L² : Chel3 avec des unités de ciblages portées sur les liaisons amides et Chel6 dont les GalNAc sont introduits sur les chaînes PEG par lien traizole.

IV.2.b - Propriétés de chélation du cuivre

Chélation *in vitro* :

La capacité à piéger le Cu de ces différents glycoconjugués de la famille T ont été évalués *in vitro* et *in cellulo*. A l'image de Chel1, les pro-chélateurs de la famille T sont incapables de piéger le Cu.¹² Cependant, après réduction au GSH, **Chel2 et Chel6 libèrent le chélateur L², Chel4 libère le chélateur L⁵ et Chel3 le chélateur Chel3 réduit** (figure 57).

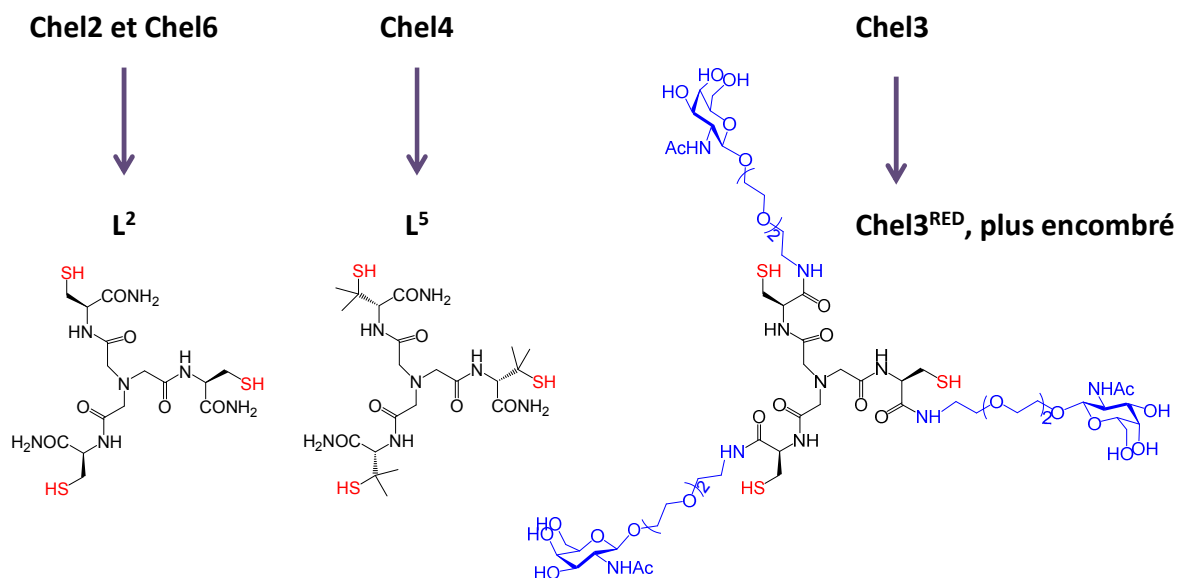


Figure 57 : Chélateurs libérés par les différents glycoconjugués de la famille T.

Les constantes d'affinité mesurées *in vitro* après réduction au GSH pour les pro-chélateurs Chel2 et Chel6 d'une part, et Chel4 d'autre part, correspondent aux affinités mesurées pour L² et L⁵; les constantes de dissociation K_d avec le Cu(I) sont respectivement de 10⁻¹⁹ et 10⁻¹⁷. Enfin, les propriétés de chélation du Cu *in vitro* de Chel3 sont similaires à celle de L². Les complexes formés entre Chel3 et le Cu(I) sont très stables, avec un K_d de l'ordre de 10⁻¹⁸. Les unités de ciblage ne perturbent donc pas la coordination du Cu(I) *in vitro*.

Chélation *in cellulo* :

Les capacités de chélation *in cellulo* des pro-chélateurs de la famille T ont également été étudiées sur cellules WIF-B9.¹² Comme avec Chel1, un déplacement de l'ATP7B vers le Golgi est induit par ces glycoconjugués sur des cellules hépatiques surchargées en Cu (figure 58).

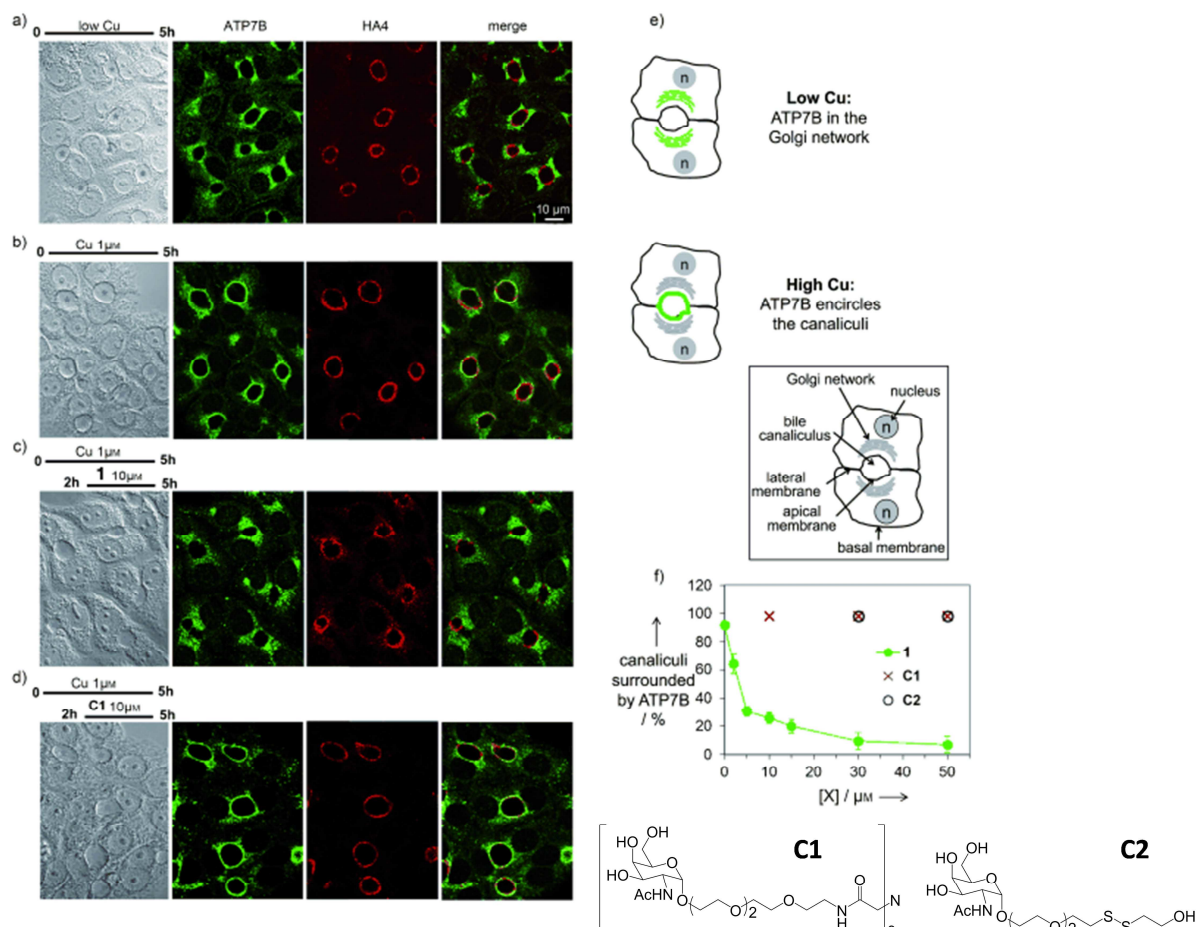


Figure 58 : Effet du Cu sur la localisation de l'ATP7B dans les cellules WIF-B9 et efficacité du glycoconjugué Chel2 noté 1. a-d) ATP7B et HA4 (un marqueur des membranes des canalicules) ont été détectés par immunofluorescence indirecte et l'image a été acquise par microscopie confocale. Sur chaque panel sont présentés de gauche à droite l'image Nomarski, la fluorescence verte de l'ATP7B, la fluorescence rouge de HA4 (prises au milieu de la couche cellulaire) et la somme des deux. Sur les images Nomarski, les canalicules biliaires sont repérés par un astérisque bleu. a) Cellules en conditions normales de Cu (5h) ; b) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl₂ (5h) ; c) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl₂ (2h) puis ajout de 10 μM de 1 (Chel2) (3h) ; d) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl₂ (2h) puis ajout de 10 μM de C1 (3h) ; e) schéma de cellules hépatiques montrant la localisation de l'ATP7B en fonction de la concentration en Cu ; f) effet de dose des composés 1, C1 et C2 présentant le % d'entourage des canalicules en fonction de la concentration en composé, tous les points de la courbes sont réalisés dans les conditions de c) et d).

Le déplacement d'ATP7B est fonction de la dose de Chel2 introduite sur les cellules. Ainsi, il est possible d'évaluer l'efficacité de chélation du Cu intracellulaire en corrélant la dose de glycoconjugué introduite en fonction du pourcentage de canalicules biliaires entourés par l'ATP7B. Cette relation dose dépendante est très informative parce qu'elle permet de comparer l'efficacité de chélation intracellulaires des différents composés (figure 59).

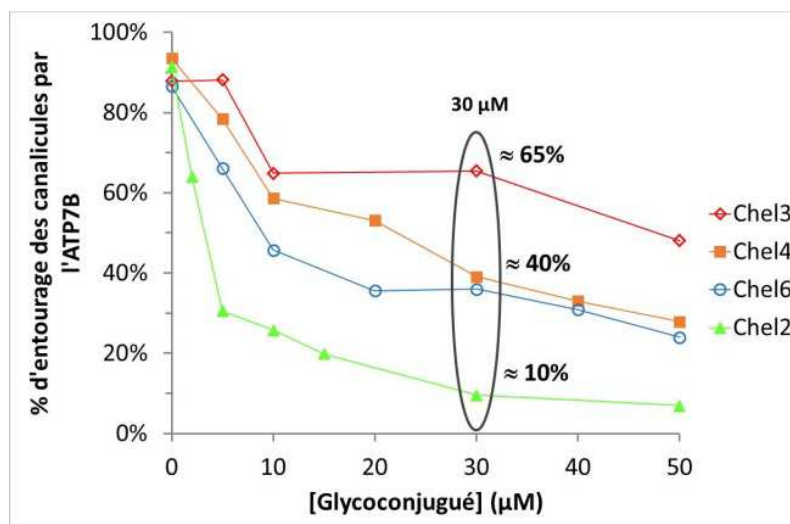


Figure 59 : Effet de dose des composés Chel2, Chel3, Chel4 et Chel6 sur cellules WIF-B9 en présence d'1 µM de Cu ; graphique présentant le % d'entourage des canalicules en fonction de la concentration en composé

Ainsi, il a été établi que **Chel2 est le plus efficace pour la chélation du Cu intracellulaire, et que Chel3 ne permet pas de faire diminuer le taux de Cu de manière satisfaisante.**

Pour aller à l'essentiel

Les chélateurs du Cu(I) conçus sur le modèle de métalloprotéines ont été vectorisés vers les ASGP-R, en exploitant les informations clés de la littérature sur les interactions glycoconjugués-ASGP-R décrites dans la section précédente. Des unités de ciblage composées de GalNAc espacés de 20 Å et portés par des bras espaceurs flexibles ont été introduites sur les chélateurs, donnant deux familles de glycoconjugués d'architectures et de propriétés de chélation différentes ; ils sont nommés **Chel1** pour la famille CP et **Chel2 à Chel6** pour la famille T. Les glycoconjugués des deux familles ne piège le Cu(I) in vitro qu'après leur réduction par le GSH, et aussi efficacement que les chélateurs dont ils sont issus. Leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques humaines et à y piéger le Cu a également été démontrée. Il est à noter qu'aux vues de ses propriétés de chélation in vitro et in cellulo, Chel2 est le glycoconjugué le plus performant de la famille T pour la chélation du Cu(I) intracellulaire.

V - Problématique

Nous avons vu dans ce chapitre que la maladie de Wilson est due à une accumulation de Cu principalement dans le foie, conduisant à des dommages tissulaires. Face aux nombreux effets secondaires des médicaments actuellement utilisés pour traiter cette pathologie, des pro-chélateurs efficaces et sélectifs du Cu(I) ont été développés par Delangle *et al.* afin de détoxifier le foie des malades. **Deux familles de pro-chélateurs nommées CP et T** ont été conçues sur le modèle de métalloprotéines, et sont vectorisées vers les cellules hépatiques pour une action localisée. Le ciblage des cellules hépatiques s'effectue par la reconnaissance spécifique des pro-chélateurs par la lectine ASGP-R, abondamment et presque exclusivement exprimée à la surface des hépatocytes. Les pro-chélateurs présentent des résidus GalNAc dans une géométrie optimisée permettant leur reconnaissance par la lectine. Ils sont internalisés dans les hépatocytes par endocytose, puis ils libèrent des chélateurs du Cu(I) intracellulaire. La chélation du Cu(I) s'effectue par l'intermédiaire de fonctions thiol, qui sont masquées dans le milieu extracellulaire sous forme de ponts disulfures. Deux glycoconjugués se distinguent au sein de chaque famille pour leurs propriétés de chélation du Cu(I) : **Chel1 de la famille CP et Chel2 de la famille T** (figure 60).

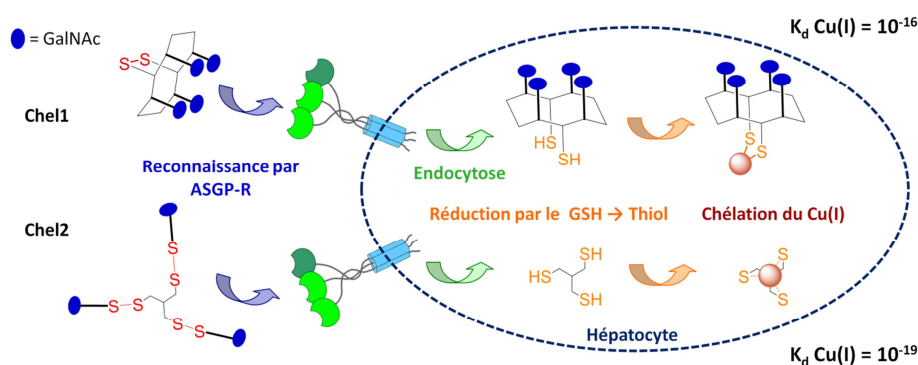


Figure 60 : Schéma récapitulatif de la stratégie de chélation du Cu(I) intra-hépatocytaire par deux familles de glycoconjugués.

Les constantes de dissociation obtenues *in vitro* avec le Cu(I) après réduction des ponts disulfures de ces glycoconjugués sont de 10^{-16} pour Chel1 et 10^{-19} pour Chel2; **Chel2 piège donc plus efficacement le Cu(I) *in vitro* en milieu réducteur que Chel1**. Néanmoins, lors d'une incubation des cellules hépatiques surchargées en Cu avec 30 μM de chacun des glycoconjugués, le taux d'entourage des canalicules par l'ATP7B, senseur de la concentration en Cu intracellulaire, passe de 100% à 10% avec Chel1 comme avec Chel2. Ceci témoigne d'une **efficacité de chélation du Cu intracellulaire équivalente pour les deux composés**.

Par conséquent, d'autres facteurs influent sur l'efficacité de chélation du Cu(I) dans les hépatocytes : l'implication d'un ligand endogène, la localisation intracellulaire des chélateurs mais aussi le taux d'internalisation du glycoconjugué. L'efficacité de ciblage de l'ASGP-R de chacune des deux familles de glycoconjugué module-t-elle leur efficacité de chélation du Cu(I) intracellulaire ? Dans ce cas, comment optimiser les propriétés de vectorisation afin d'obtenir un candidat médicament le plus actif et le moins toxique ?

La poursuite du projet s'est donc orientée vers **l'étude du ciblage des ASGP-R par les glycoconjugués des familles CP et T**.

Chapitre II-

La cytométrie en flux pour l'étude d'internalisation des glycoconjugués dans les hépatocytes

Ce chapitre décrit les objectifs de l'étude et la méthode utilisée pour les atteindre, à savoir la cytométrie en flux. L'objectif est en effet d'évaluer les systèmes de ciblage des pro-chélateurs de cuivre vers les cellules hépatiques décrit à la fin du chapitre I. Le choix de la cytométrie en flux sera tout d'abord présenté, puis les différentes stratégies d'études permettant de répondre à la problématique de ce travail de thèse.

I - Objectifs des travaux et démarche envisagée

I.1) Objectifs

Une stratégie innovante de chélation du cuivre intra-hépatocytaire a été mise au point et présentée dans le chapitre I. Elle consiste à combiner des pro-chélateurs de Cu(I) avec des unités de ciblage des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP-R) majoritairement exprimés à la surface des cellules hépatiques. Les glycoconjugués **Chel1 et Chel2** ainsi conçus ont montré leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques et à y piéger efficacement le cuivre. Cependant, le mécanisme d'internalisation de ces glycoconjugués dans les hépatocytes et l'efficacité de vectorisation ne sont pas connus. L'objectif de mes travaux de thèse est donc d'analyser les propriétés de ciblage de ces deux familles de glycoconjugués vers les ASGP-R.

Le premier objectif est de déterminer le **mécanisme d'internalisation** de Chel1 et Chel2 dans les hépatocytes, afin de vérifier que celui-ci est bien dépendant des ASGP-R et sélectif de ce type cellulaire.

De plus, il a été mis en évidence que les efficacités de chélation du Cu intracellulaire sont équivalentes pour Chel1 et Chel2, bien que l'affinité pour le Cu(I) du chélateur relargué par Chel2 dans les hépatocytes soit nettement plus élevée que celle du chélateur produit par Chel1. Cet effet pourrait s'expliquer par des propriétés de ciblage des cellules hépatiques différentes pour ces deux glycoconjugués. Le second objectif est donc de comparer les deux molécules en termes d'**efficacité de ciblage des hépatocytes**, afin de comprendre les propriétés de chélation intracellulaire observées.

Enfin, il est essentiel de comprendre les **facteurs moléculaires influençant l'efficacité d'internalisation** par les ASGP-R afin d'optimiser le ciblage vers les cellules hépatiques. Pour cela, **cinq paramètres structuraux** ont été étudiés (figure 61) :

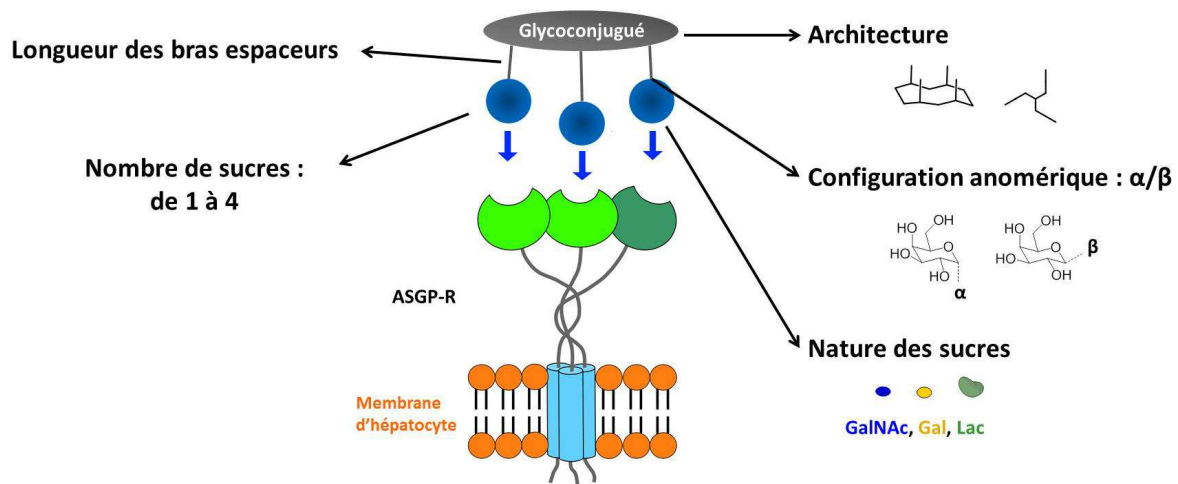


Figure 61 : Paramètres structuraux étudiés dans le but de comprendre quels facteurs influencent les interactions entre les glycoconjugués et la lectine ASGP-R.¹²⁶

- L'**architecture** des glycoconjugués, avec deux familles de structures différentes (tripodes et cyclodécapeptides). Cette étude permet de déterminer si une des deux architectures chimiques est plus adaptée à la géométrie de la lectine ASGP-R pour une reconnaissance multivalente optimale.

- La **configuration anomérique** des sucres, qui peut être en α ou en β . Les sucres sont en effet de configuration α sur Chel1 et β sur Chel2. L'étude de dérivés de configuration inverse permet d'évaluer l'impact de la configuration anomérique des unités saccharidiques sur la reconnaissance par la lectine, impact qui est plutôt controversé dans la littérature comme présenté dans le chapitre I. En effet, aucun consensus n'a permis d'établir avec précision quelle configuration anomérique est préférentiellement reconnue par la lectine ASGP-R. Il semblerait que l'effet soit dépendant du type de ligand étudié.

- Le **nombre de sucres**, qui est de quatre pour Chel1 et de trois pour Chel2. Il a été établi que l'affinité maximale pour l'ASGP-R est atteinte pour des ligands trivalents à tétravalents.¹⁶² La contribution de la multivalence dans l'efficacité d'internalisation par ASGP-R a été évaluée grâce à des dérivés de valences différentes. D'un point de vue mécanistique, ceci permet de s'assurer que la reconnaissance par la lectine se fait au moyen d'une interaction multivalente et non par reconnaissance monovalente d'un des sucres porté par le glycoconjugué. Il est ainsi possible de conclure quant à l'adéquation de l'architecture des glycoconjugués avec celle de la lectine.

- La **nature des sucres**, qui sont des *N*-acétylgalactosamines (GalNAc) sur les deux glycoconjugués. La lectine ASGP-R reconnaît avec affinité les sucres de type galactopyranose. L'unité GalNAc a été choisie parce qu'elle est décrite comme le ligand naturel de plus forte affinité pour les ASGP-R.^{118,126,146} En outre, ce sucre est moins susceptible d'être reconnu par d'autres récepteurs, ce qui est important pour la sélectivité de ciblage. La comparaison avec des dérivés portant des galactoses ou lactoses, également reconnus par les ASGP-R,

renseigne sur la pertinence de l'utilisation des GalNAc pour le ciblage des cellules hépatiques.

- La **longueur des bras espaceurs** reliant les sucres au reste de la molécule. Une distance de 20 Å environ est préconisée pour permettre une interaction multivalente de plusieurs sucres avec plusieurs domaines de reconnaissance de la lectine.^{118,126,162} L'augmentation de la longueur des bras espaceurs permet de s'assurer que les composés initiaux possèdent des distances entre les sucres qui satisfont à la reconnaissance multivalente.

L'ensemble de ces informations permet d'optimiser le ciblage des cellules hépatiques. En réalisant le meilleur compromis possible entre ciblage et chélation du cuivre (II), un candidat médicament pertinent peut ainsi être développé.

1.2) Démarche

La réalisation de ces objectifs se déroule en deux étapes :

- La première consiste en la **synthèse de différents glycoconjugués** appartenant aux familles CP et T. Ces dérivés font varier les quatre paramètres présentés ci-dessus.

- Une fois les différents dérivés obtenus, leur **capacité à entrer dans les cellules hépatiques via les ASGP-R et leur efficacité d'internalisation est évaluée**. Cette dernière doit être estimée de manière quantitative, afin de pouvoir comparer les différents glycoconjugués entre eux.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées dont voici quelques exemples les plus courants de la littérature pour l'étude de l'ASGP-R.

La stratégie la plus classique est la **mesure du potentiel inhibiteur relatif**.¹⁴⁵ Elle consiste en des expériences de compétition entre un ligand naturel de haute affinité pour l'ASGP-R, la glycoprotéine asialoorosomucoïde (ASOR) et le glycoconjugué à tester. Le potentiel inhibiteur d'un composé correspond à sa capacité à inhiber l'interaction entre la protéine ASOR radiomarquée (¹²⁵I-ASOR) et la lectine ASGP-R. Grâce à la mesure de la différence entre la quantité d'¹²⁵I-ASOR complexée avec la lectine et celle restant en solution, il est possible de déterminer des concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) pour comparer l'affinité des différents ligands. Un des avantages de cette technique est que les IC₅₀ obtenues dans certaines conditions, peuvent permettre de calculer des constantes thermodynamiques d'interaction, comme les constantes de dissociation de l'adduit ligand-lectine (K_d). L'inconvénient qui en découle directement est que pour mesurer des K_d, il est préférable de travailler sur des lectines isolées, ce qui n'est alors plus représentatif de ce qui se passe à la surface des cellules : les différences dans les degrés d'oligomérisation, l'organisation et l'accessibilité des sous-unités influencent en effet le phénomène de reconnaissance.

La **résonance plasmonique de surface** (SPR ou Biacore) est classiquement utilisée pour l'analyse d'interactions biomoléculaires (figure 62). Elle consiste en la mesure de phénomènes d'adhésion de ligands en solution sur des surfaces d'or fonctionnalisées par des lectines, ou l'inverse. Cette technique optique mesure le changement d'indice de réfraction du milieu avoisinant la surface d'or lors de l'interaction biomoléculaire. Cependant, elle nécessite d'obtenir la lectine purifiée pour son immobilisation sur surface d'or, ce qui n'est pas toujours possible. En outre, le niveau d'oligomérisation de la lectine peut être modifié et il n'est alors pas représentatif du mode de présentation multimérique de la lectine à la membrane des cellules.

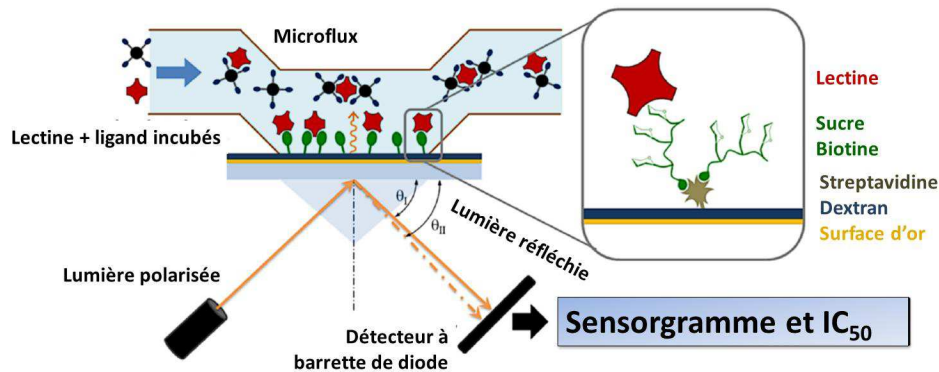


Figure 62 : Principe de la SPR, reproduit d'après Cecioni *et al.*, *Chem. Rev.*, 2015, 115, 525.⁸

Enfin la **cytométrie en flux** permet notamment de mesurer **l'internalisation de composés dans des cellules**. Pour cela, il est nécessaire de marquer les composés, ici les glycoconjugués, à l'aide d'une sonde fluorescente. L'intensité de fluorescence des cellules mesurée par cytométrie en flux correspond alors à la **fluorescence émise par les glycoconjugués internalisés** dans les cellules, ce qui est plus pertinent dans notre cas. Cette technique est assez facile à mettre en œuvre, classiquement **utilisée de manière qualitative**, et peut **devenir quantitative**. Elle permet une analyse **rapide à grande échelle et cellule par cellule**, sensible et **multiparamétrée**. En plus de l'étude d'internalisation, elle permet de vérifier la viabilité des cellules sur lesquelles sont accomplies les mesure. Les faiblesses de cette technique sont qu'elle nécessite un **marquage par un fluorophore**, qui peut perturber les propriétés de la molécule. De plus, elle requiert la mise en suspension des cellules, ce qui peut s'avérer difficile en fonction du type cellulaire utilisé. Enfin, il est compliqué d'obtenir des constantes K_d à partir de telles expériences.

La technique de cytométrie en flux à été choisie dans ce travail ; son application à l'étude de l'internalisation des glycoconjugués d'intérêt dans les cellules hépatiques est détaillée par la suite.

Il est à noter que d'autres techniques comme l'ITC (« *isothermal titration calorimetry* »), les tests ELLA (« *enzyme-like lectin essay* ») ou d'érythroagglutination sont également des techniques couramment utilisées.

II - La cytométrie en flux

Une cellule d'un organisme participe à un fonctionnement global ; il n'est donc pas pertinent d'étudier une cellule eukaryote isolée :

*« un phénomène biologique à incidence physiologique est avant tout une question de population cellulaire ».*²³²

Pour une étude pertinente et significative d'un phénomène biologique, il est par conséquent nécessaire d'avoir recours à l'utilisation des statistiques. La cytométrie en flux est de ce fait la technique la plus adaptée de part la dimension des échantillons qu'elle permet d'acquérir, la précision et la multiplicité des mesures, la vitesse d'acquisition et enfin les outils développés pour l'interprétation des résultats. Dans ce chapitre, nous allons voir ce qu'est la cytométrie en flux, les différentes opportunités qu'offre cette technique et comment nous l'avons adaptée à notre problématique de manière à répondre aux objectifs fixés.

II.1) Principe et fonctionnement

Cette partie traite de l'appareil, le cytomètre, et du type d'analyse qu'il peut effectuer, de l'acquisition des données et leur traitement par le logiciel Cell Quest Pro.^{232,233}

II.1.a - Généralités

La cytométrie en flux est une technique qui permet une analyse simultanée de multiples paramètres physiques d'une particule (cellule, micro-organisme, bille...). De plus, l'acquisition s'effectue à large échelle sur une population de particules, dont l'analyse individuelle est moyennée. Ceci permet d'obtenir des résultats reproductibles et représentatifs d'une population.

Les particules, ici des cellules, traversent une par une un faisceau laser. Ce faisceau est focalisé en leur centre par un système de lentilles et de prismes, de manière à les illuminer entièrement en une seule fois. Les données optiques résultant de cette excitation, comme la lumière émise par l'échantillon par fluorescence, réfraction, réflexion et diffusion, sont récoltées grâce à divers filtres et détecteurs et rendent compte des caractéristiques globales de la cellule (figure 63). Les avantages de l'utilisation d'une source laser sont un faisceau stable, monochromatique, unidirectionnel et en phase. Toute perturbation de ce signal est donc due à une interaction entre l'onde lumineuse et la particule, et non à des variations induites par la source.

Le cytomètre en flux est composé de quatre systèmes :

- un **système fluide**, qui assure le passage, l'individualisation et l'alignement des particules devant la source laser,
- un **système optique**, qui récolte les différentes données générées par la perturbation du faisceau laser lors de son interaction avec la particule et l'émission de fluorescence(s),

- un **système électronique**, qui transforme le signal lumineux reçu en signal numérique,
- et enfin un **système d'analyse** des données récoltées.

Certains cytomètres sont agrémentés d'un système de **tri cellulaire** permettant de séparer les cellules en fonction d'un ou plusieurs paramètres physiques.

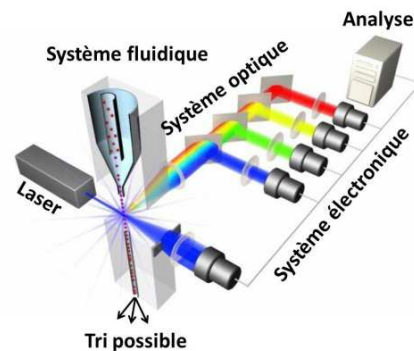


Figure 63 : Principe de fonctionnement d'un Cytomètre en Flux. D'après l'illustration du "MUSC Department of Regenerative Medicine and Biology".

La suspension à analyser est injectée au sein d'une gaine liquide pressurisée. Le liquide de gaine est composé d'eau ou d'une solution saline isotonique par rapport au milieu intracellulaire : la concentration en solutés dissous est égale à celle du cytoplasme, ici du tampon phosphate (PBS) filtré à $0,22\ \mu\text{m}$. La pression de la gaine (4,5 psig) étant légèrement inférieure à celle de l'échantillon (de 4,6 à 5,0 psig) et la section de la sortie de buse étant parfaitement calibrée, il se produit un phénomène de focalisation hydrodynamique : les cellules se dissocient et s'alignent dans la gaine de liquide pour défiler individuellement devant la source lumineuse (laser(s) / diode(s) laser) (figure 64). Le flux laminaire assure un défilement pouvant aller jusqu'à une vitesse de 6 à 40 m/s, en fonction du différentiel de pression exercé sur l'échantillon qui est ajusté par l'utilisateur. Il est à noter qu'un débit trop élevé diminue la précision de centrage de la particule par rapport au faisceau, et donc la qualité de l'analyse. Enfin, la gaine de liquide ne se mélange pas à l'échantillon avant la chambre d'analyse.

La concentration de la suspension intervient dans la précision de la mesure. Sur un appareil pouvant acquérir 1000 à 2000 cellules/s, la concentration doit être comprise entre $5 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^7$ cellules/mL : plus forte, elle ne permet pas l'individualisation des cellules et plus faible, elle induit un mauvais centrage des cellules face au détecteur et donc une perte de précision.

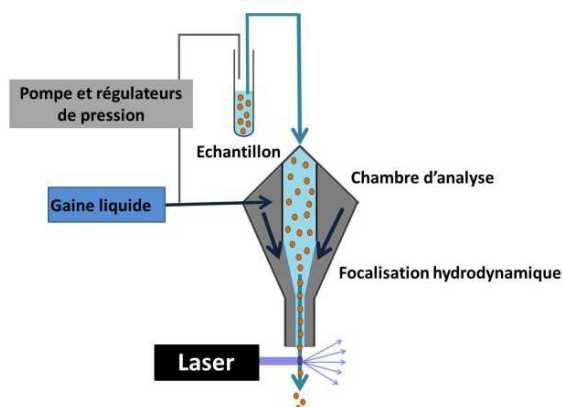


Figure 64 : Schéma du système fluide servant au passage et à la focalisation des cellules devant la source laser.

Le passage des cellules devant la source laser permet d'acquérir diverses données optiques. Quels sont les liens entre les données collectées et les caractéristiques biologiques que l'on veut observer ?

II.1.b - Les données collectées

Le passage d'une cellule devant le faisceau constitue ce qu'on appelle un « évènement ». L'interaction des cellules avec le faisceau lumineux provoque des phénomènes optiques de plusieurs natures, desquels découlent de nombreuses informations. Pour chaque évènement, différentes données sont collectées grâce à un système optique composé de lentilles, miroirs dichroïques, filtres et photodétecteurs (figure 65). Les lentilles permettent de focaliser les faisceaux lumineux. Les miroirs dichroïques sont des diviseurs optiques, ou diviseurs de faisceau. Ils ne transmettent que certaines longueurs d'onde de la lumière reçue et réfléchissent les autres. Ils permettent donc de trier les différentes données provenant de la lumière transmise par la cellule.

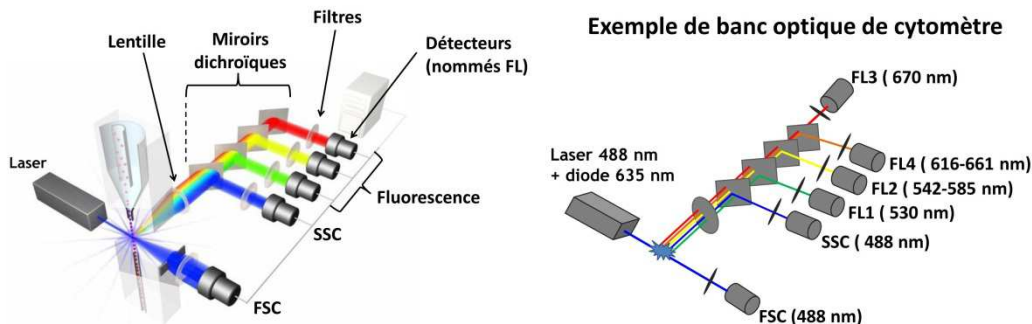


Figure 65 : Exemple de système optique de cytomètre. Le détecteur FSC se situe en face de la source laser tandis que tous les autres collectent la lumière perpendiculairement à la source, après focalisation du faisceau par une lentille. Les détecteurs FSC et SSC collectent la lumière émise dans la longueur d'onde du laser, 488nm. Les émissions de fluorescence sont collectées par les détecteurs FL pour les plages de longueur d'ondes précises sélectionnées à l'aide des miroirs dichroïques et filtres : 530 nm (détecteur FL1), 542 à 585 nm (FL2), 616 à 661 nm (FL4) et enfin 670 nm (FL3).

Les signaux collectés sont les suivants (figure 65) :

- Les données de diffraction, collectées dans l'alignement du faisceau de l'autre côté de l'échantillon à 180° par rapport à la source laser, renseignent sur la taille de la particule traversant le faisceau. On appelle cette donnée la **diffusion aux petits angles**, ou **FSC** pour « *Forward Scatter* ». Ce paramètre donne une estimation de la **taille des cellules**, qui peut être faussée par le milieu dans lequel les cellules sont en suspension ou la structure des cellules. Si l'indice de réfraction de la solution de suspension et celui des cellules sont identiques, les cellules diffractent peu de lumière. D'autre part, les cellules dont la membrane est endommagée ont un indice de réfraction inférieur à celui des autres cellules ; elles diffractent moins de lumière et donc produisent un signal plus faible alors que leur taille est identique. Ces incertitudes de mesure ne permettent donc pas de mesurer avec précision la taille des cellules. Cependant, dans le contexte des travaux présentés ci-après, l'impact de ces incertitudes est négligeable. En effet les données collectées en FSC ont pour but de comparer les cellules entre elles afin de discriminer les doublets de cellules

(taille supérieure) ainsi que les cellules mortes ou débris (de tailles inférieures). Connaître la taille exacte des cellules n'est donc pas indispensable (figure 66).

- Les données de diffusion, réfraction et réflexion collectées à 90° par rapport au faisceau laser donnent des informations sur la structure intracellulaire (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique), plus communément appelé **granulométrie des cellules**. On appelle cette donnée **diffusion aux grands angles**, ou **SSC** pour « *Side Scatter* ». Ce paramètre peut être perturbé par le type de fixation cellulaire, l'instabilité du jet et de mauvais réglages optiques (figure 66).

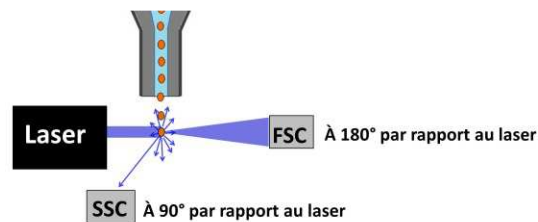


Figure 66 : Collecte des données des diffractions FSC à 180° par rapport à la source laser et de diffusion, réflexion et réfraction SSC à 90° par rapport à la source laser.

- Enfin, **diverses données de fluorescence** collectées à 90° par rapport au faisceau laser peuvent être **obtenues simultanément** pour une même particule. Ces émissions peuvent résulter de l'autofluorescence des cellules ou du marquage par des fluorochromes. Le marquage fluorescent peut être par exemple le fruit d'un immunomarquage, de l'expression de protéines recombinantes fluorescentes, ou de l'internalisation d'un fluorochrome. Les différents signaux de fluorescence émis par la cellule sont focalisés par une lentille, puis un jeu de miroirs dichroïques séparent les signaux en fonction de leur longueur d'onde. Ces derniers sont récoltés sélectivement au travers de filtres disposés devant les photorécepteurs. Ils sont ensuite amplifiés et transformés en données numériques quantifiable par des photomultiplicateurs (PMT), qui transforment proportionnellement de la quantité de photons reçus en voltage (figure 65).

II.1.c - Les réglages : voltages, régions, seuil et compensation

Les réglages de l'instrument sont essentiels pour l'acquisition de données pertinentes en vue de leur analyse statistique. Ils doivent être optimisés suivant le type cellulaire et le(s) fluorochrome(s) utilisé(s). Ils sont réalisés sur une population de cellules non marquées ou « cellules blanches ». Lors du passage des cellules, le tracé du **diagramme point par point de la granulométrie en fonction de la taille des cellules** permet d'ajuster les voltages en FSC et SSC de manière à visualiser l'ensemble de la (ou des) population(s) cellulaire(s). Ceci rend possible la **sélection de la population de cellules saines** sur laquelle établir les statistiques. L'analyse s'affranchit ainsi des événements correspondant aux cellules mortes ou débris (de tailles inférieures), doublets de cellules (taille supérieure) et cellules en apoptose (forte granulosité) afin de ne pas fausser les résultats. Cette sélection s'effectue par un détournement de la région contenant la population d'intérêt appelée « *gate* ». La suite de l'analyse est ensuite limitée à cette sous-population (figure 67). Il est également possible par cette méthode de différencier plusieurs types cellulaires d'un même échantillon, par

exemple pour les échantillons sanguins qui sont composés de lymphocytes, monocytes et granulocytes dont la granulosité est très différente. De cette manière, les analyses de chaque sous-population cellulaire d'un même échantillon peuvent être réalisées indépendamment les unes des autres.

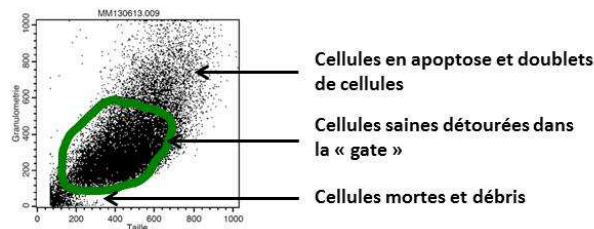


Figure 67 : Diagramme point par point de la granulométrie (SSC) des cellules HepG2 en fonction de leur taille (FSC). La région de cellules saines ou « gate » est ici détournée. Les données discriminées sont les suivantes : au-dessus se trouvent les cellules très granuleuses en apoptose et les doublets de cellules, au-dessous se trouvent les cellules mortes et les débris (taille et indices de réfraction plus faibles).

La **collecte de paramètres de fluorescence** est communément exprimée sous forme d'un histogramme représentant la quantité d'évènements au sein des cellules de la région sélectionnée ou « gate » en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée pour chaque évènement (figure 68). L'intensité de fluorescence est représentée sur une échelle linéaire ou logarithmique. Les plus souvent, l'échelle logarithmique est utilisée pour une visualisation de populations plus homogènes.

Dans le cadre de l'utilisation de plusieurs fluorochromes, il est nécessaire de réaliser un réglage des compensations de fluorescence pour limiter les interférences dues aux chevauchements des spectres d'émission des différents fluorochromes.

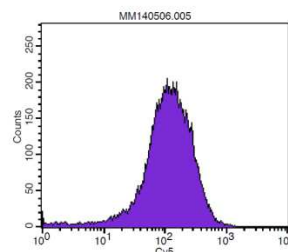


Figure 68 : Histogramme représentant le nombre de cellules saines en fonction de leur intensité de fluorescence en détection FL4 (acquisition de 661 à 616 nm correspondants à l'émission de fluorescence dans le domaine de la Cyanine 5).

II.2) Présentation et analyse des résultats

Le traitement de données s'effectue au moyen d'un logiciel adapté, ici CellQuestPro®. Les différents modes de représentation sont les suivants (figure 67 à 69) :

- les **diagrammes point par point** permettent de mettre en relation 2 paramètres mesurés : par exemple FSC/SSC comme sur la figure 67 ou encore FSC/Fluorescence comme sur la figure 69 à droite.
- les **histogrammes** expriment le nombre d'évènements en fonction d'un paramètre mesuré comme la fluorescence sur la figure 68 ou la figure 69 à gauche.

Il est possible d'utiliser des marqueurs limitant les analyses à une zone définie des diagrammes (figure 69), en plus du détournement de région évoqué précédemment (figure 67).

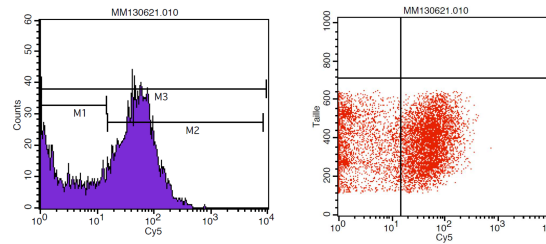


Figure 69 : Exemple de marqueurs ; l'histogramme de gauche représente le nombre de cellules en fonction de leur intensité de fluorescence, le diagramme de droite représente la taille des cellules (FSC) en fonction de leur intensité de fluorescence pour la même population cellulaire. Ici la population est divisée en 2 : une partie fluoresce et l'autre non. Sur l'histogramme de gauche, des marqueurs sont utilisés afin d'établir des statistiques sur les cellules fluorescentes d'une part (M2) et non fluorescentes d'autre part (M1). Sur le diagramme de gauche, un quadrant est utilisé pour calculer le pourcentage de cellules fluorescentes par rapport aux cellules non marquées (limite verticale).

Des statistiques sont établies à partir des différentes données exposées précédemment. Par exemple, les diagrammes FSC/SSC présentés précédemment permettent d'évaluer le pourcentage d'une sous-population d'un échantillon cellulaire (figure 69). Les statistiques réalisées à partir des données de fluorescence sont les suivantes :

- La **moyenne** $m = \sum X_i / n$; avec X_i l'intensité de fluorescence et n le nombre d'évènement. C'est sur cette donnée statistique que se base l'étude présentée dans mon travail de thèse.
- La moyenne géométrique $m_{Geo} = \sum \log(X_i) / n$, qui est une meilleure estimation de la tendance centrale si les données sont éparpillées ou si les populations ne sont pas homogènes.
- L'écart-type $\sigma = \sqrt{v}$; avec la variance $v = 1/n \sum (X_i - m)^2$ qui mesure la dispersion autour de la moyenne.
- Le coefficient de variation ou écart type relatif $CV = \sigma / m$.
- La médiane M indique la valeur qui permet de couper la population en deux parties égales.

II.3) Exemples d'applications

La cytométrie en flux est une technique utile à de nombreuses problématiques. Les champs d'investigation sont larges : fonctions cellulaires et métabolisme, cycle cellulaire et viabilité, identification et isolement de cellules... La fluorescence peut être impliquée sous plusieurs formes : immuno-marquage de compartiments cellulaires, sondes fluorescentes révélatrice d'une protéine, d'une espèce chimique ou encore d'une voie métabolique, expression d'une protéine fluorescente recombinante...

Quelques exemples parmi les plus courants sont présentés ici mais la liste est loin d'être exhaustive.

II.3.a - Méthode d'analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux est fréquemment utilisée. Elle permet d'évaluer la capacité de la cellule à se diviser. Elle requiert l'utilisation de fluorochromes spécifiques de l'ADN comme le bromure d'éthidium (BET), l'iodure de propidium (IP), le DAPI ou le réactif de Hoechst, qui permettent la mesure de la teneur cellulaire en ADN. La quantité d'ADN changeant en fonction de la phase du cycle cellulaire, un profil type du nombre de cellules en fonction de leur intensité de fluorescence a été établi pour des populations cellulaires saines en division normale (figure 70). Tout changement de ce profil traduit un arrêt de prolifération des cellules. Il est alors possible de mesurer l'impact d'un composé sur la prolifération des cellules et à quel stade particulier du cycle les cellules sont bloquées.

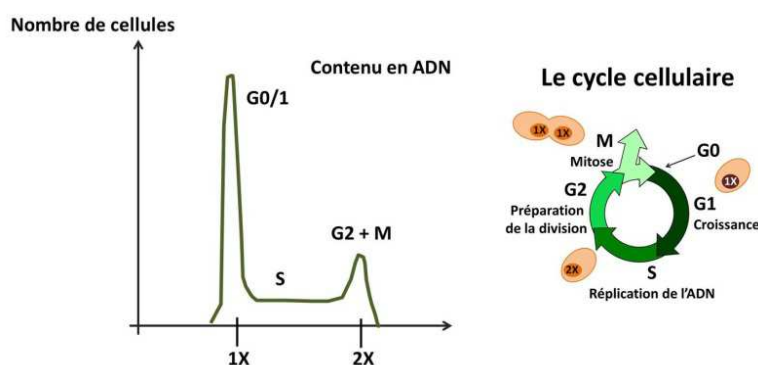


Figure 70 : Histogramme du nombre de cellules en fonction de la quantité de fluorescence des marqueurs de l'ADN pour une population normale. On peut voir une répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire G0/1, S et G2+M caractérisée par l'intensité de fluorescence qui correspond à la teneur en ADN de ces cellules. Durant les phases G0 et G1, la cellule est en interphase : sa teneur en ADN est normale. A la fin de la phase G1 qui correspond à sa croissance, la cellule entre en division. Pour cela, elle réplique son ADN durant la phase S. Puis, arrivée en phase G2, la cellule contient le double d'ADN avant de se diviser en deux lors de la mitose, phase M. Elle retourne alors en phase G0/1.

II.3.b - Mesure de la viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire est également envisageable pour l'évaluation de la cytotoxicité d'un composé. Lors de la mort cellulaire, par nécrose ou apoptose, de nombreux changements surviennent au niveau cellulaire. En effet, des phénomènes comme une perte d'intégrité de la membrane, un ralentissement du métabolisme, ou encore la dérégulation de l'homéostasie ionique et hydrique par les canaux ioniques sont observables. Les tests de viabilité concernent soit la mise en évidence des cellules vivantes, soit mortes, soit les deux.

Les changements de morphologie de la cellule qui accompagnent le processus de mort cellulaire affectent la taille, la structure interne et l'indice de réfraction des cellules. Ces changements entraînent des modifications de leurs propriétés de diffusion de la lumière, observables en cytométrie par un déplacement de la population de cellules sur le diagramme FSC/SSC. Comme mentionné précédemment, des cellules dont la membrane est endommagée ont un indice de réfraction plus faible et produisent donc des signaux de diffusion aux petits angles (FSC) plus faibles. Des cellules en apoptose sont plus petites,

présentent une structure intracellulaire plus granuleuse et donc une diffusion aux grands angles (SSC) plus élevée et libèrent des corps apoptotiques, ce qui est visible par l'augmentation de la quantité de « débris » (figure 71).

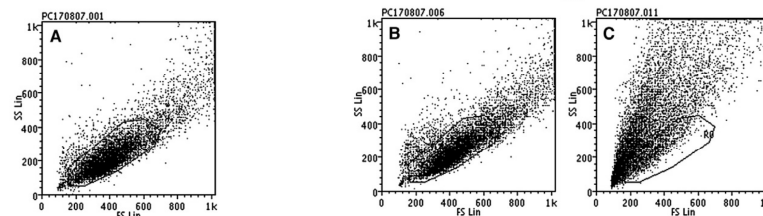


Figure 71 : Diagrammes de la granulosité des cellules en fonction de leur taille. Une nette augmentation de la granulométrie des cellules et l'apparition d'évènements de petites tailles sont détectés en présence de nanoparticules (24 mg) (C) comparé au contrôle des cellules seules (A) ou à l'incubation avec une plus faible exposition aux nanoparticules (12 mg) (B). Ceci correspond à une induction de la mort cellulaire, le composé est donc cytotoxique à une teneur de 24 mg. Nanoparticules de polyacrylamide fonctionnalisées par le peptide Tat (« Cell Penetrating Peptide »), en incubation avec des cellules souches mésenchymateuses. D'après Coupland *et al.*, *J. Cont. Rel.*, 2008 130, 115.²³⁴

L'intégrité membranaire peut être investiguée à l'aide de sondes fluorescentes. Certaines sont capables de diffuser dans les cellules dont la membrane comporte des lésions et de marquer certains compartiments ou composants cellulaires (BET, PI...). D'autres au contraire sont internalisées de manière passive dans toutes les cellules, puis après leur hydrolyse dans le cytoplasme diffusent hors des cellules dans le cas où les membranes sont lésées.

Enfin, des sondes potentiométriques, indicatrices de pH, de concentration calcique ou sensibles à l'activité oxydante de la cellule peuvent être utilisées.

II.3.c - Le tri cellulaire

La cytométrie en flux permet non seulement de distinguer différentes populations cellulaires d'un échantillon en fonction de leur morphologie ou de leur fluorescence, mais aussi de les séparer physiquement. C'est ce qu'on appelle le tri cellulaire. Plusieurs types de tri existent, les deux principaux sont décrits ci-dessous :

- Le tri mécanique, pour lequel une valve détourne les cellules d'intérêt vers une seconde voie de collecte après leur analyse.
- Le tri par déflexion de goutte : au sortir de la chambre d'analyse, le jet est séparé en fines gouttelettes ne contenant qu'un seul et unique événement par vibration haute fréquence de la buse. Chaque événement, est soumis à une impulsion électrique juste avant le fractionnement du jet. La gouttelette contenant la cellule passe ensuite entre deux plaques à haute tension où elle est déviée vers des voies de collectes différentes suivant l'excès de charge positive ou négative piégé en son sein (figure 72).

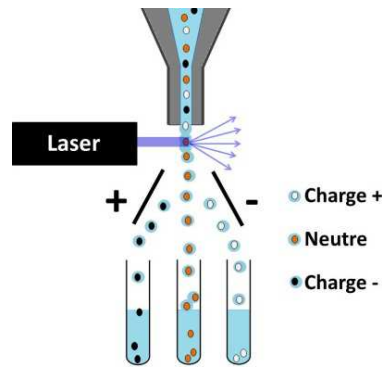


Figure 72 : Principe du tri cellulaire par déflexion de gouttes.

II.3.d - Analyses de fonction cellulaires

De nombreuses fonctions cellulaires peuvent être étudiées, s'il existe un composé interagissant avec cette fonction cellulaire qui puisse être visualisé par émission de fluorescence. Par exemple l'internalisation d'un composé par endocytose *via* un récepteur, qui est l'objet de l'étude développée ici, peut être évaluée de plusieurs manières. La solution la plus directe consiste à marquer le ligand du récepteur par un fluorophore et mesurer la fluorescence internalisée dans les cellules, corrélée à l'internalisation du ligand fluorescent. D'autres méthodes peuvent être employées, moins directes mais plus informatives quant au devenir cellulaire de tels ligands. Par exemple, un ARNm peut être vectorisé par le ligand et son internalisation dans la cellule est appréhendée par l'expression d'une protéine fluorescente.⁹⁸

Ainsi, la cytométrie en flux est notamment utilisée depuis environ 30 ans en tant qu'outil de diagnostic clinique, en particulier dans les maladies affectant le système hématopoïétique ou immunitaire. Grâce à cette technique, les différentes sous-populations cellulaires des échantillons biologiques de moelle ou de sang sont analysées de manière distincte. L'étude morphologique permet de détecter la présence de populations cellulaires malignes, et l'immunophénotypage permet entre autre de détecter des profils d'expression antigéniques anormaux à la surface des cellules, qui sont propres à chaque type cellulaire.²³⁵

Pour aller à l'essentiel

La cytométrie en flux est une technique qui permet une analyse à grande échelle et multiparamétrées de populations cellulaires. Elle repose sur l'analyse simultanée et sur cellules individuelles de divers phénomènes optiques tels que la fluorescence, la diffraction, la réflexion et la réfraction. Les possibilités qu'offre une telle technique sont multiples.

L'étude développée dans le cadre de ma thèse consiste à observer l'internalisation de molécules par endocytose médiée par un récepteur, mise en évidence par un marquage fluorescent de la molécule. La viabilité cellulaire est évaluée par analyse de la morphologie des cellules. Cette analyse n'influe pas sur la cellule et ses mécanismes, et elle n'exige pas d'ajout de composé chimique. Enfin, elle est facile à mettre en œuvre et réalisable sur chaque échantillon sans manipulations supplémentaire.

III - Stratégie d'étude de l'internalisation des glycoconjugués par cytométrie en flux

L'utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude de l'endocytose par les ASGP-R commence dans les années 2000. Plusieurs stratégies sont envisageables, avec un niveau de quantification plus ou moins élevé. Dans ce chapitre, la stratégie d'étude de l'internalisation des glycoconjugués dans les cellules hépatiques et les outils de mise en œuvre sont présentés.

III.1) Cytométrie en Flux pour l'étude de l'endocytose par l'ASGP-R

L'internalisation de composés marqués par un fluorophore dans les hépatocytes est évaluée par mesure de l'augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules traitées par rapport à une population de cellules non traitées. Dans la majorité des cas, elle revêt une dimension plus qualitative que quantitative.

Le taux d'internalisation peut être exprimée en terme de pourcentage de cellules marquées, c'est-à-dire pourcentage de cellules dont la fluorescence est supérieure à celle des cellules non traitées. Plusieurs informations sont accessibles par cette méthode grâce à la variation de paramètres tels que le temps d'incubation, la nature et la densité des sucres portés par le glycoconjugué d'intérêt, la concentration en glycoconjugués ainsi que la présence de compétiteurs.

C'est ce qu'ont réalisé David *et al.*²³⁶ afin de déterminer les caractéristiques d'internalisation de différents polymères glycosylés (notés P) dans les cellules hépatiques humaines HepG2. Ces expériences montrent que les polymères glycosylés marqués sont internalisés dans les cellules HepG2 de manière sélective par rapport au polymère non-glycosylé (PF). Cette internalisation active par les ASGP-R est également attestée par l'inhibition totale du marquage en présence de lactose libre comme compétiteur. Enfin, l'augmentation du degré de glycosylation augmente significativement l'efficacité d'internalisation, qui s'avère être meilleure pour les polymères portant des unités Lac que Gal (figure 73).

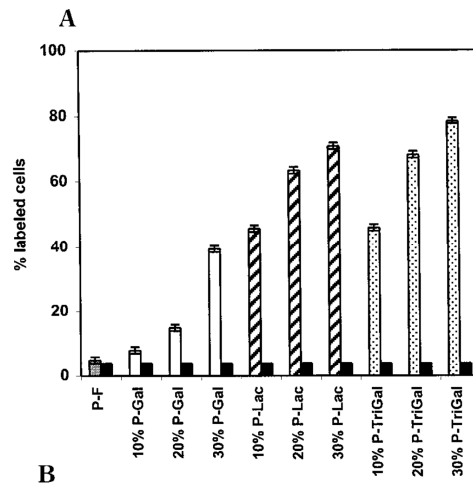


Figure 73 : Analyse par Cytométrie en Flux de l'internalisation de différents polymères (P) glycosylés (500 ng/mL soit environ 0,03 μ M) dans les cellules hépatiques HepG2. Les barres noires représentent l'incubation en présence de Lactose libre (150 mM). PF = contrôle. On peut voir que l'affinité dépend de la nature, la densité et la multivalence des sucres. D'après David *et al. Bioconj. Chem.*, 2001, 12, 890.²³⁶

Plus récemment, Medina *et al.*²³⁷ ont étudié l'internalisation de dendrimères fonctionnalisés par des GalNAcs. Les résultats obtenus en fonction de la densité de sucre et de la présence d'un compétiteur sont similaires. Ici deux temps d'incubation ont été utilisés : 2h et 24h. Un phénomène de saturation des récepteurs est observé à 24 h et amoindrie les différences d'internalisation observable aux temps plus courts. Il est donc préférable de se placer à des temps d'incubation courts pour obtenir des informations exploitables (figure 74).

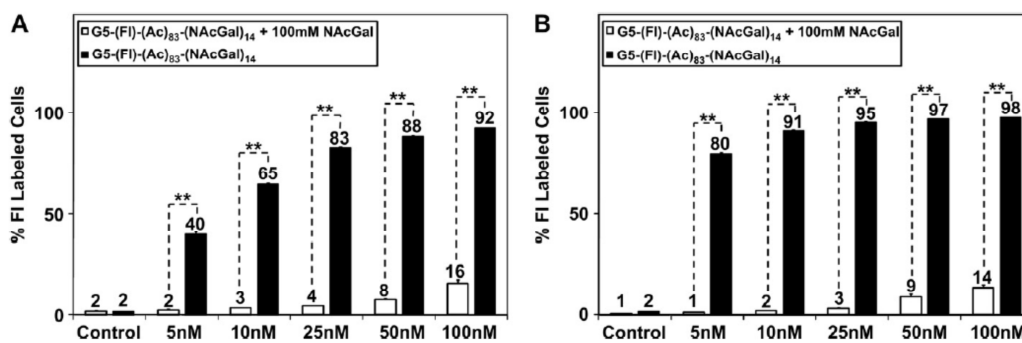


Figure 74 : Internalisation de dendrimères fonctionnalisés dans les cellules HepG2 par des GalNAc en fonction de la dose, de la présence du compétiteur GalNAc libre (barres blanches) et du temps d'incubation (2h à gauche, 24h à droite). D'après Medina *et al., Biomaterials*, 2011, 32, 4118.²³⁷

Il est également possible de raisonner en termes de déplacement de moyenne d'intensité de fluorescence. Kikkeri *et al.*²³⁸ ont étudié l'internalisation de « Quantum Dots » (QDs), nanostructures semi-conductrices, fonctionnalisés par des GalNAc dans les cellules HepG2 par cytométrie en flux. Ils comparent qualitativement l'augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules HepG2 après incubation avec le ligand fluorescent (figure 75).

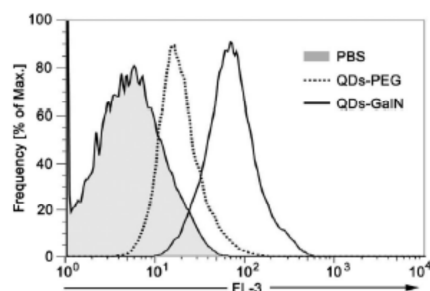


Figure 75 : Internalisation de Quantum-Dots (QDs) fonctionnalisés par des GalNAc dans les cellules HepG2. Le contrôle négatif est du tampon PBS (1×) seul. L'intensité de fluorescence des cellules est plus forte pour les QDs fonctionnalisés par le GalNAc que ceux fonctionnalisés par des chaînes polyéthylène glycol (PEG). D'après Kikkeri *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 4, 105.²³⁸

Ces différents exemples montrent qu'il est possible de comparer plusieurs glycoconjugués en fonction de leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques. Néanmoins, ces analyses restent qualitatives : elles renseignent sur l'existence de l'internalisation mais pas sur son efficacité.

La stratégie proposée par Khorev *et al.*¹²⁶ est la plus **quantitative** de toutes. Elle se déroule en deux temps : **expériences de saturation des récepteurs, puis expériences de compétition et établissement d'IC₅₀**.

L'étude porte ici sur un glycoconjugué trivalent présentant des GalNAc de configuration anomérique β avec des espaceurs flexibles de taille optimale (7). Celui-ci est comparé à un glycoconjugué contrôle aux bras espaceurs courts (8) ne satisfaisant pas à une reconnaissance efficace par ASGP-R, portant trois Galactoses (Gal) (figure 76).

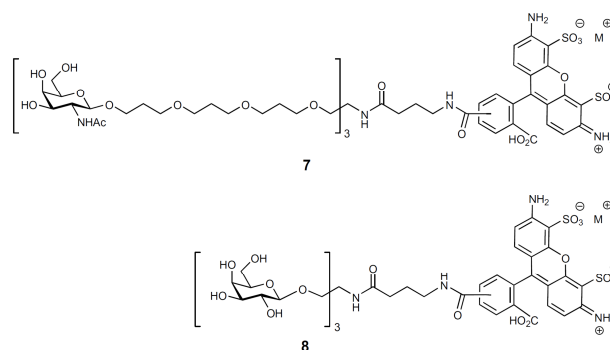


Figure 76 : Glycoconjugués trivalents 7 et 8 de l'étude de Khorev *et al.* marqués par le fluorophore Alexa Fluor 488® : 7 est un ligand portant des GalNAc et 8 un contrôle aux bras espaceurs plus courts portant des Gal. D'après Khorev *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 5216.¹²⁶

L'étude de la saturation des récepteurs par le ligand 7 a pour but d'élucider son mode d'internalisation dans les cellules hépatiques. Elle consiste en l'incubation des cellules avec une gamme de concentration croissante en glycoconjugué 7 marqué par la sonde Alexa Fluor 488®. Puis, la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules pour chaque condition d'incubation est évaluée par cytométrie en flux. Par le tracé de l'intensité médiane de fluorescence des cellules en fonction de la concentration en glycoconjugué, une courbe de saturation des récepteurs est obtenue. Deux types cellulaires sont utilisés : les cellules HepG2 qui sont des hépatocytes humains exprimant ASGP-R, et les cellules SK-Hep1 qui sont des cellules humaines endothéliales n'exprimant pas le récepteur. La courbe de saturation réalisée avec le glycoconjugué 7 a l'allure d'une hyperbole avec palier de saturation

(figure 77). Ceci est caractéristique d'une internalisation active médiée par un récepteur. Celle obtenue pour la lignée SK-Hep1 est une fonction affine de faible pente, témoignant d'une faible internalisation passive. Cette expérience de saturation atteste donc de l'internalisation sélective du glycoconjugués dans les lignées cellulaires exprimant ASGP-R.

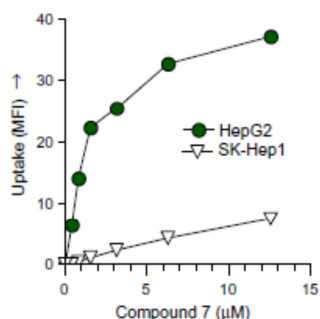


Figure 77 : Expérience de saturation des récepteurs sur cellules HepG2 par le composé 7 de 0 à 12,5 μM (incubation 40 min à 37°C). D'après Khorev *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 5216.¹²⁶

Néanmoins, les valeurs de médiane d'intensité de fluorescence obtenues ne peuvent pas être utilisées directement pour évaluer l'efficacité d'internalisation des glycoconjugués dans les cellules. En effet, l'intensité de fluorescence n'est pas une donnée quantifiable parce qu'elle dépend directement de l'environnement chimique dans lequel la molécule se trouve. La fluorescence émise par les fluorophores organiques tel l'Alexa Fluor 488® ou les Cyanines fluctuent en fonction du pH ou du potentiel oxydo-réducteur du milieu. L'extinction de telles sondes fluorescentes représente également une entrave à la quantification de la fluorescence. Or, il est nécessaire de quantifier l'internalisation des différents glycoconjugués pour pouvoir les comparer. C'est pourquoi des expériences de compétition sont réalisées. Les glycoconjugués 7 et 8 à concentration fixe de 10 μM sont mis en compétition avec deux compétiteurs non marqués. Le premier compétiteur est le GalNAc libre (de 0,6 à 200 mM) et le deuxième l'asialofétuine (de 0,6 à 200 μM), une glycoprotéine ligand naturel de l'ASGP-R. Grâce à ces compétitions, des IC_{50} sont calculés ; elles correspondent à la concentration en compétiteur pour 50% d'inhibition de l'internalisation du glycoconjugué marqué. Ce sont ces valeurs d' IC_{50} qui permettent de comparer les différents glycoconjugués entre eux pour un compétiteur donné (figure 78).

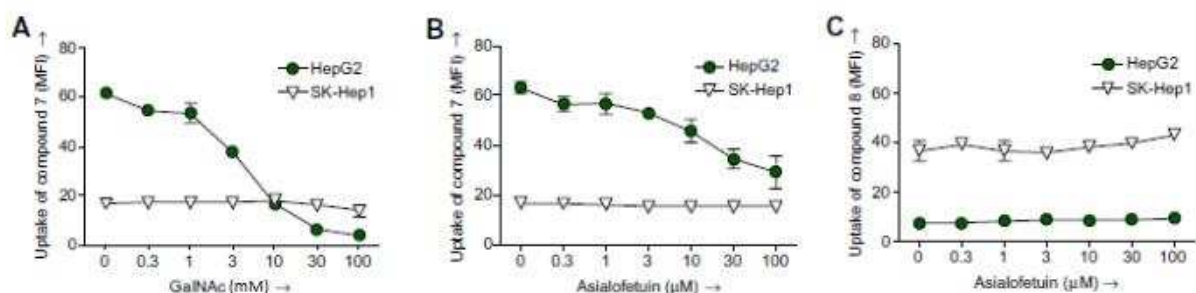


Figure 78 : Compétition d'internalisation entre le composé 7 (10 μM) et le GalNAc (0-100 mM) (A) ou l'asialofétuine (0-100 μM) (B) sur cellules HepG2 et SK-Hep1 par mesure de l'intensité médiane de fluorescence. Le composé 8 (10 μM) n'est pas affecté par la présence du compétiteur asialofétuine (0-100 μM). D'après Khorev *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, (16), 5216.¹²⁶

Pour le composé 7, les IC_{50} obtenues sur cellules HepG2 sont respectivement de $4,5 \pm 0,3$ mM pour le GalNAc et 46 ± 3 μ M pour l'asialofétuine (figure 78). Ces valeurs témoignent d'une forte interaction du glycoconjugué avec la lectine parce que celui-ci est environ 500 fois mieux internalisé que le GalNAc seul et 5 fois plus que l'asialofétuine. Sur les cellules SK-Hep1, l'internalisation observée est très faible et n'est pas affectée par la présence du compétiteur. C'est donc une preuve supplémentaire de la sélectivité vis-à-vis du récepteur ASGP-R.

Pour le composé 8, l'internalisation n'est pas affectée par la présence du compétiteur asialofétuine quel que soit le type cellulaire : ce glycoconjugué n'est donc pas ou beaucoup moins efficacement internalisé par les ASGP-R que 7 (figure 78). Cette perte d'affinité pour les ASGP-R peut être due soit à la substitution des unités GalNAc par des Gal, connus pour interagir plus faiblement avec le récepteur, soit aux bras espaceurs plus courts qui peuvent diminuer l'effet de multivalence en ne permettant pas l'interaction simultanée de plusieurs sucres avec les différents domaines de la lectine.

Une stratégie similaire a été utilisée au cours de ma thèse. Cette approche quantitative par la cytométrie en flux, assez novatrice et encore peu utilisée, permet à la fois de comprendre le mécanisme d'internalisation (actif ou passif), d'évaluer l'efficacité de l'internalisation médiée par le récepteur et enfin de comparer les différents glycoconjugés entre eux. Elle répond donc à toutes les objectifs définis dans le II-1).

III.2) Marquage des glycoconjugés

Afin de pouvoir suivre leur internalisation par cytométrie en flux, les différents glycoconjugés sont marqués par une sonde fluorescente.

Le choix du fluorophore s'est porté sur la di-sulfo-cyanine 5 (figure 79).²³⁹ La cyanine 5 est un fluorophore organique classiquement utilisé en cytométrie. Ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont compatibles avec le cytomètre utilisé, et se situent dans une gamme pour laquelle l'autofluorescence des cellules est minimale. Cette sonde est connue pour sa forte intensité de fluorescence, sa faible interaction non spécifique avec les biomolécules et sa stabilité en milieu biologique. Son bon rendement quantique (= nombre de photon émis / nombre de photon absorbé) assure la réalisation de toutes les étapes de synthèse et étude biologique sans avoir à faire face à une extinction trop rapide de la fluorescence. Sa très bonne stabilité chimique et sa disponibilité dans un large choix de fonctionnalisation favorise son utilisation en dernière étape de synthèse ainsi que sa purification par chromatographie liquide haute pression en phase inverse (RP-HPLC). En effet, lors de précédents travaux, l'utilisation de la sonde fluorescente TRITC a occasionné quelques difficultés lors de l'étape de purification (dégradation de l'excès de TRITC sur la colonne), et avait montré une forte sensibilité à l'extinction de fluorescence.¹³ Enfin, la présence des deux groupements sulfonates rend la sonde hautement soluble dans l'eau, ce qui évite tout problème de solubilité des glycoconjugés marqués en solution aqueuse et surtout en milieu biologique.²³⁹

Propriétés	
Maximum d'excitation (nm)	646
Maximum d'émission (nm)	664
Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)	250 000*
Rendement quantique	0,27*
Temps de vie de fluorescence (ns)	1,0

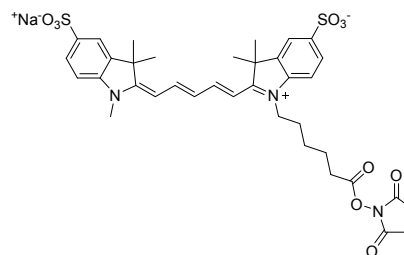


Figure 79 : Structures et propriétés de la sulfo-cyanine 5 activée par un ester succinimide. * Mesuré en tampon phosphate. D'après Mujumdar *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 1993, 4, 105.²³⁹

III.3) Choix du type cellulaire et culture

Les cellules utilisées pour mener les expériences de cytométrie en flux sont les **cellules HepG2**, et plus particulièrement leur dérivé C3A. Ce sont des **cellules humaines hépatiques cancéreuses** bien différenciées provenant d'une biopsie effectuée sur un hépatoblastome, une tumeur maligne du foie. Elles constituent un bon modèle des hépatocytes humains tels qu'ils sont présents *in vivo* et ont entre autre conservé plusieurs fonctions des cellules du foie humain telles que la synthèse d'albumine ou de lipoprotéines.²⁴⁰ Ces cellules **expriment la lectine ASGP-R de manière abondante**, environ 76 000 sites de reconnaissance à haute affinité par cellules.^{241,242} Pour comparaison, ce nombre est estimé entre 50 000²⁴³ et environ 500 000⁹² sur les hépatocytes de rat fraîchement isolés. C'est le modèle cellulaire le plus décrit et il est largement utilisé depuis 30 ans pour l'étude du récepteur ASGP-R.

L'avantage de ces cellules est leur facilité d'usage pour la culture cellulaire et les expériences de cytométrie. C'est une lignée cancéreuse, donc robuste et de temps de génération rapide (48h). Leur résistance autorise l'emploi d'antibiotiques dans le milieu de culture et rend les manipulations et traitements chimiques ou enzymatiques plus aisés. L'inconvénient est qu'elles sont fortement adhérentes, ce qui complique leur mise en suspension et donc l'acquisition en cytométrie.

Un **contrôle cellulaire** n'exprimant pas le récepteur ASGP-R est également utilisé. Pour cela, nous avons choisi les **cellules HeLa**. Ce sont des cellules humaines épithéliales d'adénocarcinome, tumeur développée au sein d'un épithélium glandulaire, ici le col de l'utérus. Elles forment la première lignée immortelle humaine établie.²⁴⁴ Ces cellules sont elles aussi très connues, décrites et très couramment utilisées en biologie cellulaire ; elles font encore l'objet de nombreux articles et livres. Elles ont l'avantage, tout comme les HepG2, d'être d'origine humaine et cancéreuse. Elles représentent un bon modèle de l'organisme humain et sont faciles d'utilisation. Elles aussi sont adhérentes. Il est important de faire preuve de rigueur pour la culture des cellules HeLa, qui sont hautement invasives et connues pour leur forte propension à contaminer les autres cultures cellulaires.²⁴⁵

III.4) Conditions d'incubation et d'acquisition au cytomètre

Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules sont incubées avec les glycoconjugués dans des plaques 12 puits. Ces dernières sont introduits à froid de manière à bloquer les mécanismes d'endocytoses qui pourraient débiter pendant le temps de

préparation de la plaque. Lors des expériences de compétition, le glycoconjugué et son compétiteur sont introduits simultanément dans les puits sans pré-incubation (figure 80).

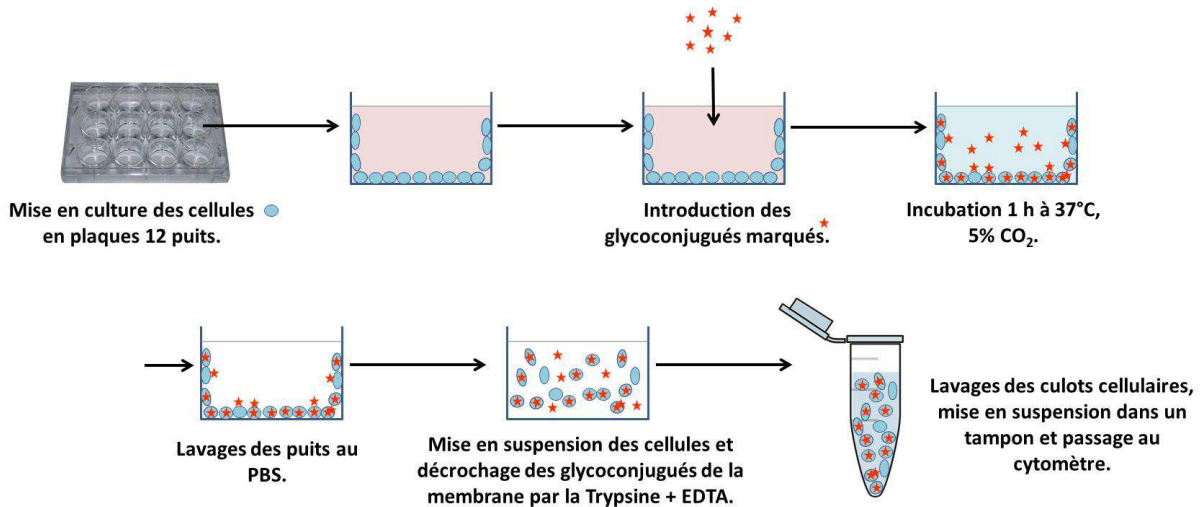


Figure 80 : Etapes de préparation des cellules pour la cytométrie en flux.

Après l'incubation à 37°C, les cellules sont lavées et mises en suspension pour leur passage au cytomètre. Les puits sont tout d'abord lavés à plusieurs reprises avec du PBS froid afin d'éliminer toute trace de glycoconjugué en solution. Puis les cellules sont décrochées et nettoyées à l'aide d'un traitement chimique et enzymatique. Celui-ci est composé de Trypsine, une protéase membranaire qui hydrolyse les protéines à la surface des cellules, et d'EDTA, qui inhibe les mécanismes membranaires calcium et magnésium dépendants (figure 80).

Le traitement à la trypsine-EDTA est crucial parce qu'il permet de rompre les interactions entre la lectine et son ligand.²⁴⁶ En effet, la trypsine hydrolyse les liens peptidiques et digère donc les protéines membranaires. De plus l'interaction du sucre avec le domaine de reconnaissance de l'ASGP-R étant un mécanisme calcium dépendant, elle est inhibée par l'EDTA qui est un ligand de forte affinité pour ce métal ($\log K_d = 10,85$). **Ceci permet de détacher tous les ligands adsorbés à la surface des cellules et ainsi de s'assurer que l'intensité de fluorescence mesurée en cytométrie correspond exclusivement aux composés internalisés dans les cellules.**

Enfin, les cellules sont mises en suspension dans un tampon de dissociation non enzymatique. Ce tampon, composé d'EDTA et PBS sans calcium ni magnésium, limite les phénomènes d'adhésion cellulaire afin que les cellules soient bien dissociées. Les suspensions sont ensuite conservées en tubes polypropylène dans la glace avant le passage au cytomètre de manière à ralentir les mécanismes cellulaires (que ce soit l'adhésion ou bien une possible excrétion des glycoconjugués) (figure 80).

La sélection de population de cellules saines sur laquelle réaliser les statistiques est basée sur un lot de cellules non traitées. Pour chaque condition d'incubation, environ 20 000 cellules saines sont collectées. La viabilité des cellules de chaque échantillon est estimée par le contrôle de la taille et de la morphologie de la population cellulaire selon la méthode décrite dans la section intitulée « Mesure de la viabilité cellulaire ». Ceci a permis de montrer que les glycoconjugués utilisés ne sont pas cytotoxiques dans les concentrations et

temps d'incubation choisis. Il a notamment été remarqué par cette technique que le GalNAc est toxique envers les cellules à partir d'une concentration de 300 mM (figure 81).

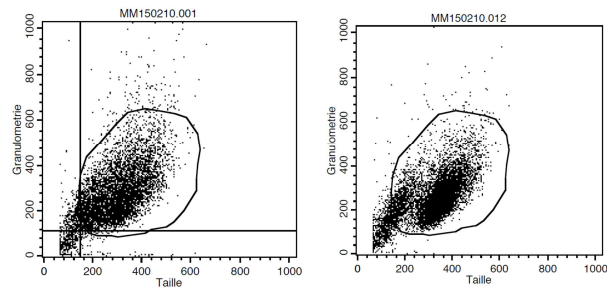


Figure 81 : Diagrammes de la Granulométrie en fonction de la taille de cellules HepG2 seules (à gauche) et en présence de 300 mM de GalNAc (à droite) ; on peut voir qu'à partir de cette forte concentration le GalNAc induit la mort d'une partie des cellules.

La **moyenne d'intensité de fluorescence (MIF)** est exploitée afin d'évaluer l'internalisation des glycoconjugués dans les cellules. L'interprétation des données collectées est réalisée grâce au logiciel Cell Quest Pro®. Comme discuté précédemment les valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence obtenues ne peuvent pas être utilisées directement pour quantifier l'efficacité d'internalisation des glycoconjugués dans les cellules. C'est pourquoi, en s'inspirant des travaux de Khorev *et al.*,¹²⁶ nous avons eu recours à des expériences de saturation des récepteurs et de compétition. Elles permettent de déterminer des EC₅₀ et IC₅₀ et ainsi de pouvoir comparer les différents glycoconjugués.

III.5) Mise au point des expériences de cytométrie en flux

Des tests préliminaires ont été effectués afin de déterminer les **conditions de temps et concentrations d'incubation en glycoconjugués**. Notre choix s'est tourné vers des temps d'incubation courts sur le modèle des travaux de Khorev *et al.*¹²⁶ (incubations de 40 à 60 minutes). En effet, à 37°C, le processus d'endocytose par l'ASGP-R est rapide, il est estimé à environ 11 minutes pour les cellules HepG2. Avec la protéine ASOR, 8,7 minutes sont nécessaires pour la liaison entre l'ASGP-R et son ligand, 2,3 minutes pour l'endocytose et il faut compter environ 4 minutes supplémentaires pour la dissociation du complexe lectine-ligand et le recyclage du récepteur à la membrane (avec 10⁶ cellules pour 2 µg d'ASOR).⁸⁶ De plus, pour des temps d'incubation longs, les récepteurs sont saturés ce qui donne des résultats beaucoup moins révélateurs,²³⁷ et le biais introduit par l'internalisation passive est accru. Les essais ont ici portés sur des temps d'incubation de 1, 2 et 4 heures pour les glycoconjugués Chel1 et Chel2 marqués.

Pour la mise au point des conditions d'expérimentation, deux concentrations en glycoconjugués sont adoptées : 0,2 et 2 µM.

La fluorescence mesurée au bout d'une heure d'incubation est déjà satisfaisante et largement au-dessus des limites de sensibilité de l'appareil aux deux concentrations (figure 82). Les concentrations et temps choisis satisfont donc à l'étude de l'internalisation de Chel1 et Chel2 dans les HepG2. Par ailleurs, on remarque que l'intensité moyenne de fluorescence est multipliée par un facteur 1,5 environ entre 1 et 2 heures d'incubation, et d'un facteur 1,8 entre 1 et 4 heures. Le gain d'intensité entre 2h et 4h n'est donc pas significatif, un plateau de fluorescence est atteint. Or, il est important de se placer en amont

de ce plateau de manière à observer l'équilibre d'association du complexe ligand-lectine et ainsi comparer l'efficacité de reconnaissance des différents ligands. En tenant compte de ce plateau de fluorescence et afin de minimiser les effets de l'internalisation passive des composés, le temps d'incubation de 1h est retenu pour la suite des expériences de cytométrie.

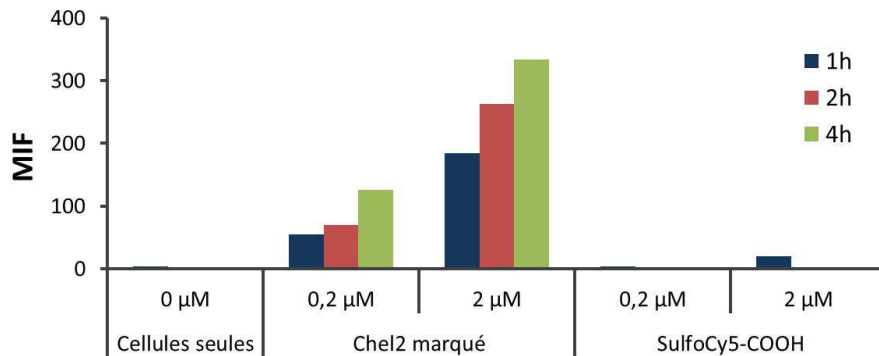


Figure 82 : Mise au point des conditions de concentration et temps d'incubation pour les expériences de Cytométrie en Flux. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

III.6) Expériences de saturation des récepteurs

Comme expliqué précédemment, la première étape de l'étude consiste à déterminer le mécanisme d'internalisation des glycoconjugués dans les cellules hépatiques. Sur le modèle des travaux de Khorev *et al.*¹²⁶, pour cela des expériences de saturation des récepteurs ont été réalisées. Les cellules HepG2 ont été incubées 1h avec une gamme de concentration croissante en glycoconjugués marqués, de 0 à 15 μM. L'allure de la courbe de d'intensité moyenne de fluorescence de la sulfo-cyanine 5 en fonction de la concentration en glycoconjugué permet de conclure sur la nature du mécanisme d'internalisation. Une hyperbole avec palier de saturation est caractéristique d'une **internalisation active médiée par un récepteur**. Une fonction affine témoigne plutôt d'une internalisation passive, mais la conclusion est moins évidente. En effet, en présence d'un ligand de faible affinité et à des concentrations insuffisantes pour obtenir le palier de saturation, il n'est pas possible de conclure sur le mécanisme avec certitude (figure 83).

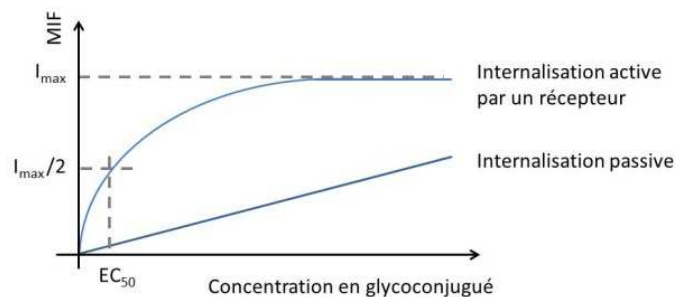


Figure 83 : Allures des courbes de saturation pour une internalisation active ou passive et détermination d'EC₅₀.

Cette étape n'est pas seulement informative d'un point de vue mécanistique mais constitue également un outil d'évaluation de l'efficacité d'internalisation des glycoconjugués dans les cellules hépatiques. Grâce au tracé de la courbe de saturation hyperbolique, l'EC₅₀ des glycoconjugués marqués est calculée. **L'EC₅₀ correspond à la concentration en glycoconjugué pour 50% de saturation des récepteurs** (figure 83). Cette information est donc corrélable à l'affinité du ligand pour son récepteur. Dans le cas de la lectine ASGP-R, l'interaction avec le récepteur se fait de manière multivalente. De plus, la lectine est composée de 2 sous-unités différentes H1 et H2. La sous-unité H2 reste encore peu décrite : les spécificités d'interaction de son domaine de reconnaissance des carbohydrates ne sont pas connues, et son affinité vis-à-vis du GalNac diffère celle de H1.¹²⁹ Il est donc compliqué de calculer la relation entre l'EC₅₀ et une constante d'affinité ligand-récepteur.

Le calcul d'EC₅₀ est réalisé à l'aide du logiciel *Origin*® 9. La courbe de saturation est modélisée par l'équation de Hill, couramment utilisée en pharmacologie pour traduire une activation de récepteur ou une inhibition enzymatique.^{247,248}

L'équation est la suivante :

$$y = y_{\max} \times x^n / (EC_{50}^n + x^n)$$

Avec y_{\max} la valeur de y à saturation du récepteur

EC₅₀ la valeur de x pour une demi saturation du récepteur (soit pour $y = y_{\max} / 2$)

et n le coefficient de Hill (ou pente à l'origine) qui reflète le nombre de ligands liés par récepteur.

Cette équation à trois paramètres est une généralisation de l'équation de Michaelis-Menten qui n'est qu'à deux paramètres parce qu'elle ne prend pas en compte le paramètre n (modèle de stœchiométrie 1:1). La valeur du coefficient de Hill n'est cependant pas interprétable dans notre cas puisque nous ne détenons pas assez d'information sur l'interaction multivalente ligand-lectine ASGP-R.^{248,249}

La comparaison des EC₅₀ entre les différents glycoconjugués donne une idée de l'échelle d'affinité pour le récepteur : plus un glycoconjugué a une faible EC₅₀, plus son affinité pour la lectine est forte parce qu'une faible quantité suffit à les saturer. L'erreur estimée pour chaque EC₅₀ est évaluée par duplication des expériences de saturation.

Il est à noter que la saturation dépend du nombre de récepteurs à la surface des cellules. Par conséquent, les mesures d'EC₅₀ sont sensibles au niveau d'expression de l'ASGP-R à la surface, qui peut être altéré par le vieillissement. Afin de s'affranchir de ce facteur et ainsi gagner en précision de mesure, des expériences de compétition sont effectuées. Par compétition, une affinité relative entre deux ligands vis-à-vis des récepteurs est observée. Les IC₅₀ obtenues ne sont donc pas dépendants du nombre d'ASGP-R.

III.7) Expériences de compétition

Dans le but d'évaluer avec précision l'efficacité d'internalisation des différents glycoconjugués en fonction de paramètres architecturaux variés, des expériences de compétition ont été réalisées. Elles consistent à incuber simultanément les cellules avec une concentration fixe en glycoconjugué marqué et une concentration variable en compétiteur

non marqué. Le compétiteur, interagissant lui aussi avec l'ASGP-R, inhibe l'interaction entre le glycoconjugué et la lectine et de ce fait diminue le taux d'internalisation du composé marqué. Ceci se traduit par une diminution de l'intensité moyenne de fluorescence avec l'augmentation de la concentration en compétiteur (figure 84). **L'IC₅₀ ainsi déterminée correspond à la concentration en compétiteur pour 50% d'inhibition de l'internalisation du glycoconjugué marqué**, soit 50% de diminution de l'intensité de fluorescence par rapport à l'intensité obtenue sans compétition. Plus l'interaction du glycoconjugué avec la lectine est forte, et plus la quantité de compétiteur à ajouter pour inhiber son entrée est grande (figure 84). Par conséquent, une **IC₅₀ élevée est gage d'une forte efficacité d'internalisation par la lectine ASGP-R**. Il est important de noter que la notion d'IC₅₀ ici utilisée est l'inverse de celle couramment employée en pharmacologie, où il est plutôt question de potentiel inhibiteur par test d'une molécule antagoniste en concentration variable sur un agoniste connu de concentration fixe.

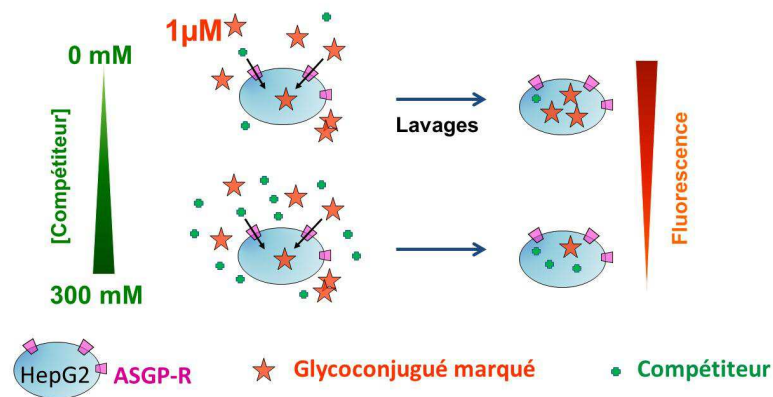


Figure 84 : Principe des expériences de compétition.

Le report de l'intensité moyenne de fluorescence en fonction de la concentration en compétiteur donne, en échelle semi-logarithmique, un sigmoïde décroissant (figure 85). Le calcul d'IC₅₀ est réalisé à l'aide du logiciel *Origin*[®] 9. La sigmoïde est modélisée par l'équation de Hill, couramment utilisée en pharmacologie pour traduire un phénomène dose réponse.^{247,248,250}

L'équation est la suivante :

$$y = A_1 + (A_2 - A_1) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \times p)})$$

Avec A₁ la valeur de y à compétition nulle (palier inférieur),
A₂ la valeur de y à compétition maximale (palier supérieur),
IC₅₀ la valeur de x pour 50% d'inhibition (soit y = (A₂ - A₁) / 2)
et p la pente ou coefficient de Hill (de 1 ou -1 pour une stœchiométrie 1:1, ligand : récepteur ; ici difficilement interprétable parce que deux sites de reconnaissance avec des affinités différentes). Cette équation à quatre paramètres dérive de celle présentée précédemment pour le calcul d'EC₅₀.

Il est possible de relier les valeurs d'IC₅₀ avec des valeurs de K_d dans certaines conditions d'expérimentation via des modèles d'interaction, en étant néanmoins attentif à ne pas sur-interpréter la valeur d'IC₅₀ obtenue.²⁵¹

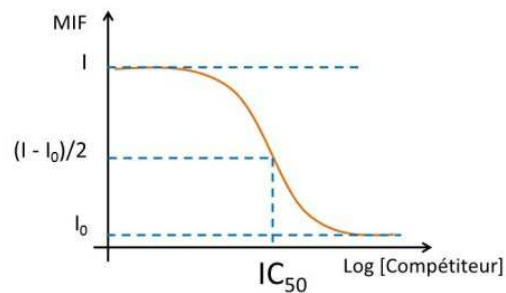


Figure 85 : Allure de la courbe de compétition entre un glycoconjugué marqué et un compétiteur non marqué. L' IC_{50} correspond à la concentration en compétiteur pour 50% d'inhibition de l'internalisation du glycoconjugué marqué. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Deux types de compétition ont été envisagés ici.

Des expériences de **compétition entre un glycoconjugué marqué et un compétiteur de référence** ont été effectuées ; pour cette étude nous avons choisi le GalNAc comme composé monovalent de référence. Les IC_{50} obtenus permettent de comparer les différents glycoconjugués.

Des **compétitions entre glycoconjugués** ont également été réalisées. Elles consistent en la mise en compétition directe d'un glycoconjugué marqué avec différents glycoconjugués non-marqués qui jouent alors le rôle de compétiteurs. Ceci permet la comparaison directe entre deux glycoconjugués.

La **concentration fixe en glycoconjugué** marqué choisie pour la réalisation de toutes les compétitions est de **1 μ M**. A cette concentration, les différents glycoconjugués sont très efficacement internalisés, l'intensité de fluorescence est très supérieure au seuil de détection, et ce n'est pas une condition saturante pour les récepteurs.

Enfin, les compétitions complètent l'étude du mécanisme d'internalisation. En effet, le phénomène d'inhibition en présence du compétiteur témoigne d'une internalisation récepteur-dépendante par l'ASGP-R. De plus, une inhibition totale, visible par un retour à zéro de l'intensité de fluorescence aux plus fortes concentrations en compétiteur, garantit un mécanisme d'internalisation actif et non passif.

Pour aller à l'essentiel

*La stratégie envisagée pour l'étude des glycoconjugués des familles CP et T s'inspire des travaux de Khorev et al.¹²⁶ Elle permet à la fois d'élucider le **mécanisme d'internalisation** dans les cellules hépatiques et de **quantifier l'efficacité d'internalisation** afin de **comparer les différents glycoconjugués** entre eux. Cette quantification s'effectue au moyen de calculs d' EC_{50} et d' IC_{50} . Ces valeurs correspondent respectivement à la concentration nécessaire en glycoconjugué pour 50% de saturation des récepteurs ASGP-R et la concentration en compétiteur pour inhiber 50% de l'internalisation d'un glycoconjugué marqué donné. Enfin, les cellules HepG2 employées représentent un bon modèle pour l'étude du récepteur ASGP-R humain.^{92,240}*

IV - Conclusion

La cytométrie en Flux est une technique puissante **multiparamétrée à large échelle**. Elle peut être utilisée pour de multiples applications et est adaptée à de nombreuses problématiques. Elle constitue un outil de choix dans notre projet, mais reste rarement utilisée dans le contexte des interactions sucres-protéines. Elle permet tout d'abord de travailler sur le type cellulaire d'intérêt, **cellules hépatiques humaines**, qui exprime le récepteur visé, **l'ASGP-R, dans des conditions proches de la physiologie**. De plus, cette technique rend possible une étude élargie à des **populations cellulaires complètes**. Pour chaque cellule des informations telles que l'intensité de fluorescence et la viabilité sont mesurées.

Une étude systématique de l'internalisation des glycoconjugués a donc été réalisée par cytométrie en flux afin d'élucider le **mécanisme d'internalisation** et de **comparer les différents glycoconjugués**. L'influence de **cinq paramètres structuraux** a été évaluée : architecture chimique, valence, configuration anomérique, nature des sucres et longueur des bras espaceurs.

Chapitre III-

La famille des cyclodécapeptides (CP)

La famille CP regroupe des glycoconjugués de nature cyclodécapeptidiques. Ils possèdent une plateforme peptidique bi-fonctionnelle, comportant un cluster de quatre α GalNAc sur une face pour le ciblage des ASGP-R et une unité de chélation du Cu(I) composée de deux Cys sur l'autre face. Les propriétés de chélation *in vitro* et *in cellulo* de ce type de composés ont été présentées dans le chapitre I. Les travaux présentés ici portent exclusivement sur les propriétés de ciblage, afin de déterminer le mécanisme et l'efficacité d'internalisation dans les cellules hépatiques. La capacité de cette famille de composés à cibler les hépatocytes *via* les ASGP-R et l'influence de plusieurs paramètres structuraux sur l'efficacité de ciblage sont analysés par cytométrie en flux.

I - Elaboration des glycoconjugués pour l'étude de l'efficacité de ciblage

I.1) Différents dérivés de la famille CP

Le premier glycoconjugué de la famille CP à avoir été conçu est le cyclodécapeptide Chel1. Son unité de ciblage des ASGP-R est ici étudiée en termes de mécanisme et d'efficacité d'internalisation dans les hépatocytes. Nous avons vu que seule la face supérieure du glycoconjugué est impliquée dans la reconnaissance par la lectine. Or, l'internalisation dans les cellules hépatiques étant analysée par cytométrie en flux, il est nécessaire de marquer les glycoconjugués à l'aide d'une sonde fluorescente, la sulfo-cyanine 5 (Cy5). Afin de ne pas influencer sur l'organisation de la face supérieure du cyclodécapeptide, ce fluorophore est introduit sur la face inférieure, remplaçant ainsi l'unité de chélation (figure 86).

Le glycoconjugué obtenu n'est donc plus capable de piéger le cuivre mais sert de modèle d'étude du ciblage des hépatocytes (figure 86). Son internalisation par endocytose *via* la lectine ASGP-R est évaluée en partant de l'hypothèse que ses propriétés de reconnaissance ne sont pas perturbées par la présence du fluorophore et donc sont identiques à celles de Chel1.

Il est possible que le changement réalisé sur la face inférieure de la molécule change la rigidité globale de la molécule parce que le pont disulfure renforce la structuration du cyclopeptide. Cependant, cette modification est certainement négligeable devant la flexibilité très élevée de présentation des sucres sur la face supérieure *via* la chaîne latérale des Lys.

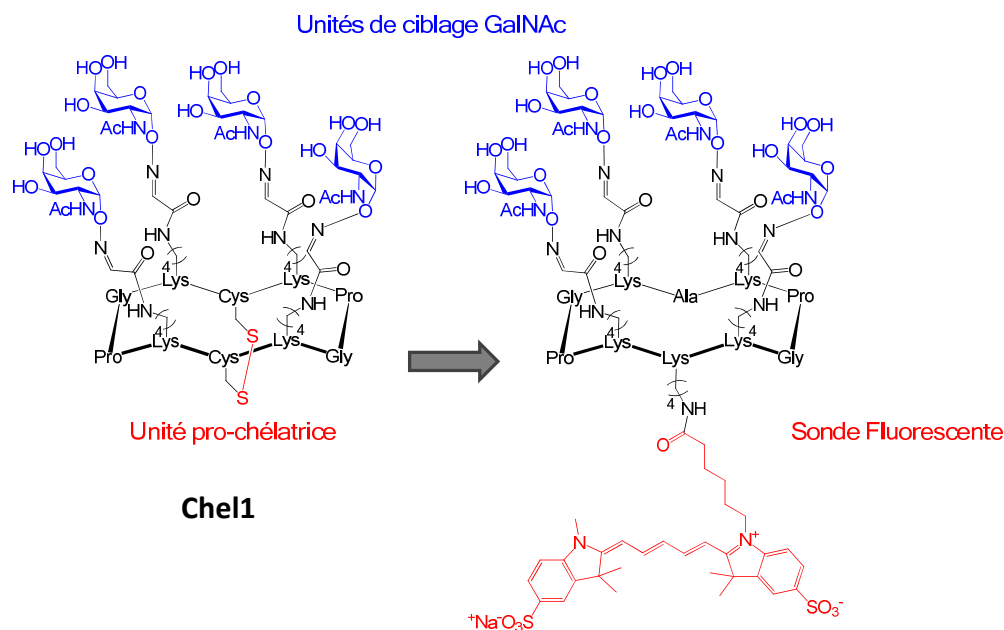


Figure 86 : Modèle de Chel1 pour l'étude de l'internalisation dans les cellules hépatiques par cytométrie en flux.

Comme présenté dans le Chapitre II, l'influence de plusieurs paramètres structuraux sur l'efficacité de ciblage a été étudiée. Différents glycoconjugués d'architecture cyclodécapeptidique dérivés de Chel1 ont donc été synthétisés afin de varier le nombre, la configuration anomérique, la nature des sucres ainsi que la longueur des bras espaceurs reliant les sucres à la plateforme peptidique.

La nomenclature utilisée pour les désigner est la suivante (figure 87) :

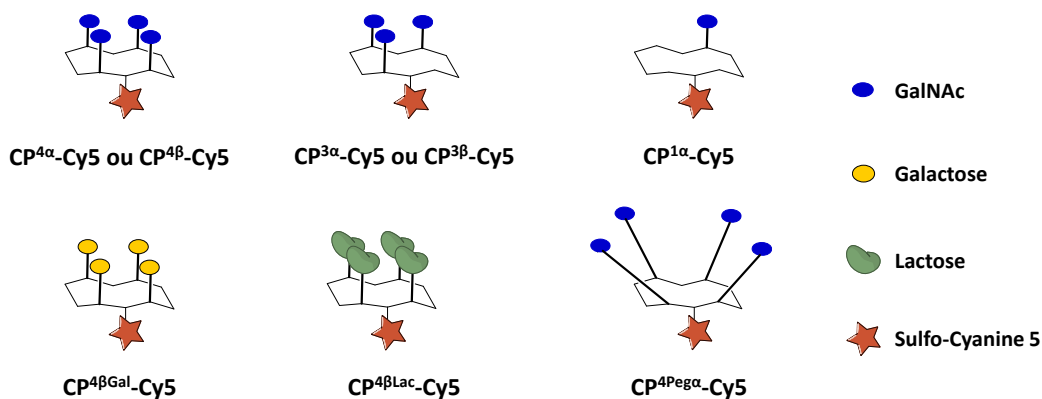


Figure 87 : Nomenclature et représentations schématiques des dérivés cyclodécapeptidiques synthétisés et étudiés par cytométrie en flux.

- **CP** indique que le glycoconjugué possède l'architecture cyclodécapeptidique,
- puis en exposant, les différents paramètres sont indiqués dans l'ordre suivant : **le nombre, la configuration anomérique puis la nature du sucre** (si différente de GalNAc). Par défaut les glycoconjugués sont fonctionnalisés par des GalNAc. Seul un changement de nature du sucre est précisé : par le Galactose, noté Gal ou par le Lactose, noté Lac. Dans le cas d'un allongement des bras espaceurs par un motif polyéthylène glycol la mention « Peg » est indiquée entre le nombre de sucre et leur configuration.

- enfin la mention « -Cy5 » après le nom indique le **marquage du glycoconjugué** par la sulfo-cyanine 5.

Par exemple, CP^{3 α} -Cy5 désigne un cyclodécapeptide portant trois GalNAc de configuration α sur une face et la sonde fluorescente sur l'autre face ; CP^{4 β Gal} désigne un cyclodécapeptide portant quatre Gal en configuration β sur une face et aucune fonctionnalisation de la Lys sur l'autre face (figure 87).

Dans la suite de ce chapitre, la synthèse et l'étude *in cellulo* de l'efficacité d'internalisation de ces différents composés par l'ASGP-R sont présentés.

1.2) Stratégie de synthèse

Les différents dérivés appartenant à la famille des CP sont synthétisés selon la stratégie suivante, décrite depuis plusieurs années au Département de Chimie Moléculaire (DCM) (schéma 1) :

- d'une part, l'unité de ciblage est obtenue par synthèse organique d'un sucre modifié. Il s'agit ici d'introduire une fonction oxyamine en position anomérique, dans les deux configurations α ou β .
- d'autre part le précurseur linéaire décapeptidique est synthétisé sur support solide puis il est cyclisé et fonctionnalisé sur sa face supérieure par une à quatre fonctions aldéhydes en solution.
- les deux unités sont assemblées entre elles par ligation chimiosélective de type oxime.
- enfin, le marquage par la sonde fluorescente est réalisé sur l'amine libre de la Lys présente sur la face inférieure.

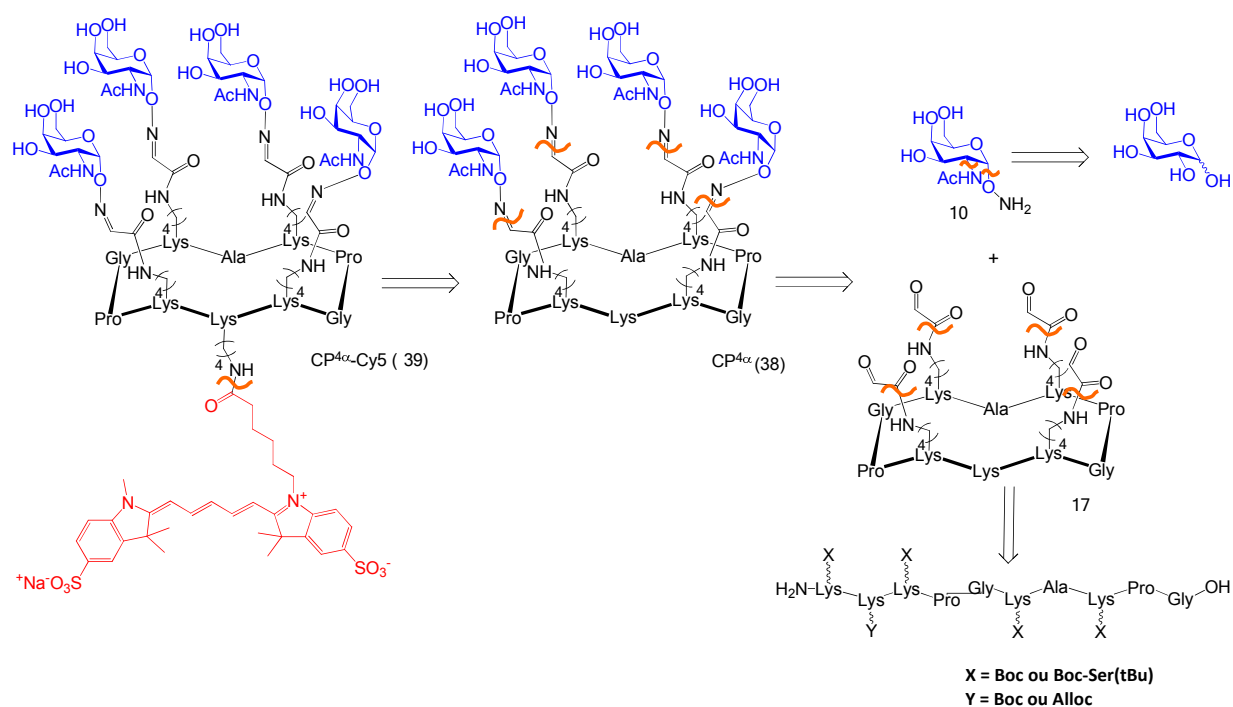


Schéma 1: Rétrosynthèse pour CP^{4 α} -Cy5. En bleu : unité de ciblage sucre modifié ; en rouge : Cy5 ; en noir : plateforme cyclodécapeptidique.

Les différentes étapes sont ici décrites indépendamment, et d'une manière commune à tous les dérivés.

1.3) Synthèse de l'unité de ciblage

Deux variations de paramètres concernent la synthèse de l'unité de ciblage : la configuration anomérique et la nature des sucres. L'influence de la configuration anomérique des sucres n'est étudié que pour les GalNAc. Les Lac et Gal sont obtenus en configuration β . Les conditions de réaction pour l'obtention de divers sucres fonctionnalisés par une fonction oxyamine ont été résumées par décrites au DCM.^{252,253}

1.3.a - Généralités sur la synthèse de sucres modifiés

Les sucres sont des molécules biologiques portant plusieurs fonctions alcool de réactivité comparable, excepté l'alcool primaire et celui en position anomérique. De plus, ils possèdent une stéréochimie particulière en **position 1 dite anomère**, pouvant être de configuration α , substituant en axial par rapport au plan moyen du cycle dans la majorité des cas, ou β , substituant en équatorial par rapport au plan moyen du cycle (figure 88).

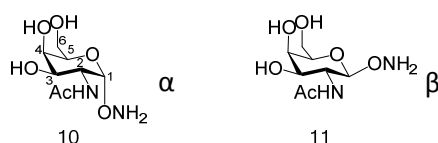


Figure 88 : GalNAc α ONH₂ et GalNAc β ONH₂.

Avant de pouvoir modifier chimiquement un sucre, il est nécessaire de **protéger ses différentes fonctions** avec des groupes protecteurs adéquats, afin que la modification puisse être régiosélective et induire la bonne stéréochimie. Ces groupes doivent être stables dans les conditions de synthèse, et les conditions de déprotection des différents groupes sont nécessairement orthogonales suivant la position du sucre à fonctionnaliser.

L'introduction d'un groupement en position anomère est appelée couplage glycosidique ou **glycosylation**. Elle implique la réaction entre un sucre donneur, c'est-à-dire activé en position anomère par un bon groupe partant, et un accepteur nucléophile, comme des fonctions alcools ou amines. Cette réaction est catalysée par un promoteur, en général un acide de Lewis, qui active le donneur en favorisant le départ du groupe partant (figure 89).

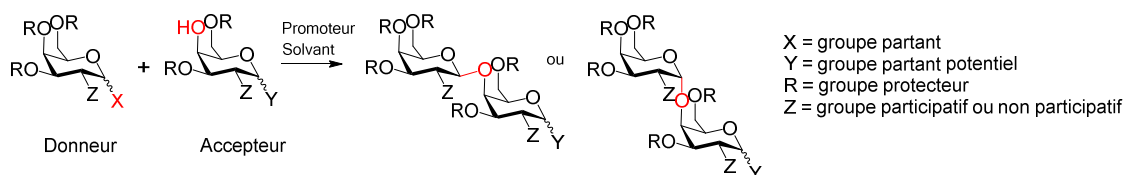


Figure 89 : Couplage glycosidique entre un sucre donneur activé par un bon groupe partant et un sucre accepteur possédant un groupement nucléophile ; le choix des groupements protecteurs des hydroxyles, de l'activateur, du promoteur et des conditions de réaction sont décisifs pour la régio- et stéréosélectivité de la glycosylation.

Le choix du groupe en position C₂ est crucial car il détermine la stéréochimie de la position anomère (groupe Z sur la figure 89). Un groupe est participant si, par un phénomène appelé **assistance anchimérique**, il stabilise l'état intermédiaire oxonium formé par le départ du nucléofuge lors de la substitution nucléophile. Cet état intermédiaire stabilisé favorise une attaque nucléophile en β par un encombrement de la face inférieure du sucre (figure 90). Le solvant influence également la configuration ; par exemple l'éther est connu pour favoriser la configuration α tandis que l'acétonitrile favorise la configuration β.²⁵⁴

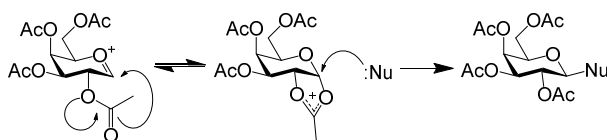


Figure 90 : Assistance anchimérique du groupement protecteur acétyle en position 2.

En l'absence de groupe participant, la configuration α est obtenue majoritairement lors de l'introduction d'un groupe polaire X en position 1 parce qu'elle est thermodynamiquement favorisée par **l'effet anomère**. Cet effet est dû à une hyperconjugaison entre l'orbitale anti-liante de la liaison C₁-X et le doublet non liant de l'oxygène endocyclique du sucre, ainsi qu'à un effet de répulsion électrostatique.

I.3.b - Synthèse des GalNacαONH₂ et GalNacβONH₂

La voie de synthèse du GalNac oxyamine de configuration α et β utilisée ici a été décrite et optimisée par Renaudet *et al.*^{252,253} Le galactal est utilisé comme synthon de départ, de manière à s'affranchir de la participation du NHAc en position C₂ ; il a été synthétisé à partir du D-galactose, selon la procédure décrite dans la littérature.^{255,256} La synthèse du GalNac oxyamine s'effectue en neuf étapes, et elle est bien décrite pour le GalNacαONH₂.²⁵³ Quelques conditions de réaction ont été modifiées par rapport à la littérature, notamment en ce qui concerne les dernières étapes qui ont été optimisées pour le GalNacβONH₂.^{257,258}

Les 7 premières étapes sont communes aux deux configurations anomériques. Puis, les deux GalNac de configurations différentes sont séparés après l'étape de glycosylation (schéma 2). Les rendements globaux sur les 9 étapes sont de 7% pour l'anomère α et de 1% pour l'anomère β.

Dans un premier temps, les hydroxyles du galactose sont protégés par acétylation, donnant le sucre **1**.^{259,260} Celui porté en C1 possède une réactivité différente parce que ce n'est pas une simple fonction alcool mais un hémiacétal cyclique. Son acétylation ne donne donc pas un ester mais un acétal, qui est déprotégé sélectivement en milieu acide. Ainsi, une bromation est ensuite sélectivement réalisée en position anomère par HBr à 30% dans l'acide acétique (**2**). Le D-Galactal **3** est ensuite formé à l'aide d'une réduction par le zinc de type Tipson Cohen (schéma 2).²⁶¹ L'intérêt de l'obtention du galactal est d'introduire un groupement azoture en position 2, qui sert de précurseur du NHAc et n'est pas participant lors de la réaction de glycosylation. Ceci est réalisé par azidonitration en présence de Cérium

Ammonium Nitrate (IV) ainsi que de l'azoture de sodium, décrite par Lemieux et Ratcliffe.²⁶² Le 2-azido-2-déoxy glycosylnitrate **4** est obtenu selon un mécanisme radicalaire impliquant la réduction du cérium ainsi que la perte d'un électron de l'azoture, qui interagit alors avec la double liaison glycale (schéma 2). Le rendement de ces 4 premières étapes est d'environ 41%.

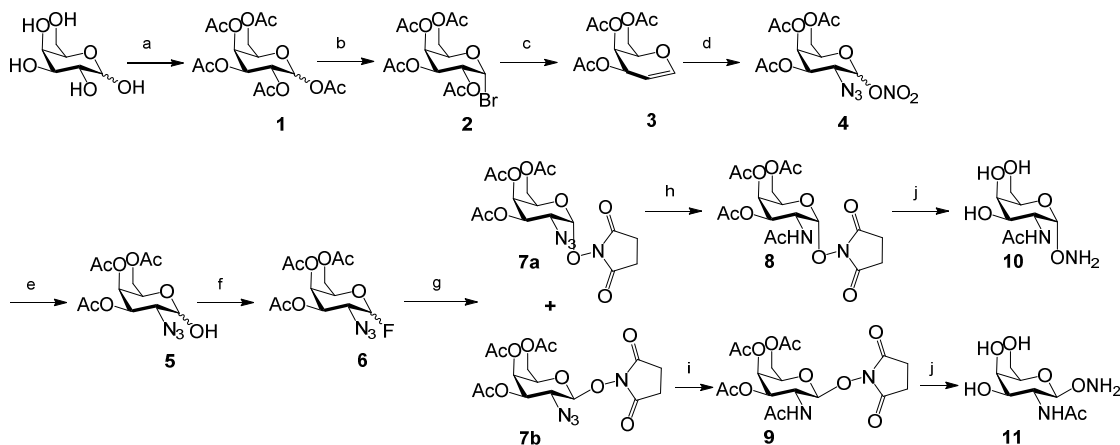


Schéma 2 : Synthèse du GalNAc oxyamine : (a) Ac₂O/ pyridine (25 eq.), 9h, t.a. ; (b) HBr /AcOH (33%) (3 eq.), 2h, t.a. ; (c) Zn (16 eq.), CuSO₄ (0,29 eq.), NaH₂PO₄ (pH 4,21), Ac₂O, 30 min., t.a. ; (d) CAN (3 eq.), NaN₃ (3 eq.), CH₃CN, 3h, -15 °C (41% over the last 4 steps) ; (e) PhSH (3 eq.), DIPEA (1,2 eq.), CH₃CN, 2h, 0 °C (96%) ; (f) DAST (1,2 eq.), THF, 2h, -40 °C ; (g) *N*-hydroxysuccinimide (2 eq.), BF₃.Et₂O (4 eq.), Et₃N (2 eq.), CH₂Cl₂, 3h, t.a. (α = 61% ; β = 24%) ; (h) H₂, Pd/C (10%, 1 eq.), MeOH/Ac₂O (9 :1), 1h30, t.a. (30%) ; (i) PPh₃ (1,3 eq.), CH₂Cl₂, Ac₂O (5 eq.), 4h, t.a. (15%) ; (j) N₂H₂ (50 eq.), EtOH, 12h, t.a. (95%).

Il est ensuite nécessaire d'activer la position anomérique en vue de la glycosylation par un bon nucléofuge. L'halogène choisit est un fluor plutôt qu'un brome ou un chlore en raison de la meilleure stabilité notamment vis-à-vis de l'hydrolyse. Pour cette étape, deux méthodes sont possibles :

- La première est une fluoration directe du galactose azidonitré **4** par un mélange d'HF/Et₃N ;²⁶³ elle a l'avantage de n'impliquer qu'une seule étape réactionnelle.
- La seconde est celle réalisée ici. Elle implique au-préalable une étape d'hydrolyse donnant le composé **5** qui est ensuite fluoré par le diéthylaminosulfur trifluoride (DAST) pour obtenir le sucre activé **6**.^{264,265} L'avantage de la deuxième méthode est que les conditions de réaction sont plus douces, et le DAST est moins délicat à manipuler. L'hydrolyse est ici accomplie par le thiophénol, plutôt qu'avec la procédure décrite impliquant un mélange eau/dioxane en présence de nitrite de sodium (schéma 2).^{266,267}

Une fois le sucre activé en position anomère, il est possible d'établir un couplage glycosidique entre celui-ci et un *N*-hydroxysuccinimide (NHS), précurseur de la fonction oxyamine, en présence de BF₃.Et₂O. Le *N*-hydroxysuccinimide est utilisé à la place du phthalimide parce qu'il est plus stable lors de l'étape suivante de réduction. L'anomère α **7a** est obtenu en majorité devant le β **7b**, avec un ratio 6/2, grâce à l'effet anomère ainsi que l'effet non participant du groupement azoture lors de l'étape de glycosylation. Une purification sur colonne de silice est réalisée afin de séparer les deux anomères α et β , avec des rendements de 61% et 24% respectivement. Ceux-ci sont ensuite traités indépendamment.

Le composé **7a** est réduit en amine par hydrogénation catalytique, sous atmosphère de dihydrogène à l'aide de palladium sur charbon activé (10%) comme catalyseur. L'amine

formée est acétylée *in situ* dans un mélange MeOH/Ac₂O (9 :1), de manière à obtenir l'GalNAcαONHS acétylé **8**. Cette réaction n'a pas donné de bons résultats sur le composé d'anométrie β **7b**. En effet le produit de dégradation dus à la rupture de la liaison N-O du succinimide sensible à la réduction est formé. Une réduction sélective de l'azoture par réaction de Staudinger en présence de triphénylphosphine a donc été tentée.^{268,269} La phosphine réagit avec l'azoture, donnant une phosphinimine en équilibre avec la forme aza-ylide. Puis l'ajout d'anhydride acétique acétyle l'azote de l'aza-ylide en NHAc, libérant de l'oxyde de triphénylphosphine. L'acétylation de la phosphinimine n'étant pas totale, le composé **9** est obtenu avec un rendement de 15%. Ces conditions peuvent être améliorées par une étape d'hydrolyse de la phosphinimine, jusqu'à atteindre 35% de rendement.²⁷⁰

La dernière étape est un traitement à l'hydrazine pour la déprotection des hydroxyles et la formation de l'oxyamine grâce à une attaque nucléophile de sur les carbonyles. L'hydrazine est ici utilisée à la place de la méthylhydrazine pour traiter le succinimide car elle est plus nucléophile.²⁵⁷ Les GalNAc oxyamine **10** et **11** ainsi obtenus, respectivement en α et β, sont caractérisés par RMN. Ils vont pouvoir réagir avec les aldéhydes portés par la plateforme peptidique.

I.3.c - Synthèse des unités GalβONH₂ et LacβONH₂

Les synthèses des unités GalβONH₂ et LacβONH₂ ont été réalisées au sein de l'équipe I2BM/DCM/UJF (figure 91). Ces synthèses sont décrites à partir du lactose (Lac) et du galactose (Gal).^{252,253,271-273}

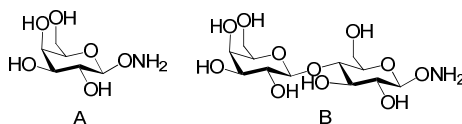


Figure 91 : GalβONH₂ (A) et LacβONH₂ (B).

Le LacβONH₂ et le GalβONH₂ sont obtenus à partir du Lac et du Gal respectivement, tous deux protégés par acétylations. A l'image du GalNAc, le Lac et le Gal acétylés sont activés en position anomère à l'aide d'une fluoruration par le DAST puis glycosylés par un *N*-hydroxyphthalimide en présence de TBAHS (tétrabutylammonium hydrogène sulfate). Dans les deux cas, la configuration anomérique obtenue est la configuration β du fait de la présence de l'acétyle en position 2. Enfin, ces saccharides sont déprotégés par la méthylhydrazine de manière à obtenir **A** et **B**, avec entre 30% et 40% de rendement global.

I.4) Plateforme cyclodécapeptidique

La synthèse de la plateforme cyclodécapeptidique régiosélectivement fonctionnalisable est également décrite et optimisée par Renaudet *et al.*²⁷⁴ Elle est obtenue par la synthèse du peptide linéaire sur support, qui est ensuite cyclisé puis fonctionnalisé par des aldéhydes pour l'introduction des sucres oxyamines. Pour cela, des sérines (Ser) sont introduites sur les chaînes latérales des Lysines (Lys) de la face supérieure du cyclopeptide, et subissent ensuite une coupure oxydatives pour donner des fonctions aldéhydes.

Il est possible de contrôler la valence du support par le choix de la séquence peptidique. Ainsi, la face supérieure est composée de 1, 3 ou 4 Lys pour les valences correspondantes. Les Lys sont remplacées par des alanines (Ala) pour les cyclopeptides de valences inférieures à 4. Enfin, une Ala et une Lys composent la face inférieure pour le greffage du fluorophore (figure 92).

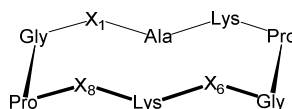


Figure 92 : Plateforme cyclodecapeptidique : pour le monovalent, $X_{1,6 \text{ et } 8} = \text{Ala}$; pour le trivalent, $X_1 \text{ et } X_8 = \text{Lys}$, $X_6 = \text{Ala}$; pour le tétravalent, $X_{1,6 \text{ et } 8} = \text{Lys}$.

I.4.a - La synthèse peptidique sur support solide

Le peptide linéaire protégé précurseur est tout d'abord obtenu par **synthèse sur support solide selon la stratégie Fmoc/tBu**. Ce type de synthèse a été introduit par Merrifield en 1963 et consiste à greffer de manière covalente le premier acide aminé sur un support appelé résine, composé de petites billes de polymères.²⁷⁵ Puis l'élongation de la chaîne peptidique est réalisée à partir de ce premier acide aminé, par substitution nucléophile d'une amine primaire sur une fonction acide carboxylique activée par un agent de couplage. En fin de synthèse, le peptide linéaire est décroché du support et récupéré dans le filtrat. Cette méthode, simple et automatisable, est devenue une technique de routine en synthèse peptidique.

L'élongation peptidique se fait de l'extrémité C-terminal vers la N-terminale afin qu'il n'y ait pas de perte de stéréochimie, dite épimérisation, par formation d'un oxazolone. Les couplages peptidiques ont donc lieu par réaction entre le COOH libre de l'acide aminé en solution et le NH₂ en α (Nα) du peptide accroché au support. Afin de contrôler le greffage, les Nα des acides aminés en solution sont protégées. De ce fait, la synthèse est réalisée de manière itérative, par une suite de déprotections sélective de l'amine terminale du peptide sur le support puis couplage avec un nouvel acide aminé. Ceci nécessite que les chaînes latérales soient protégées de manière orthogonales par rapport au Nα, et que ces groupements protecteurs soient stables en condition de synthèse. Deux stratégies de protections sont classiquement utilisées : la stratégie Boc/Bn et la stratégie Fmoc/tBu. La stratégie Fmoc / tBu, la plus courante, est utilisée ici :²⁷⁶ elle consiste à protéger les Nα par un groupement 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), sélectivement hydrolysé en milieu basique. Les chaînes latérales sont quant à elles protégées par des tert-Butyls (tBu) ou autres groupements protecteurs stables en conditions basiques et acide faible, comme Boc ou Alloc ici utilisés (figure 93).

Le couplage peptidique se fait dans le DMF à pH 8 en présence d'un agent de couplage, le benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), qui forme un ester activé au C-terminal du peptide. L'avantage de la synthèse supportée est que les réactifs sont utilisés en excès en solution, ce qui augmente la vitesse et les rendements de synthèse, et sont ensuite facilement évacués par filtration de la résine. L'inconvénient est

la possibilité de formation de peptides tronqués difficiles à séparer du peptide d'intérêt, généralement causée par des gênes stériques ou de repliement des chaînes peptidiques en élongation sur la résine. Pour pallier à cela, un test de Kaiser²⁷⁷ ou un test au TNBS²⁷⁸ (2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid) est effectué sur quelques billes de résines sacrifiées après chaque couplage afin de s'assurer que toutes les amines libres présentes sur la résines aient réagies.

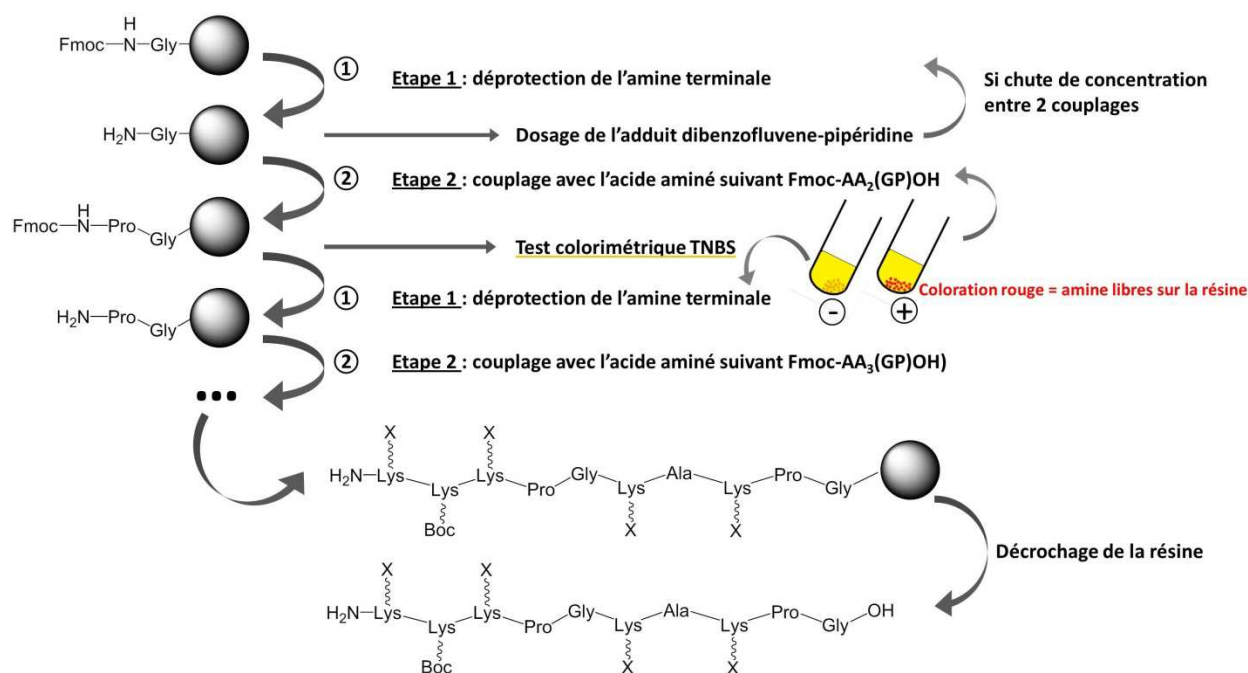


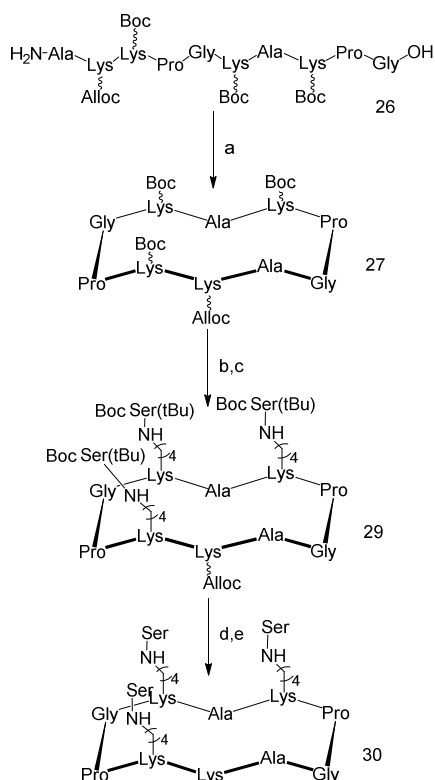
Figure 93 : Synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc/tBu. Utilisation de la résine GlySASRIN® pré-fonctionnalisée avec des glycines avec un taux de chargement de 0,5 mmol/g. 1) Pipéridine (20%), DMF, 20 min, t.a. ; 2) Fmoc-AA(GP)OH (2 eq.), PyBOP (2 eq.), DIPEA (3-4 eq., pH 8-9), 30 min, t.a. Le contrôle du taux de chargement de la résine après chaque déprotection des Na s'effectue par dosage de la quantité d'adduit dibenzofluvene-pipéridine relâché en solution (mesure d'absorption UV à 299nm).²⁷⁹ Le test TNBS consiste à introduire quelques gouttes d'acide picrylsulfonique sur des billes de résine dans une solution de DIPEA à 10% dans le DMF. En cas de réaction de couplage non totale (test positif), deux solutions sont envisageables : relancer à nouveau la réaction de couplage, ou effectuer un « capping » par acétylation des amines libres pour stopper l'élongation du peptide tronqué (non utilisé ici). En fin de synthèse, le peptide linéaire est décroché de la résine en condition acide douce (TFA 1% dans CH₂Cl₂). X = Boc ou Boc-Ser(tBu)OH ; Y = Boc ou Alloc.

Enfin, après couplage et déprotection de l'amine du dernier acide aminé de la séquence, le peptide linéaire est décroché du support avec 1% de TFA. Il est obtenu avec un rendement de 85 à 95%. Comme ce peptide vise à être cyclisé, la résine SASRIN® est utilisée parce qu'elle libère un peptide acide en son extrémité C-terminale et que le décrochage se fait en conditions acides douces, qui ne menacent pas de déprotéger les chaînes latérales dans la stratégie employée. Le premier acide aminé introduit sur la résine est nécessairement une glycine. En effet, c'est le seul acide aminé achiral. De cette manière les problèmes d'épimérisation pouvant survenir lors de la réaction de cyclisation sont ainsi évités.

I.4.b - Stratégies de synthèse des différentes plateformes fonctionnalisées par des aldéhydes

Il existe deux façons d'obtenir la plateforme fonctionnalisée (schéma 3) : la synthèse classique et la synthèse utilisant les dipeptides.

Synthèse classique



Synthèse avec les assemblages Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))OH

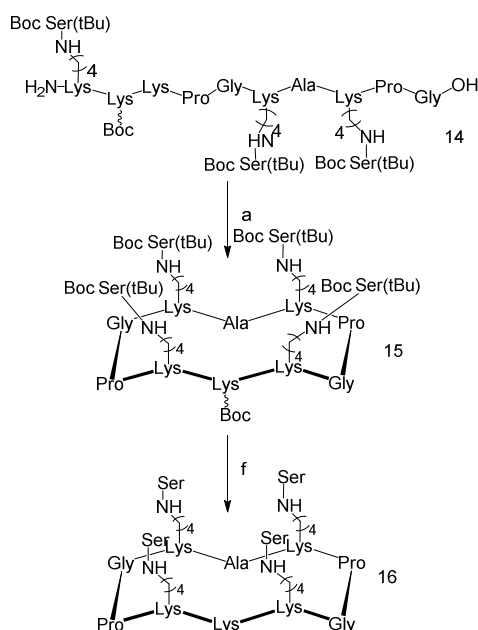


Schéma 3 : Deux types de synthèse utilisées, avec ou sans assemblage Lysine pré-fonctionnalisées par une Sérine protégée ; (a) Cyclisation : dilution à 0,5 mM dans CH₂Cl₂/DMF, PyBOP (2 eq.), DIPEA (3-4 eq., pH 8-9), 10h, t.a. ; (b) TFA/CH₂Cl₂ (50/50, v/v), 1h, t.a. ; (c) Boc-Ser(tBu)OH (1,2 eq./NH₂ Lys), PyBOP (1,2 eq./NH₂ Lys), DIPEA (3-4 eq., pH8-9), DMF, 45 min, t.a. ; (d) Pd(PPh₃)₄ (0,2 eq.), PhSiH₃ (100 eq.), CH₂Cl₂/DMF (3/1, v/v), 30 min., t.a. ; (e) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5), 1h, t.a. ; (f) TFA/Tis/H₂O (95/2,5/2,5), 1h, t.a.

Pour chacune des stratégies, le peptide linéaire est cyclisé en condition de couplage peptidique, à pH8 en présence de PyBOP, et dilué à 0,5 mM pour favoriser les réactions intramoléculaires et éviter tout risque de dimérisation. Cette cyclisation est facilitée par la pré-structuration du peptide en solution avec le coude proline-glycine.

La synthèse classique

La synthèse classique s'effectue en 5 étapes par greffage des Ser sur la face supérieure du châssis après décrochage, cyclisation du peptide et déprotection sélective des Lys à fonctionnaliser.²⁷⁴ C'est la voie de synthèse la plus longue des deux mais aussi plus versatile, et donc utilisables pour différents types de fonctionnalisation. Elle nécessite une protection orthogonale des chaînes latérales des acides aminés des deux faces du cyclodécapetide : les Lys de la face supérieure sont protégées par des groupements Boc, et la Lys de la face

inférieure par un groupement Alloc.²⁸⁰ Un traitement acide permet donc de déprotéger sélectivement les Lys de la face supérieure pour leur fonctionnalisation par des Boc-Ser(tBu) en condition de couplage peptidique. Puis la Lys de la face inférieure est déprotégée à l'aide de palladium au degré d'oxydation zéro, en présence de présence de triphénylphosphine et de phénylsilane.²⁸⁰ Enfin, les Ser peuvent à leur tour être déprotégées en condition acide (schéma 3).

La synthèse utilisant les dipeptides

La synthèse supportée du peptide linéaire utilise le synthon Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))OH, une Lys pré-fonctionnalisée par une Ser protégée. Ce dipeptide a été préparé en milieu homogène par couplage peptidique de la Fmoc-Lysine-OH avec la Boc-Ser(tBu)-NHS, par Carlo Pifferi au DCM. Cette voie de synthèse est plus rapide, seules 2 étapes sont nécessaires après le décrochage du peptide linéaire de la résine, et elle ne nécessite pas de protections orthogonales des chaînes latérales. Celles-ci sont donc protégées par des groupements Boc et tBu, puis libérées en une seule étape en milieu acide fort après la cyclisation du peptide (schéma 3). Cette voie de synthèse est cependant moins versatile.

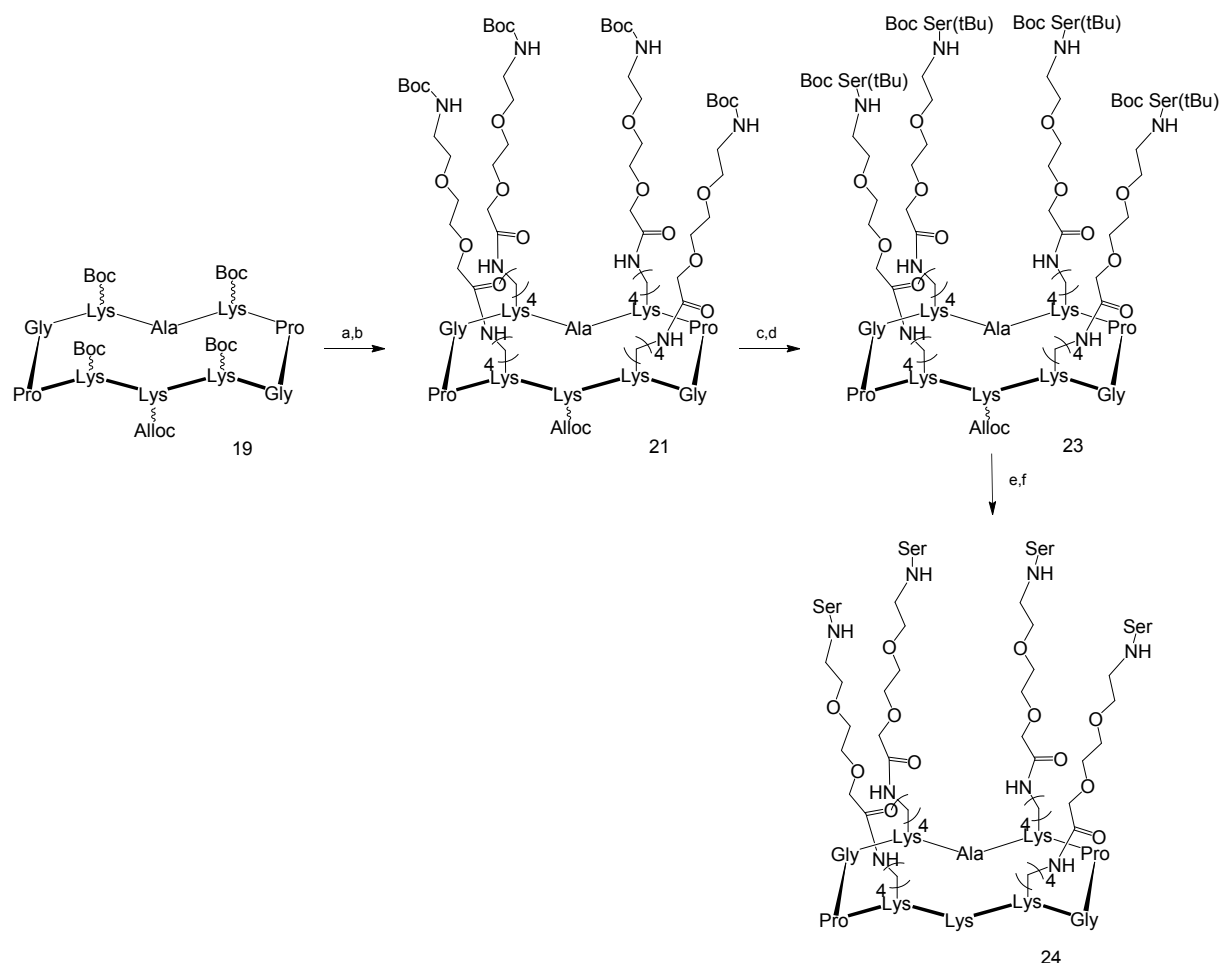


Schéma 4 : Synthèse de la plateforme tétravalente portant 4 fonctions aldéhyde espacées par des chaînes PEG sur une face et une fonction amine sur l'autre face ; (a) TFA/CH₂Cl₂ (50/50, v/v), 1h, t.a. (b) acide 2- [2- (Boc-amino)ethoxy]ethoxyacétique (4,4 eq.), PyBOP (4,4 eq.), DIPEA (3-4 eq., pH8-9), DMF, 45 min, t.a. ; (c) TFA/CH₂Cl₂ (50/50, v/v), 1h, t.a. ; (d) Boc-Ser(tBu)OH (3,6 eq.), PyBOP (3,6 eq.), DIPEA (3-4 eq., pH8-9), DMF, 45 min, t.a. ; (e) Pd(PPh₃) (0,2 eq.), PhSiH₃ (100 eq.), CH₂Cl₂/DMF (3/1, v/v), 30 min., t.a. ; (f) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5), 1h, t.a.

Enfin, un dérivé portant quatre bras espaceurs plus long entre la plateforme et les sucres a été synthétisé par Clara Barrau au DCM. Pour cela, une plateforme tétravalente a été obtenue par voie classique, de manière à introduire les bras espaceurs sur les Lys avant leur fonctionnalisation par des Ser (schéma 4). Des chaînes polyéthylène glycol (PEG) acide 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethoxyacétique portant une extrémité acide carboxylique et une extrémité amine protégée par un Boc sont utilisées. Elles sont introduites sur les amines libres des Lys par lien amide en condition de couplage peptidique. Puis des Boc-Ser(tBu)OH sont couplées sur les extrémités amines après leur déprotection, avant d'être à leur tour déprotégées.

Sur ces différentes plateformes sont ensuite greffés les sucres oxyamines d'une part, et la sonde fluorescente d'autre part.

I.4.c - Oxydation des sérines en aldéhydes

Des aldéhydes sont générés sur la face supérieure des cyclodécapeptides en vue de l'introduction des sucres par lien oxime.^{253,281} Pour cela, les Ser introduites sur les Lys sont converties en fonction acéto-aldéhyde. Ceci est réalisé par une coupure oxydante au périodate de sodium analogue à celle des 1,2 diols. Les rendements sont d'environ 40% en moyenne après purification par HPLC, sur toutes les étapes depuis le décrochage de la résine du peptide linéaire jusqu'à la coupure oxydante des Ser (figure 94).

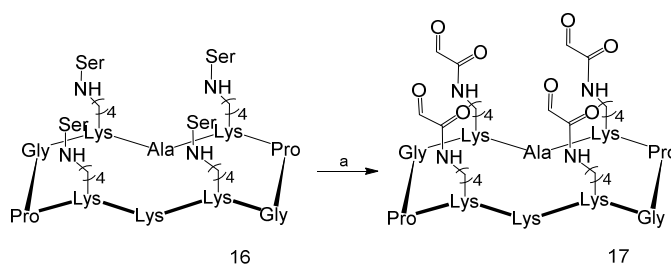


Figure 94 : Oxydation des Ser : (a) NaIO₄ (40 eq.), H₂O, 30 min., t.a. (20%)

Ces fonctions acéto-aldéhydes, sont en équilibre en solution avec leur forme hydratée (figure 95). La forme hydratée, prédominante en solution, a été étudiée par RMN et spectrométrie de masse ESI-MS.²⁸²⁻²⁸⁴ Nous l'avons ici caractérisée par spectrométrie de masse.

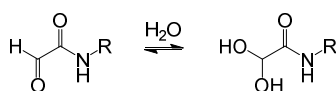


Figure 95 : Forme hydratée de l'aldéhyde glyoxylique en solution aqueuse.

1.5) Assemblage et marquage par la cyanine 5

1.5.a - Assemblage des unités de ciblage avec la plateforme peptidique

L'unité glycosidique est introduite sur le peptide par **ligation chimiosélective oxime**, comme décrit par Renaudet *et al.*^{253,285,286} Cette ligation est très utilisée pour la synthèse de peptides et protéines depuis une vingtaine d'années.²⁸⁷ Les ligations chimiosélectives consistent à coupler deux composés portant des fonctions fortement réactives l'une envers l'autre. Ainsi, lors de l'assemblage du glycopeptide, aucun groupement protecteur n'est nécessaire : le couplage s'effectue régiosélectivement et chimiosélectivement entre les fonctions aldéhydes du peptide et les fonctions oxyamines des sucres.²⁸⁵ La chimiosélectivité est assurée par la différence de réactivité entre les fonctions amines et oxyamines avec les carbonyles. En effet, l'oxyamine est plus nucléophile qu'une amine primaire et moins basique. L'équilibre formé avec le carbonyle est donc déplacé en faveur de la formation de l'oxime. La particularité ici est qu'elle résulte de la condensation entre une fonction oxyamine et une fonction acéto-aldéhyde.

Le lien éther d'oxime obtenu est plus stable *in vivo* qu'une fonction oxime issue d'une fonction aldéhyde,²⁸⁸ et plus résistante à l'hydrolyse que des liens imines ou hydrazones.²⁸⁵ Cette stabilisation est attribuée à l'existence de plusieurs formes de résonance, la délocalisation du doublet non liant de l'oxygène qui diminue l'électrophilie du carbone et l'effet électro-attracteur du groupement OR diminue la basicité de l'azote. Enfin, il a été montré par RMN que les oxymes obtenues sur cette plateforme cyclodecapeptidique sont exclusivement de configuration *trans*.²⁷³

Cette ligation oxime s'effectue en solution aqueuse légèrement acide, pH 2-3, à 30°C avec un rendement de l'ordre de 80 à 90% après purification HPLC, et les temps de réaction varient de 3 à 10 h. Il est à noter que les réactions sont plus longues et les rendements plus faibles lors de réaction avec des sucres de configuration β .²⁷³ Les glycoconjugués obtenus sont caractérisés par spectrométrie de masse ESI-MS et HPLC analytique (schéma 5), leur analyse RMN ayant été publiée par le Département de Chimie Moléculaire.²⁷³

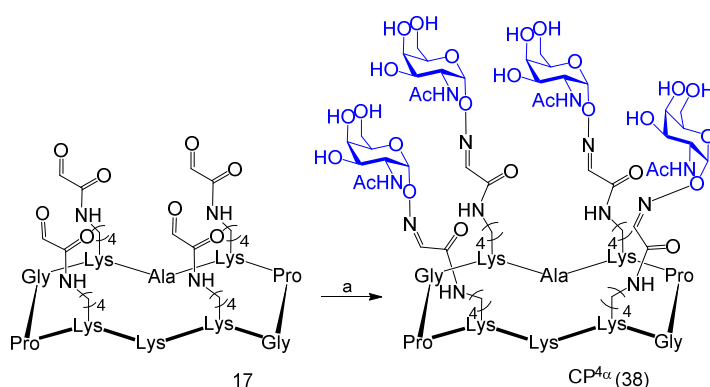


Schéma 5 : Glycoconjugué obtenu par ligation éther oxime ; ici CP^{4α}. (a) GalNAcαONH₂ 10 (2 eq./ aldéhyde), TFA (0,1% dans H₂O, 1h, 30°C (87%).

I.5.b - Marquage par la sonde fluorescente sulfo-cyanine 5

Afin de suivre l'internalisation des glycoconjugués dans les cellules, ceux-ci sont marqués à l'aide de la sonde fluorescente sulfo-cyanine 5. Ce marquage est réalisé en dernière étape de synthèse pour ne pas dégrader le fluorophore, qui est une molécule couteuse et sensible, notamment à la lumière. Ceci prévient donc les risques d'extinction de fluorescence. Ce marquage est parfaitement adapté aux études biologiques, comme l'ont montré des précédents travaux réalisés par l'équipe de Boturyn²⁸⁹.

Le marquage s'effectue au moyen d'une attaque nucléophile de l'amine libre de la Lys sur la face inférieure du peptide sur une fonction ester activé porté par le fluorophore, à pH 8-9 avec un rendement d'environ 30%.²⁸⁹ Les composés sont purifiés pas HPLC, puis caractérisés par HPLC analytique et spectrométrie de masse ESI-MS. A partir de cette étape ils sont conditionnés sous forme lyophilisée à l'abri de la lumière pour préserver le fluorophore d'une extinction rapide.

Tous les glycoconjugués ont été marqués selon ce protocole (schéma 6).

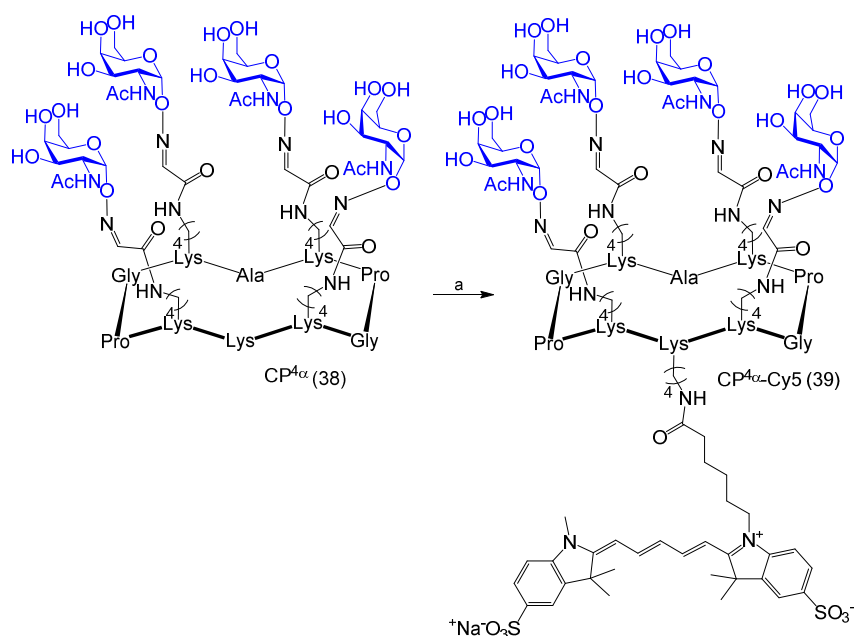


Schéma 6 : Glycoconjugué marqué par la sonde sulfo-cyanine 5 ; ici le CP^{4α}-Cy5. (a) sulfo-cy5-NHS (1,2 eq.), DIPEA (pH8-9), DMF, 2h, t.a. (20%).

Pour aller à l'essentiel

La synthèse des glycoconjugués a été réalisée à partir de celle décrite par Renaudet et al.²⁵³ Cette synthèse très versatile a permis l'obtention de 8 dérivés faisant varier la valence, la nature des sucres, leur configuration anomérique et la longueur des bras espaceurs. L'unité de ciblage des ASGP-R a été réalisée à partir de sucres libres en 9 étapes selon des protocoles déjà établis dans l'équipe du DCM. La synthèse du GalNAc β ONH₂ a été optimisée sur une étape afin d'obtenir des quantités suffisantes. L'introduction de fonctions oxyamines en position anomérique des sucres a permis le greffage de ces unités de ciblage sur différents châssis peptidiques grâce à la ligation oxime. Ces châssis cyclodécapeptidiques ont été assemblés par synthèse peptidique sur support solide selon deux stratégies : la méthode classique, plus longue mais plus versatile, et celle utilisant les dipeptides, plus rapide. Une ou plusieurs fonctions acéto-aldéhyde ont été générées sur leur face supérieure par le clivage oxydant de Ser, couplées sur les chaînes latérales de Lys. La fonctionnalisation des peptides par ligation oxime avec les unités glycosidiques s'est révélée plus efficace avec les composés d'anomérie α que ceux d'anomérie β . Enfin, tous les glycoconjugués ont été marqués par la sonde fluorescente sulfo-cyanine 5 dans le but d'étudier leur internalisation par cytométrie en flux.

II - Etude de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux

L'internalisation des glycoconjugués de la famille CP a été étudiée par cytométrie en flux sur cellules humaines HepG2 exprimant l'ASGP-R.

II.1) Internalisation du glycoconjugué CP^{4α} dans les cellules hépatiques humaines

Dans un premier temps, le **mécanisme et l'efficacité d'internalisation de CP^{4α}** sont étudiés. Ce système a déjà montré sa capacité à entrer dans les cellules hépatiques pour y délivrer un chélateur de cuivre. Nous souhaitons maintenant savoir s'il est efficace et sélectif vis-à-vis des hépatocytes. Le glycoconjugué CP^{4α} marqué par la sulfo-cyanine 5 est impliqué dans deux types d'expériences cellulaires : la saturation des récepteurs ASGP-R et la compétition avec le GalNAc (compétiteur monovalent de référence).

II.1.a - Saturation des récepteurs par CP^{4α}-Cy5

Les expériences de saturation consistent à incuber les cellules avec une concentration croissante en glycoconjugué marqué : ici les HepG2 sont mises en présence du CP^{4α}-Cy5 de 0 à 15 μM. Le tracé de l'intensité moyenne de fluorescence en fonction de la concentration en glycoconjugué donne des indications à la fois sur le mécanisme d'internalisation mais aussi sur son efficacité. Une hyperbole avec palier de saturation est obtenue (figure 96). Ceci est caractéristique d'une internalisation active par un récepteur.¹²⁶

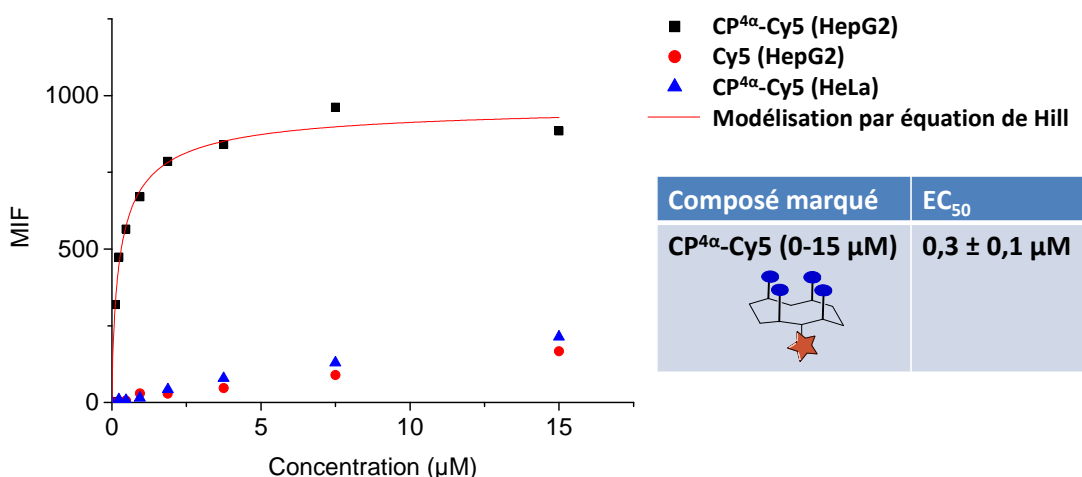


Figure 96 : Courbe de saturation des récepteurs ASGP-R par CP^{4α}-Cy5 de 0 à 15 μM sur cellules HepG2 (■) modélisée par une équation de Hill et contrôle sur les cellules HeLa (▲). Contrôle de l'internalisation de la sulfo-cyanine 5 seule sur cellules HepG2 (●) ; MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Comme l'intensité de fluorescence du palier atteint n'est pas quantifiable, le recours à d'autres techniques est nécessaire afin d'évaluer l'efficacité d'internalisation. A l'aide de la modélisation de cette courbe par une équation de Hill, l' EC_{50} est calculée (figure 96). Elle correspond à la concentration en composé nécessaire à la saturation de 50% des récepteurs : elle est ici de **$0,3 \pm 0,1 \mu M$** .

L'internalisation du fluorophore seul sulfo-cyanine 5 acide carboxylique est étudiée en tant que contrôle. Ceci permet de vérifier que l'hyperbole de fluorescence des cellules est due à la plateforme fonctionnalisée par le GalNAc et non à la sonde fluorescente. Pour les mêmes conditions d'incubation, la courbe obtenue est une fonction affine de pente faible, similaire pour les deux lignées cellulaires HepG2 et HeLa (figure 96). Ceci témoigne d'une faible internalisation passive de la sulfo-cyanine 5 dans les cellules hépatiques, négligeable devant l'effet du glycoconjugué.

Le mécanisme d'internalisation est donc actif, mais par quelle voie ? Pour élucider cela, l'expérience de saturation est reproduite sur les cellules HeLa, qui sont des cellules humaines épithéliales cancéreuses n'exprimant pas le récepteur ASGP-R. Après incubation des cellules dans les mêmes conditions que précédemment, une fonction linéaire de pente faible est obtenue ; elle révèle une faible internalisation passive (figure 96). De plus, cette droite est tout à fait superposable à celles obtenues pour la sulfo-cyanine 5 seule sur les deux types cellulaires. Ces internalisations passives semblent donc corrélables et provenir du même mécanisme, que ce soit pour $CP^{4\alpha}$ -Cy5 ou la sulfo-cyanine5 seule.

En conclusion, les expériences de saturation des récepteurs ASGP-R permettent d'affirmer que le $CP^{4\alpha}$ -Cy5 est internalisé sélectivement dans les cellules hépatiques selon un mécanisme ASGP-R dépendant. Qu'en est-il de l'efficacité de cette internalisation ?

II.1.b - Compétition entre $CP^{4\alpha}$ -Cy5 et le GalNAc

Une fois le mécanisme d'entrée dans les cellules hépatiques établi, il est essentiel de **quantifier l'internalisation**. Pour cela, des expériences de compétition ont été réalisées avec le GalNAc, ligand monovalent connu de l'ASGP-R. Cette expérience de compétition consiste à incuber les cellules avec une concentration fixe en glycoconjugué marqué $CP^{4\alpha}$ -Cy5, nous avons choisi $1 \mu M$, et une concentration croissante en compétiteur. La courbe en échelle semi-logarithmique de l'intensité moyenne de fluorescence en fonction de la concentration en compétiteur conduit à une sigmoïde. Elle est modélisée par équation de Hill afin de calculer l' IC_{50} , qui est la concentration en compétiteur pour 50% d'inhibition de l'internalisation du glycoconjugué. Pour $CP^{4\alpha}$ -Cy5, l' IC_{50} est de **$7,8 \pm 0,2 mM$** (figure 97) ; ceci donne deux informations capitales. Tout d'abord, il confirme un mécanisme d'internalisation par l'ASGP-R, puisque le GalNAc inhibe l'internalisation par interaction compétitive sur domaine de reconnaissance du récepteur. Par ailleurs, cette IC_{50} élevée indique qu'environ 8000 équivalents de GalNAc sont nécessaires pour inhiber 50% de l'internalisation de $CP^{4\alpha}$ -Cy5. Par conséquent, l'interaction avec l'ASGP-R est 8000 fois plus forte pour $CP^{4\alpha}$ -Cy5 que pour le GalNAc.

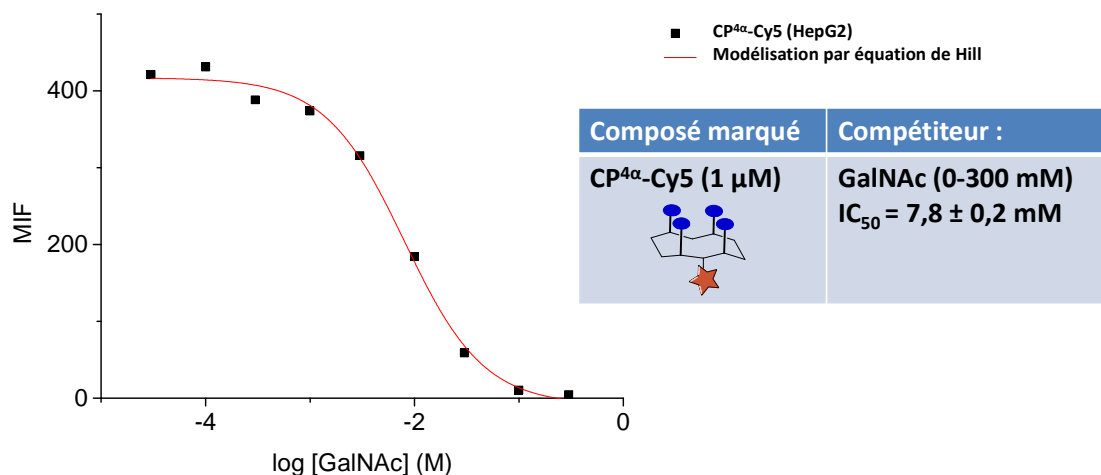


Figure 97 : Courbe de compétition entre le CP^{4α}-Cy5 (1 μM) et le GalNAc (0-300 mM) sur cellules HepG2 (■) modélisée par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Nous avons montré que CP^{4α}-Cy5 est sélectivement internalisé dans les cellules hépatiques par endocytose grâce à sa reconnaissance par l'ASGP-R. De plus, cette internalisation est très efficace comparée au GalNAc. Le vecteur CP^{4α} représente donc une excellente stratégie de ciblage.

Etudions maintenant l'effet de plusieurs paramètres structuraux pour comprendre les phénomènes de reconnaissance par la lectine et dans l'optique d'optimiser le glycoconjugué pour une internalisation encore plus efficace.


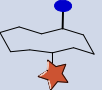
II.2) Effet de la multivalence

Pour toutes les lectines, la taille, la **densité de sucre et la géométrie du ligand** sont des paramètres importants à la reconnaissance. Il a été montré dans la littérature que la valence idéale pour concevoir des ligands de forte affinité envers l'ASGP-R est de trois ou quatre sucres.¹⁶² Un nombre inférieur à trois conduit à des ligands d'affinité 100 à 1000 fois plus faible, tandis qu'un nombre supérieur à quatre n'apporte pas d'amélioration significative. Ici, le glycoconjugué CP^{4α} possède 4 sucres.

L'effet de la valence du ligand a été étudié en comparant le composé CP^{4α} avec différents dérivés : le CP^{3α}, trivalent, et le CP^{1α}, monovalent. Chacun de ces glycoconjugués a été marqué par la sulfo-cyanine 5, de ce fait les expériences de saturation des récepteurs et de compétition avec le GalNAc ont été réalisées sur chacun d'eux. L'étude biologique du cyclodécapeptide monovalent CP^{1α} donne des indications sur l'influence du nombre de sucre sur ce type de structure. Ceci permet de s'assurer que l'architecture de CP^{4α} favorise une interaction simultanée de plusieurs sucres avec plusieurs sites de reconnaissance des lectines. L'étude du dérivé trivalent CP^{3α} permet d'appréhender l'éventuel apport du 4^{ème} sucre.

II.2.a - Saturation des récepteurs par CP^{3α}-Cy5 et CP^{1α}-Cy5

La courbe de saturation obtenue avec le composé CP^{3α}-Cy5 est une hyperbole avec palier de saturation, analogue à celle obtenue précédemment avec CP^{4α}-Cy5 : ceci montre une internalisation médiée par les ASGP-R (figure 98). L'EC₅₀ calculée pour CP^{3α}-Cy5 est de **0,8 ± 0,4 μM**. Pour rappel, celle-ci est de **0,3 ± 0,1 μM** pour CP^{4α}-Cy5. Ces différences d'EC₅₀ indiquent que l'ASGP-R a plus d'affinité pour le glycoconjugué CP^{4α}-Cy5 que pour CP^{3α}-Cy5, parce qu'il sature les récepteurs à des concentrations plus faibles.

Composé marqué	CP ^{3α} -Cy5 (0-15 μM)	CP ^{1α} -Cy5 (0-20 μM)
		
EC ₅₀	0,8 ± 0,4 μM	Palier non atteint

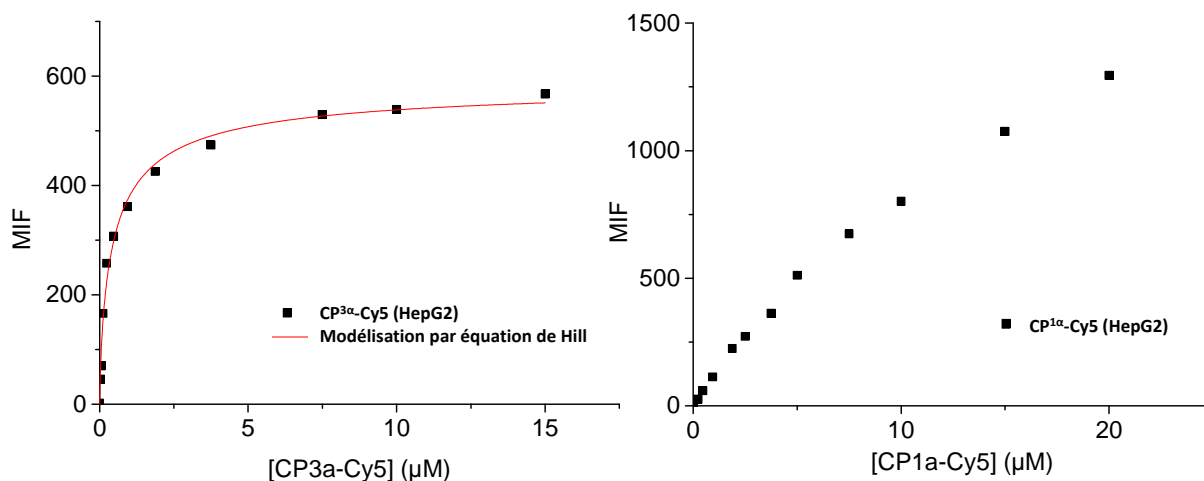


Figure 98 : Courbes de saturation des récepteurs ASGP-R par le CP^{3α}-Cy5 de 0 à 15 μM modélisées par une équation de Hill et le CP^{1α}-Cy5 de 0 à 20 μM sur cellules HepG2. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Par ailleurs, le palier de saturation n'est pas atteint dans la gamme de concentration choisie pour le CP^{1α}-Cy5 (figure 98). Il nous est impossible d'aller vers des concentrations plus hautes car nous ne disposons pas de quantité suffisante en glycoconjugué. Malgré l'impossibilité de calculer l'EC₅₀ pour ce composé, ce résultat nous informe que le glycoconjugué monovalent est moins efficacement reconnu par le récepteur que les composés tri- et tétravalent puisque le palier de saturation n'est pas atteint.

II.2.b - Compétitions des CP^{3α}-Cy5 et CP^{1α}-Cy5 avec le GalNAc

Les glycoconjugués CP^{3α}-Cy5 et CP^{1α}-Cy5 à 1 μM ont été mis en compétition avec le compétiteur de référence : le GalNAc. Les IC₅₀ obtenues sont les suivantes : pour CP^{3α}-Cy5, l'IC₅₀ est de **4,0 ± 0,5 mM** et pour CP^{1α}-Cy5, elle est de **0,7 ± 0,1 mM** (figure 99) ; pour rappel celle de CP^{4α}-Cy5 est de **7,8 ± 0,2 mM**.

Le glycoconjugué cyclodécapeptidique tétravalent possède une IC_{50} plus de dix fois supérieure à celle du monovalent. Ceci montre que la présentation multivalente des sucres est essentielle pour une internalisation efficace par les ASGP-R.

Le glycoconjugué cyclodécapeptidique trivalent quant à lui possède une IC_{50} diminuée par deux comparée au tétravalent. Bien que les deux molécules multivalentes soient efficacement reconnues l'ASGP-R, la présence d'un 4^{ème} sucre augmente la capacité de la molécule à cibler les ASGP-R. Cette augmentation entre 3 et 4 sucres n'est cependant pas aussi significative que celle entre les multivalents et le monovalent.

Enfin on remarque que l' IC_{50} obtenue pour le monovalent $CP^{1\alpha}$ -Cy5 est très élevée comparée à la valeur attendue. En effet, cette IC_{50} est de $0,7 \pm 0,1$ mM alors qu'une interaction similaire à celle du GalNAc seul était attendue, soit une IC_{50} avoisinant les 1 μ M. Or, l' IC_{50} calculée signifie que l'interaction du $CP^{1\alpha}$ -Cy5 avec l'ASGP-R est 700 fois plus forte que celle du GalNAc. On en déduit donc que la molécule dans son ensemble joue un rôle dans l'efficacité d'internalisation.

Par ailleurs, pour le $CP^{1\alpha}$, la plateforme cyclodécapeptidique est très hydrophobe comparée à celles utilisées pour les composés multivalents. En effet, des Ala sont introduites à la place de trois Lys de la face supérieure du peptide, ce qui semble promouvoir son internalisation passive. Ceci est visible notamment par un non-retour à zéro de la fluorescence lors des compétitions avec le GalNAc : le palier inférieur de la courbe ne retourne pas à la valeur d'intensité de fluorescence résiduelle des cellules (figure 99).

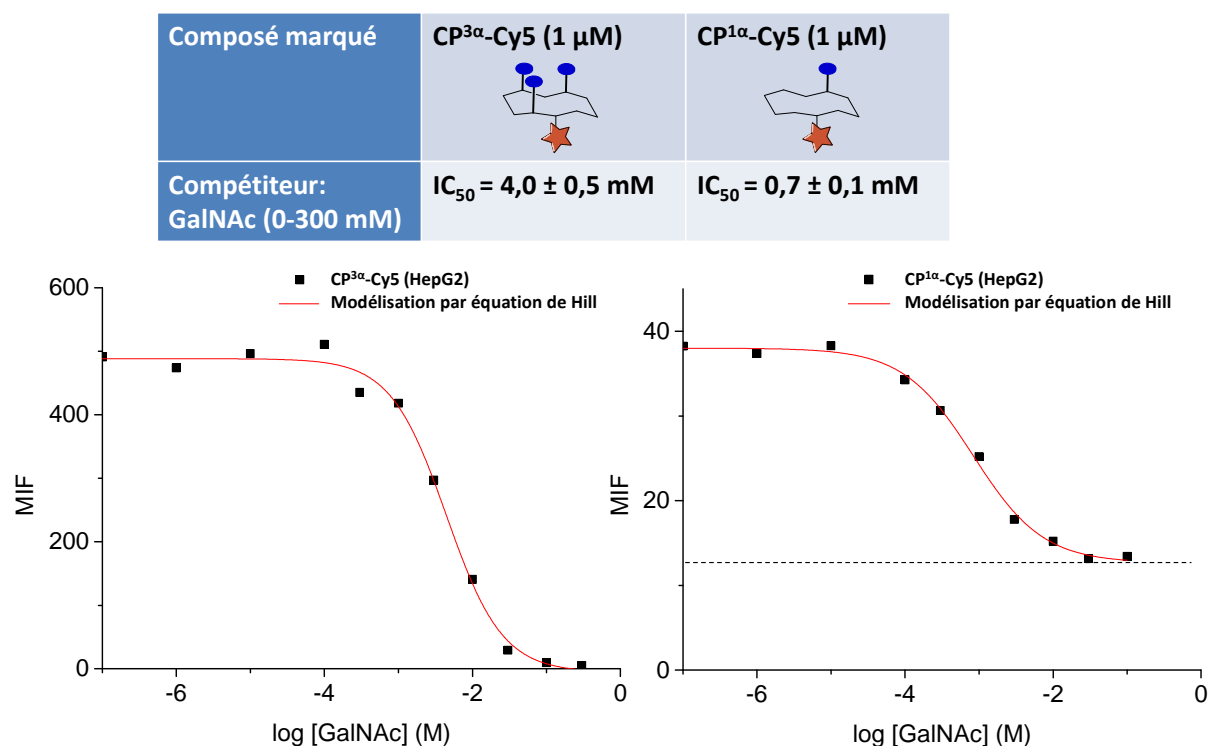


Figure 99 : Courbes de compétition entre le $CP^{3\alpha}$ -Cy5 (à droite) ou le $CP^{1\alpha}$ -Cy5 (à gauche ; 1 μ M) et le GalNAc (0-300 mM) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. Les IC_{50} obtenues sont de $4,0 \pm 0,5$ mM pour le $CP^{3\alpha}$ -Cy5 et de $0,7 \pm 0,1$ mM pour le $CP^{1\alpha}$ -Cy5 ; MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Ces observations permettent de déduire que le remplacement des Lys par des Ala pour ce composé n'est pas sans conséquence sur les phénomènes d'internalisation dans les cellules. Ce contrôle n'est donc pas parfaitement adapté pour juger de l'influence du nombre

de sucre sur l'internalisation. Cependant il est très difficile de choisir une substitution qui n'influerait pas sur la reconnaissance parce que d'autres fonctions ou d'autres sucres pourraient également se comporter de manière inattendue. Par exemple, une étude de la reconnaissance de ligands trivalents par des domaines de reconnaissance des sous unités H1 menée par SPR a donné des résultats surprenants.²⁹⁰ L'effet de multivalence de ligands trivalents est évalué, faisant varier le nombre de Gal par substitution avec de Glucoses (Glc) qui ne sont que très faiblement reconnus par la protéine. Bien que l'affinité mesurée pour le Gal soit plus de dix fois supérieure à celle du Glc, le ligand de meilleure affinité s'est révélé être celui portant deux Gal et un Glc, devant celui portant trois Gal. Ce résultat soulève la possibilité de l'interaction de l'unité Glc avec un autre site de la protéine que la poche de reconnaissance elle-même. Ceci sous-entend l'existence d'un second site de reconnaissance sur le domaine de reconnaissance de la sous unité H1. Cette possibilité a été étudiée par RMN, avec l'identification de la liaison simultanée d'un imidazole à proximité du site de reconnaissance des carbohydrates contenant un GalNAc.²⁹⁰ Par conséquent, la conception du ligand monovalent est une question qui ne pourra être résolue tant que le mécanisme d'interaction multivalent ligand-ASGP-R n'aura pas été précisément identifié, plus particulièrement l'existence d'un site de liaison secondaire et le rôle joué par la sous-unité H2 du récepteur qui est peu documentée à ce jour. Quel que soit le substituant utilisé, sa possible interaction avec la lectine ne pourra pas être maîtrisée.

En conclusion, les expériences de saturation et de compétition sont cohérentes entre elles. Elles montrent que la multivalence augmente fortement l'efficacité d'internalisation par l'ASGP-R, d'un facteur 4000 à 8000 par rapport au GalNAc monovalent. La présentation multivalente des GalNAc sur l'architecture cyclodécapeptidique favorise donc l'interaction multivalente avec la lectine. La présence de quatre GalNAc conduit à la reconnaissance la plus efficace, mais seulement un facteur deux comparé au composé trivalent. L'apport du 4^{ème} sucre n'est donc pas décisif.

II.3) Effet de la configuration anomérique

Contrairement à l'effet de multivalence, l'effet de la configuration anomérique sur l'affinité pour l'ASGP-R est quant à lui très controversé. D'un point de vue théorique, il semblerait que la configuration β soit préférable dans le cas d'une fonctionnalisation du sucre en position anomère.¹⁷³ Elle permettrait de diminuer l'encombrement en éloignant les substituants anomériques de la surface de la protéine.

Dans cette partie, il s'agit de mesurer l'influence d'une telle variable sur la reconnaissance du glycoconjugué cyclodécapeptidique, et de tenter d'améliorer la reconnaissance par l'emploi de la configuration anomérique β .

L'influence de la configuration anomérique sur l'efficacité d'internalisation par l'ASGP-R a été étudiée par la comparaison des glycoconjugués de valence identique mais de configurations différentes. Ces glycoconjugués sont les suivants : le CP^{4 α} -Cy5, le CP^{4 β} -Cy5, le CP^{3 α} -Cy5 et le CP^{3 β} -Cy5.

II.3.a - Saturation des récepteurs par CP^{4β}-Cy5 et CP^{3β}-Cy5

La tendance obtenue par calcul des EC₅₀ semble montrer une préférence de la lectine pour les composés de configuration α. En effet les EC₅₀ des composés d'anométrie α sont plus faibles que pour ceux d'anométrie β ; ils saturent les récepteurs à plus faible concentration et sont donc plus efficacement reconnus :

- Pour CP^{4α}-Cy5 et CP^{4β}-Cy5, les EC₅₀ sont respectivement de **0,3 ± 0,1 μM** et **2,1 μM**.
- Pour CP^{3α}-Cy5 et le CP^{3β}-Cy5, les EC₅₀ sont respectivement de **0,8 ± 0,4 μM** et **1,7 ± 0,7 μM**.

La différence semble plus marquée pour les composés tétravalents que pour les composés trivalents. Pour plus de précision, nous préférons nous référer aux expériences de compétition avec le GalNAc.

II.3.b - Compétition de CP^{4β}-Cy5 et CP^{3β}-Cy5 avec le GalNAc

Les expériences de compétition avec le GalNAc corroborent et précisent les résultats obtenus lors des expériences de saturation. Un facteur deux sépare les IC₅₀ en faveur de l'anométrie α, quelle que soit la valence du glycoconjugué de la famille CP (figure 100) :

- Pour CP^{4α}-Cy5 et CP^{4β}-Cy5, les IC₅₀ sont respectivement de **7,8 ± 0,2 μM** et **4,3 ± 0,1 μM**.
- Pour CP^{3α}-Cy5 et le CP^{3β}-Cy5, les IC₅₀ sont respectivement de **4,0 ± 0,5 μM** et **1,5 ± 0,1 μM**.

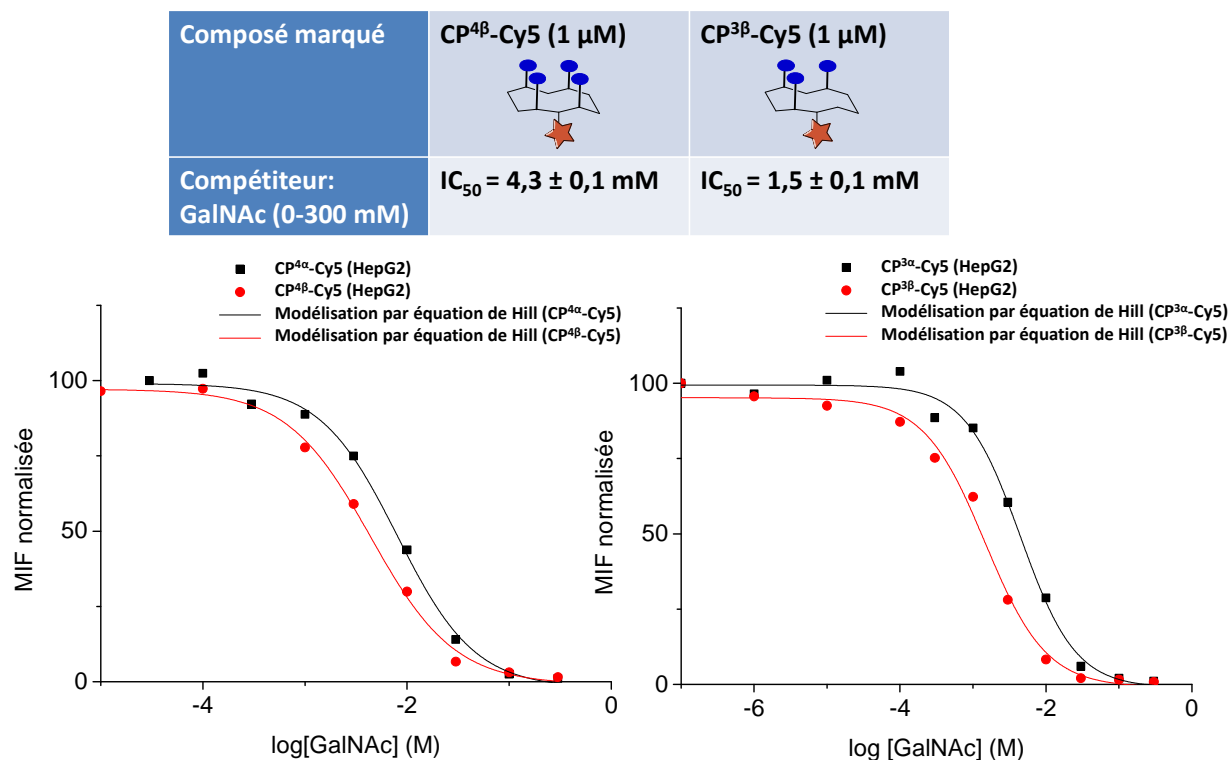


Figure 100 : Courbes de compétition entre les glycoconjugués marqués (1 μM) et le GalNAc (0-300 mM) pour CP^{4α}-Cy5 et CP^{4β}-Cy5 (à droite) et CP^{3α}-Cy5 et CP^{3β}-Cy5 (à gauche) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Ce résultat a été confirmé par comparaison directe entre les glycoconjugués tétravalents. Ici, le compétiteur n'est plus le GalNAc mais directement un glycoconjugué non marqué. En utilisant le CP^{4β}-Cy5 (1 μM) comme composé marqué et le CP^{4α} comme compétiteur, une IC₅₀ de **0,4 ± 0,1 μM** est obtenue, ce qui confirme que le CP^{4α} est deux fois mieux internalisé que le CP^{4β} (figure 101).

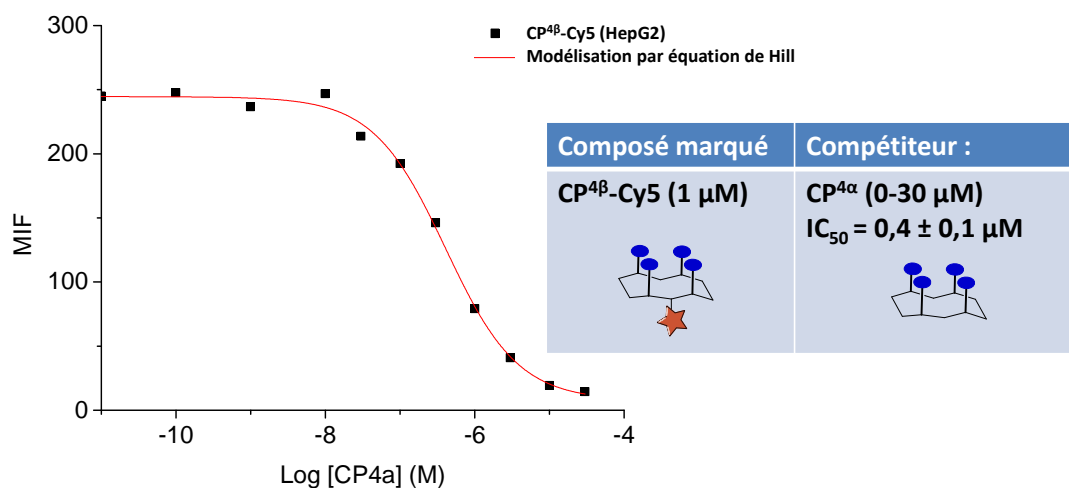


Figure 101 : Courbe de compétition entre CP^{4β}-Cy5 (1 μM) et CP^{4α} (0-30 μM) sur cellules HepG2 modélisée par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Par conséquent, l'anomérie α est plus efficacement reconnue par ASGP-R pour la famille de composé CP mais ce paramètre n'a pas une influence majeure (facteur 2).

Pour conclure, la configuration anomérique des sucres a une faible influence sur l'efficacité de reconnaissance par la lectine ASGP-R. Les composés de la famille CP d'anomérie α sont deux fois plus efficacement internalisés que leurs analogues d'anomérie β, à valence identique. Les résultats obtenus par compétition étant plus précis que ceux obtenus par saturation des récepteurs, ils confirment l'utilité de l'emploi des deux techniques pour la comparaison des différents glycoconjugués.

II.4) Effet de la nature du sucre

La lectine ASGP-R reconnaît avec une forte affinité et sélectivité le Galactose et le GalNAc, avec une affinité 50 fois plus élevée pour ce dernier.^{118,146} De plus, peu de lectines reconnaissent avec affinité et sélectivité le GalNAc comparé au Galactose ; son utilisation laisse donc envisager une sélectivité accrue envers la lectine d'intérêt. Afin de valider notre choix qui s'est porté vers la fonctionnalisation des glycoconjugués par le GalNAc pour une interaction et sélective efficace avec la lectine ASGP-R, des dérivés de la famille CP portant des sucres de nature différents ont été synthétisés. Les sucres utilisés sont le Gal et le Lac, tous deux reconnus par l'ASGP-R. Il est à noter que le Lac correspond au disaccharide Galβ1→4Glc (figure 91).

Les dérivés étudiés ici sont le CP^{4βGal}-Cy5, portant 4 Gal, et le CP^{4βLac}-Cy5, portant 4 Lac. La configuration anomérique β a été choisie notamment pour des questions de synthèse. Les expériences de saturation des récepteurs et de compétition avec le GalNAc ont donné des résultats très similaires pour ces deux glycoconjugués.

II.4.a - Saturation des récepteurs par CP^{4βGal}-Cy5 et CP^{4βLac}-Cy5

Lors des expériences de saturation, le palier de saturation des récepteurs n'a pas pu être atteint pour aucune des deux molécules dans la gamme de concentration étudiée, de 0 à 15 μM (figure 102). Ainsi, l'interaction est moins forte pour les glycoconjugués portant quatre Gal ou Lac que ceux portant des GalNac, en comparaison des composés CP^{4β}-Cy5 ou CP^{4α}-Cy5. Ceci concorde avec ce qui est décrit dans la littérature.

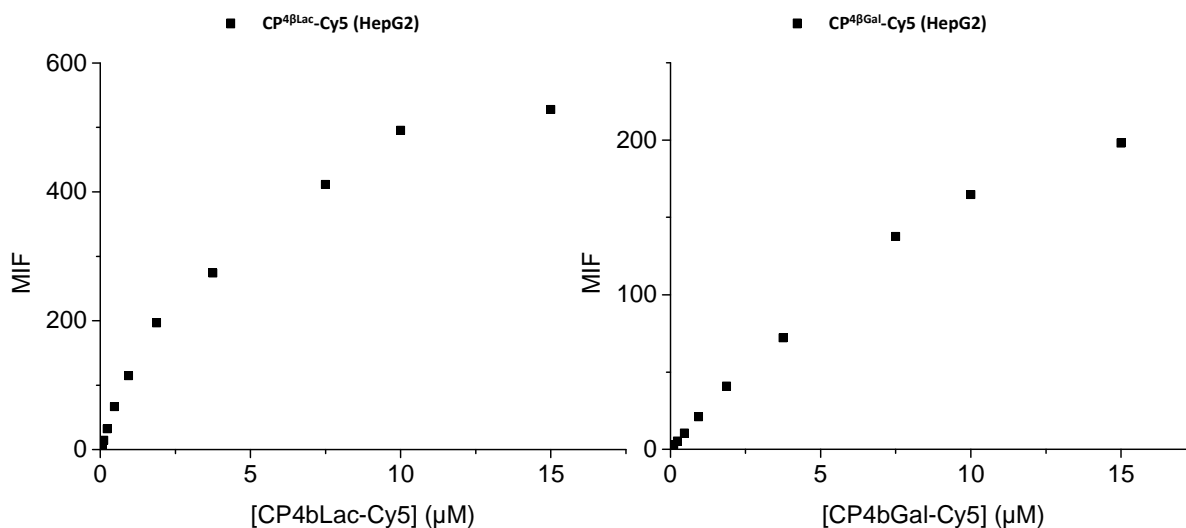


Figure 102 : Courbes de saturation des récepteurs par le CP^{4βLac}-Cy5 et le CP^{4βGal}-Cy5 (0 à 15 μM) sur HepG2 ; Les paliers de saturation ne sont pas atteints aux concentrations étudiées. MIF = Moyenne d'intensité de fluorescence.

II.4.b - Compétition de CP^{4βGal}-Cy5 et CP^{4βLac}-Cy5 avec le GalNac

Des expériences de compétition avec le GalNac ont été réalisées pour les deux glycoconjugués CP^{4βGal}-Cy5 et CP^{4βLac}-Cy5. Les IC₅₀ obtenues avec le GalNac sont respectivement de **0,5 ± 0,1 μM** pour le CP^{4βGal}-Cy5 et de **0,8 ± 0,1 μM** pour le CP^{4βLac}-Cy5 (figure 103).

On en déduit donc que ces deux composés sont reconnus par l'ASGP-R avec une efficacité comparable, et que le Lac semble légèrement mieux reconnu que le Gal. Cette différence peut être attribuée à une participation du pénultième Glc dans la reconnaissance du glycoconjugué par la lectine. Par ailleurs, il est à souligner que le Lac étant un disaccharide, la distance entre les résidus Gal terminaux est plus grande sur CP^{4βLac} que celle sur le CP^{4βGal}, ce qui peut également contribuer à la différence observées entre les deux glycoconjugués. Ceci est en accord avec la littérature, comme nous l'avons vu dans le chapitre I. De plus, par comparaison avec le CP^{4β}-Cy5 de valence et configuration identique, les glycoconjugués CP^{4βLac} et CP^{4βGal} sont 6 à 8 fois moins efficacement internalisés. Ceci confirme la forte préférence de la lectine envers le GalNac.^{118,146,154}

Etonnamment, l'intensité minimale de fluorescence ne retourne pas à zéro concernant la courbe de compétition entre le CP^{4βGal}-Cy5 et le GalNac. On peut donc supposer que l'internalisation passive est plus prononcée pour ce composé.

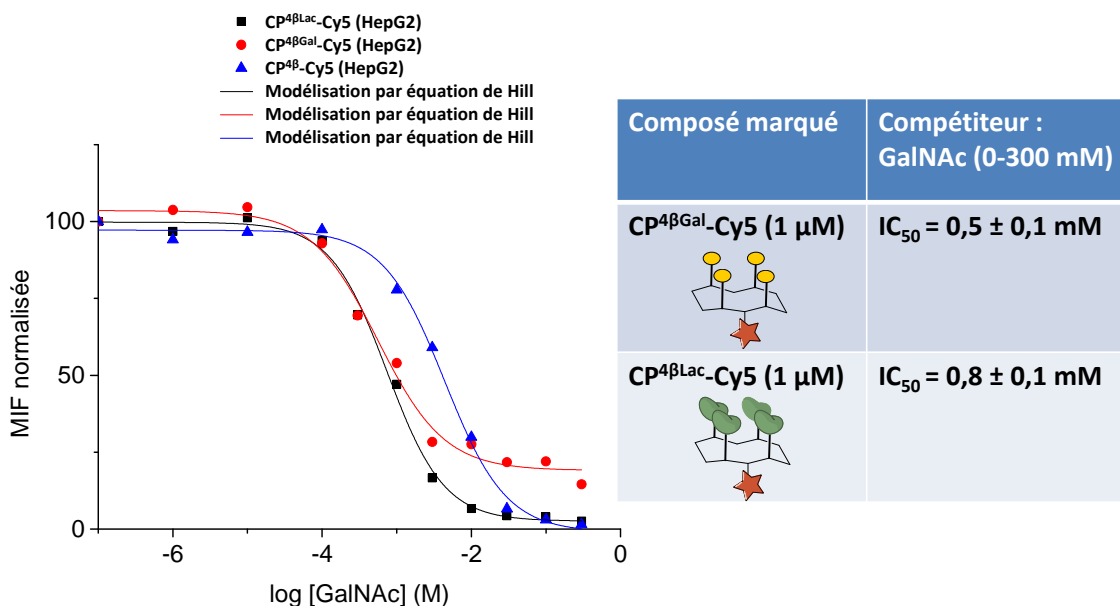


Figure 103 : Courbes de compétition entre les glycoconjugués marqués (1 μM) et le GalNAc (0-300 mM) pour CP^{4βLac}-Cy5 (■), CP^{4βGal}-Cy5 (●) et CP^{4β}-Cy5 (▲) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

En conclusion, les glycoconjugués portant un GalNAc sont plus efficacement reconnus par les ASGP-R. C'est un paramètre significatif, puisqu'à valence et anomérie identique le glycoconjugué tétravalent CP^{4β}-Cy5 se révèle être 6 à 8 fois mieux internalisé que CP^{4βLac}-Cy5 et CP^{4βGal}-Cy5 respectivement. Ces résultats, en accord avec la littérature, confirment qu'intégrer le GalNAc dans les glycoconjugués en tant qu'unité de ciblage des cellules hépatiques est un choix pertinent.

II.5) Effet de la longueur des bras espaceurs

Dans la littérature, les travaux de Lee,¹⁶² Baenziger,¹¹⁸ Biessen,¹⁷⁹ ainsi que de Khorev¹²⁶ montrent qu'une distance optimale entre les sucres d'environ 20 Å est à prévoir pour cibler efficacement l'ASGP-R. Cette distance correspond à celle qui sépare les domaines de reconnaissance de la protéine à la surface des cellules, et permet ainsi les interactions multivalentes ligand-lectine. Les espaceurs reliant les sucres à la plateforme peptidique sont rallongés, dans le but de vérifier si ceux utilisés jusqu'alors sont assez longs et flexibles pour satisfaire à une reconnaissance multivalente optimale. Des motifs polyéthylène glycol sont introduits entre les chaînes latérales des Lys et les Ser oxydées servant de points d'ancrages aux sucres, donnant le composé CP^{4pegα}-Cy5. La longueur des bras espaceurs classique est estimée à 1,8 nm et celle des bras portant la chaîne PEG à 2,85 nm, soit 1,6 fois plus longue.²⁹¹

II.5.a - Saturation des récepteurs par CP^{4pegα}-Cy5

L'EC₅₀ obtenue par cytométrie en flux pour le CP^{4pegα}-Cy5 est identique à celle déterminée pour le CP^{4α} : elle est de **0,3 ± 0,1 μM**. Il semble donc que l'introduction de la chaîne PEG n'influence pas les propriétés d'internalisation du glycoconjugué.

II.5.b - Compétition de CP^{4pegα}-Cy5 avec le GalNAc

L'IC₅₀ obtenue par compétition avec le GalNAc est de **10,5 ± 0,4 mM**, alors que cette valeur pour le CP^{4α} est de **7,8 ± 0,2 mM**. La différence entre les deux IC₅₀ est faible, d'un facteur 1,5 environ (figure 104). Par conséquent, l'allongement des bras espaceurs induit une légère amélioration de l'efficacité d'internalisation du glycoconjugué tétravalent, mais celle-ci est plutôt négligeable.

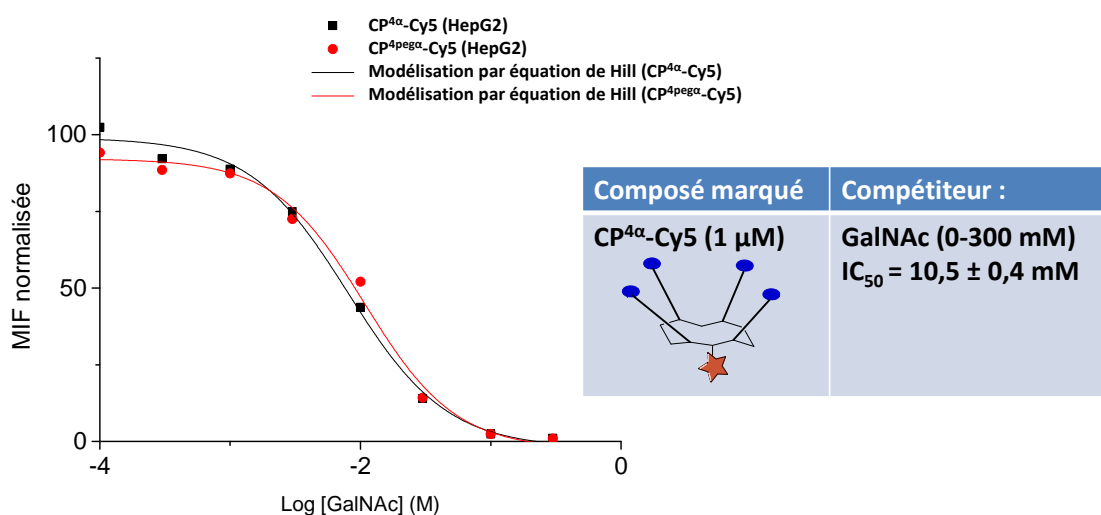


Figure 104 : Courbes de compétition entre les glycoconjugués marqués (1 μM) et le GalNAc (0-300 mM) pour CP^{4α}-Cy5 (■) et CP^{4pegα}-Cy5 (●) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Pour conclure, la différence observée entre les deux glycoconjugués de taille de bras espaceurs différentes est faible voire négligeable. Le composé CP^{4α} dispose donc de bras assez longs et flexibles ; la distance entre les sucres de ce dernier satisfait à une interaction multivalente avec plusieurs domaines de reconnaissance des ASGP-R. L'augmentation de la longueur des bras favorise légèrement cet effet. Néanmoins, le gain d'efficacité d'internalisation est faible et le risque encouru en augmentant la flexibilité des bras espaceurs est une perte de sélectivité pour l'ASGP-R et une perte entropique. Le bénéfice de l'introduction des chaînes PEG est de ce fait trop minime pour être retenu comme critère d'amélioration de l'interaction glycoconjugué-lectine.

Pour aller à l'essentiel

Nous avons mis en évidence que la cytométrie en flux est une technique adaptée à notre problématique. Elle nous a permis de démontrer que les glycoconjugués de la famille CP tri- et tétravalents sont sélectivement efficacement internalisés dans les cellules hépatiques, 1500 à 8000 fois mieux que le GalNAc. Les paramètres structuraux de plus forte influence sur cette efficacité d'internalisation sont le nombre et la nature des sucres portés par les glycoconjugués. La configuration anomérique ainsi que la longueur des bras espaceurs ont un effet plus modéré voire négligeable.

III - Conclusion de l'étude de la famille CP

Le glycoconjugué CP^{4α} et ses dérivés ont été synthétisés grâce à une voie de synthèse bien décrite à ce jour et très versatile. D'un point de vue du mécanisme d'internalisation, les expériences de cytométrie en flux ont mis en évidence que les différents glycoconjugués multivalents **entrent dans les cellules hépatiques via la lectine ASGP-R, de manière sélective**. De plus, il a été montré que la reconnaissance par la lectine des composés cyclodécapeptidiques s'effectue selon une **interaction multivalente**.

Deux paramètres importants influençant l'efficacité d'internalisation de cette famille de glycoconjugués ont été ici mis en évidence :

- La **multivalence**, qui augmente jusqu'à 8000 fois l'efficacité d'internalisation par ASGP-R. Celle-ci est optimale pour des molécules tri- à tétravalentes.
- Le choix du sucre est lui aussi un critère fondamental, puisque la lectine montre une nette **préférence pour les GalNAc** comparée aux Lac et Gal, d'un facteur 6 à 8 respectivement.

L'influence de la configuration anomérique s'est révélée faible, bien que les composés d'anomérie α semblent deux fois mieux internalisés que leurs isomères d'anomérie β quelle que soit la valence. Enfin, l'augmentation de la longueur et de la flexibilité du bras espaceur reliant le sucre au reste de la molécule ne favorise l'internalisation que de façon négligeable. Ceci signifie que longueur des espaceurs satisfait d'ores et déjà à une interaction multivalente du CP^{4α} avec plusieurs domaines de reconnaissances des lectines ASGP-R.

La stratégie de vectorisation de mimes de métallochaperonnes par les glycoconjugués d'architecture cyclodécapeptidique est donc efficace et pertinente, et le CP^{4α} semble être le meilleur glycoconjugué de la famille CP pour la vectorisation vers l'ASGP-R.

Tableau 11 : Récapitulatif des efficacités d'internalisations relatives au compétiteur de référence, le GAINAc, des différents glycoconjugués de la famille CP.

Glycoconjugué (1 μM)	IC ₅₀ GalNAc (mM)
CP ^{4α} -Cy5	7,8 ± 0,2
CP ^{4β} -Cy5	4,3 ± 0,1
CP ^{1α} -Cy5	0,7 ± 0,1
CP ^{3α} -Cy5	4,0 ± 0,5
CP ^{3β} -Cy5	1,5 ± 0,1
CP ^{4βLac} -Cy5	0,8 ± 0,1
CP ^{4βGal} -Cy5	0,5 ± 0,1
CP ^{4pegα} -Cy5	10,4 ± 0,4

Chapitre IV-

La famille des tripodes (T)

Une deuxième famille de glycoconjugués est étudiée : la famille T. Elle regroupe des composés tripodaux pour lesquelles trois unités de ciblage β GalNAc sont introduites sur le chélateur pseudopeptidique par des ponts disulfures ou des liens amides avec des bras espaceurs polyéthylèneglycol (PEG). L'unité chélatrice NTA(CysNH₂)₃ ou NTA(D-PenNH₂)₃ coordine le Cu(I) grâce à trois fonctions thiol. Les propriétés de chélation *in vitro* et *in cellulo* des composés de la famille T ont été présentées dans le chapitre I. Leur capacité à cibler les hépatocytes *via* les ASGP-R est ici évaluée par cytométrie en flux, afin de déterminer le mécanisme et l'efficacité d'internalisation dans les cellules hépatiques.

I - Elaboration des glycoconjugués pour l'étude de l'efficacité de ciblage

I.1) Différents dérivés de la famille T

Différents glycoconjugués de la famille T ont été présentés dans le chapitre 1. Leurs structures sont rappelées sur la figure 105.

Le composé **Chel2** est le glycoconjugué ayant fait preuve des meilleures propriétés de chélation du Cu(I) *in vitro* et *in cellulo*. Son unité chélatrice associe une plateforme chimique acide nitrilotriacétique (NTA) à trois résidus Cys. Ce pseudopeptide est fonctionnalisé par trois unités GalNAc liées aux fonctions thiols par un pont disulfure *via* un espaceur PEG 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol d'environ 11-12 Å. Ainsi, la distance entre l'azote apical du NTA et les GalNAc est d'environ 20 Å.

Divers dérivés de Chel2 ont été également obtenus afin d'étudier l'influence de l'architecture moléculaire sur la chélation et l'incorporation. Les glycoconjugués **Chel4** et **Chel6** possèdent la même unité de chélation que Chel2. **Chel3** diffère de Chel2 au niveau de l'introduction des unités de ciblage sur le pseudopeptide. Dans Chel3, le lien chimique entre l'unité de ciblage et le chélateur est une fonction amide, qui n'est pas rompue en milieu réducteur. **Chel6** quant à lui possède un lien glycosidique différent entre les GalNAc et les bras espaceurs PEG. Le lien O-glycosidique présent sur Chel2 a été remplacé par un lien triazole plus résistant à l'hydrolyse. De plus, il est possible que ce dernier établisse des points d'interaction supplémentaires avec le site de reconnaissance de l'ASGP-R. Enfin, **Chel4** possède le même système de ciblage que Chel2 mais une unité chélatrice différente. En effet, des résidus D-pénicillamines (D-Pen), couramment utilisés pour traiter la maladie de Wilson sous le nom de Trolovol[®], sont insérés sur la plateforme NTA à la place des résidus Cys.

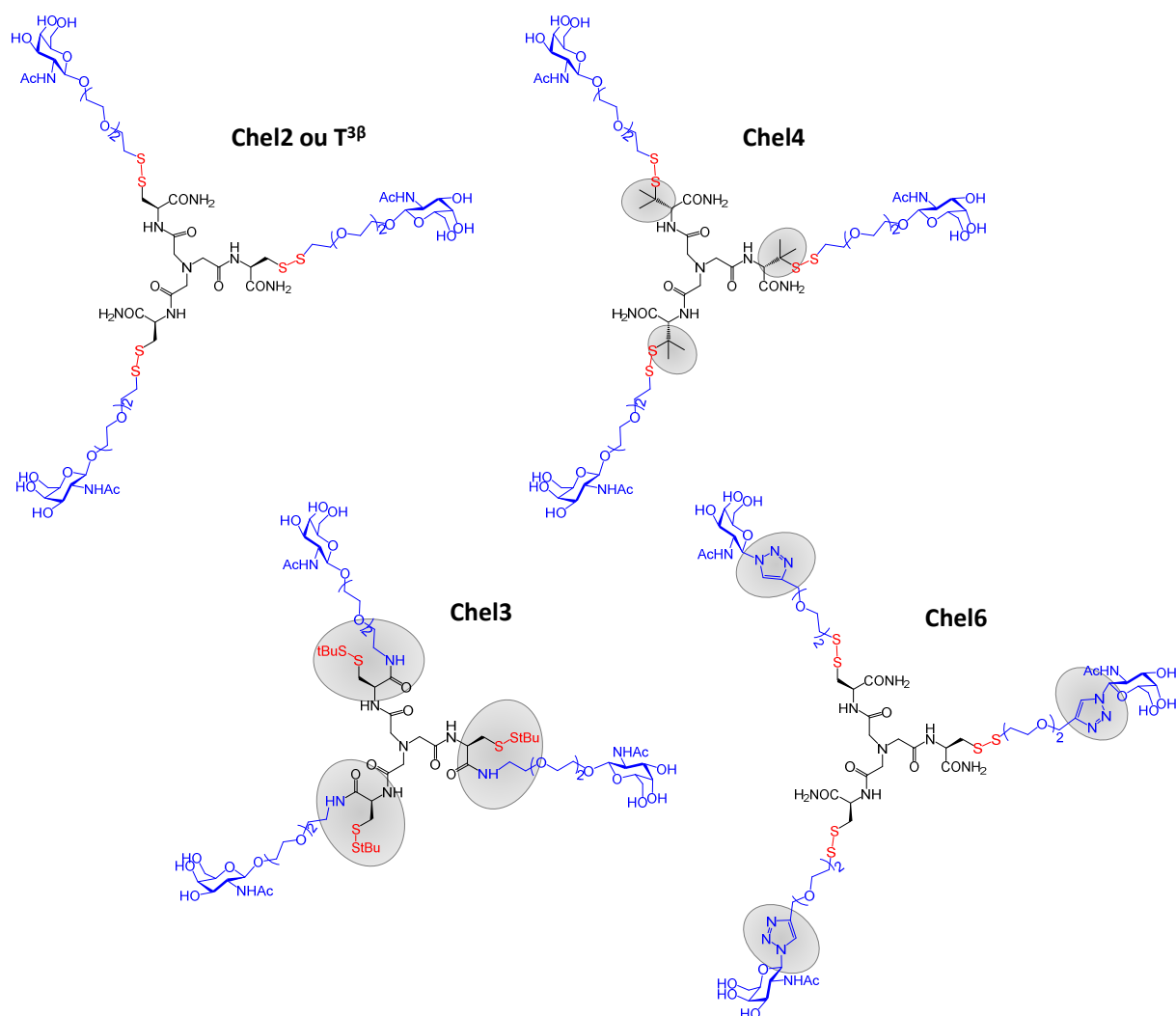


Figure 105 : Structure des glycoconjugués Chel2, Chel3, Chel4 et Chel6 ; les unités de ciblage sont représentées en bleu, les ponts disulfures masquant les fonctions chélatrices en rouge et enfin les différences entre les glycoconjugués sont repérées par les cercles gris.

L'internalisation de Chel2 dans les cellules hépatiques est suivie grâce à l'introduction d'un fluorophore, la sulfo-cyanine 5 (Cy5), qui est introduit *via* un lien amide sur la plateforme. Cette dernière est de ce fait remplacée par un NTA(Lys) afin de disposer d'une fonction amine nécessaire au couplage (figure 106). Il est à noter que le tripode perd alors sa symétrie C_3 . Seul Chel2 a été marqué par le fluorophore. En effet, l'efficacité d'internalisation de la série de glycoconjugués a été étudiée par rapport à Chel2 pris comme composé de référence.

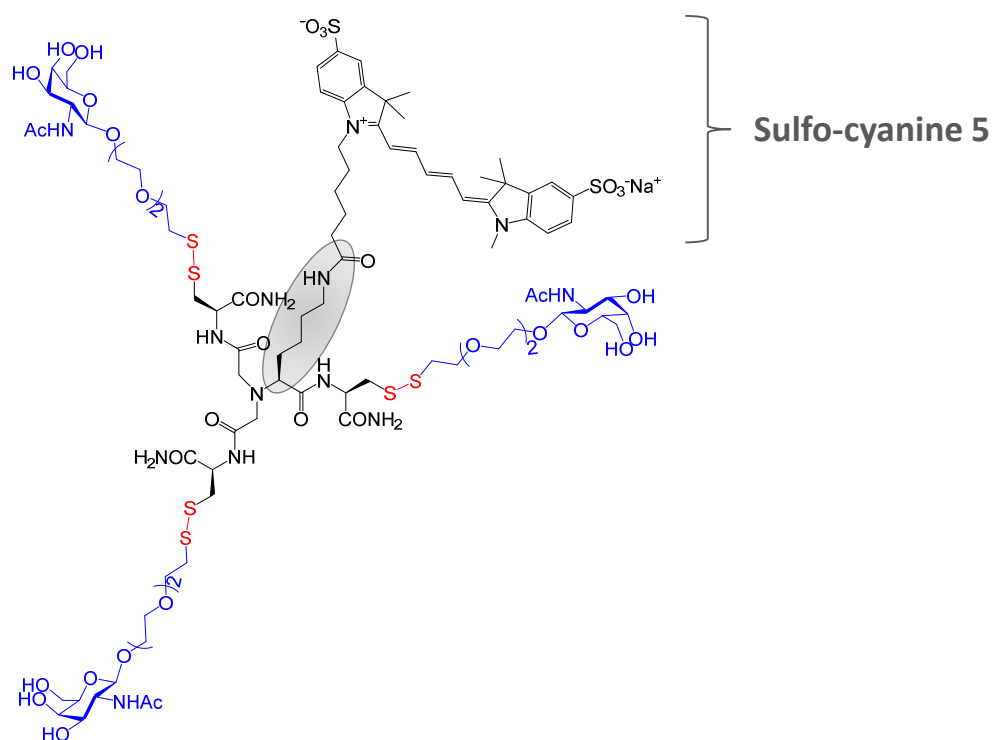


Figure 106 : Modification apportée au glycoconjugué Chel2 pour son marquage avec le fluorophore sulfo-cyanine 5.

L'influence de plusieurs paramètres structuraux sur l'efficacité de ciblage a été étudiée. D'après les informations recueillies de la littérature et celles apportées par l'étude des composés de la famille CP, deux critères ont été retenus comme pertinents pour l'étude des composés de la famille T : **le nombre et la configuration anomérique des GalNAc** qui peut être α ou β . Deux glycoconjugués d'architecture tripodale analogues à Chel2 ont donc été synthétisés afin de varier ces paramètres. Nous partons donc de la conclusion établie précédemment que le GalNAc est le sucre le plus efficacement reconnu par l'ASGP-R et que les bras espaceurs de 20 Å environ satisfont à une interaction par effet cluster.

Une nomenclature similaire à celle développée dans le chapitre III pour la famille CP est également utilisée pour désigner ces composés :

- **T** indique que le glycoconjugué appartient à la famille d'architecture tripodale,
- **le nombre et la configuration anomérique du GalNAc** sont indiqués en exposant.
- enfin la mention « -Cy5 » après le nom indique le **marquage du glycoconjugué** par la sulfo-cyanine 5.

Par exemple, $T^{3\beta}$ -Cy5 désigne le pseudopeptide portant trois résidus GalNAc de configuration β (Chel2), marqué par la Cy5 (figure 107).

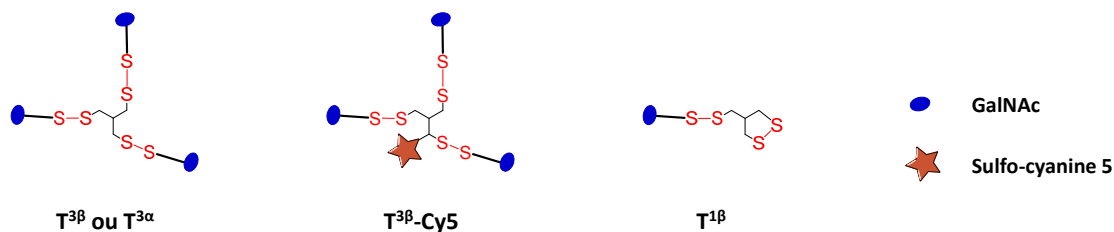


Figure 107 : Représentation schématique et nomenclature des dérivés de Chel2 faisant varier le nombre, la configuration anomérique des sucres et portant le fluorophore sulfo-cyanine 5.

Dans la suite de ce chapitre, la synthèse et l'étude *in cellulo* de l'efficacité d'internalisation de ces différents composés dans les cellules hépatiques sont présentées.

I.2) Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse des glycoconjugués de la famille T est analogue à celle utilisée pour la famille CP (schéma 7):

- d'un part, une chaîne PEG de 11-12 Å est introduite en position anomérique du GalNAc, dans les deux configurations α ou β pour le lien O-glycosidique, et en β seulement pour le lien triazole.
- d'autre part l'unité de chélation pseudopeptidique est synthétisée à partir du NTA, ou du N_{α} - N_{α} -bis(carboxyméthyl)-L-lysine que l'on notera par la suite NTA(Lys) pour les composés destinés à être marqués.
- les deux unités sont assemblées entre elles par ligation chimiosélective (pont disulfure ou lien amide).

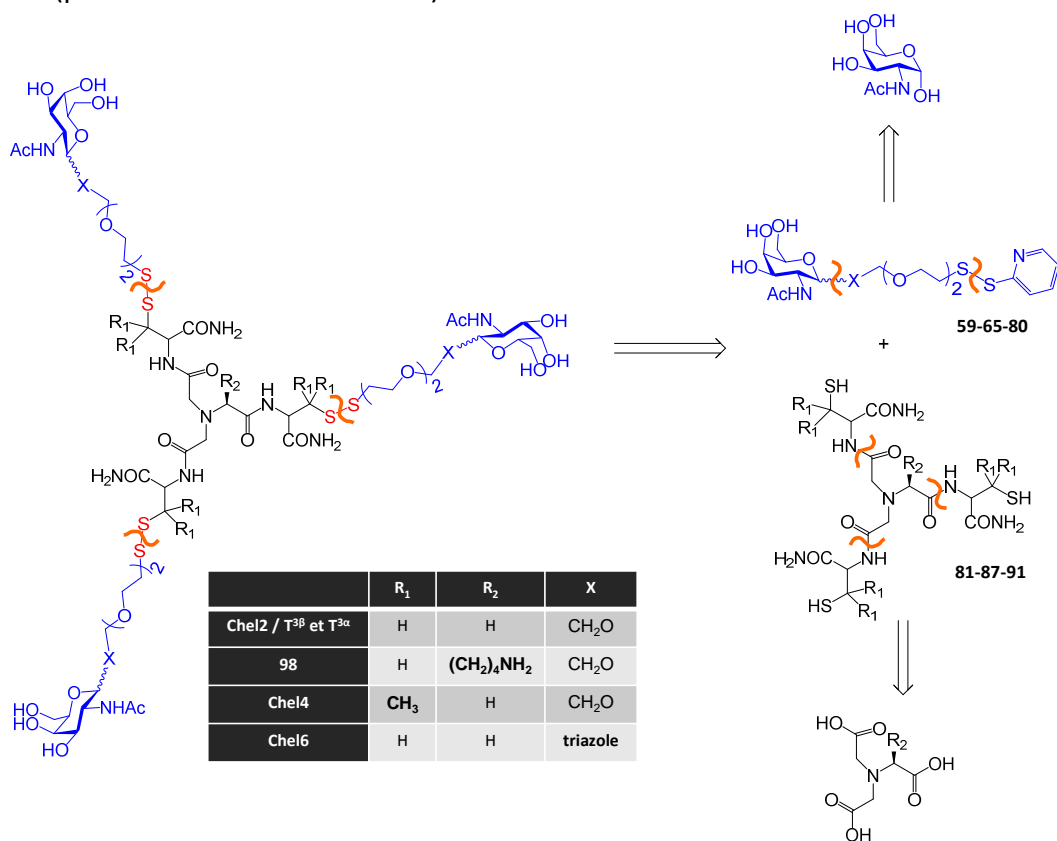


Schéma 7 : Rétrosynthèse des composés de la famille T (sauf Chel3) ; les unités de ciblage et bras espaceurs sont représentées en bleu, les ponts disulfures masquant les fonctions chélatrices en rouge, et les unités tripodales chélatrices en noir.

Dans le cas du composé marqué, la Cy5 est introduite sur l'amine libre présente sur la plateforme NTA(Lys). Enfin, le glycoconjugué **Chel3** a nécessité une modification de la stratégie de synthèse. En effet, la fonctionnalisation des fonctions amides du NTA(CysNH₂)₃ par les résidus GalNAc-PEG s'est avérée très difficile. La stratégie de synthèse développée consiste au greffage des Cys sur la chaîne PEG portée par le sucre, puis l'introduction de ce synthon sur un NTA activé par des fonctions *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (schéma 8).

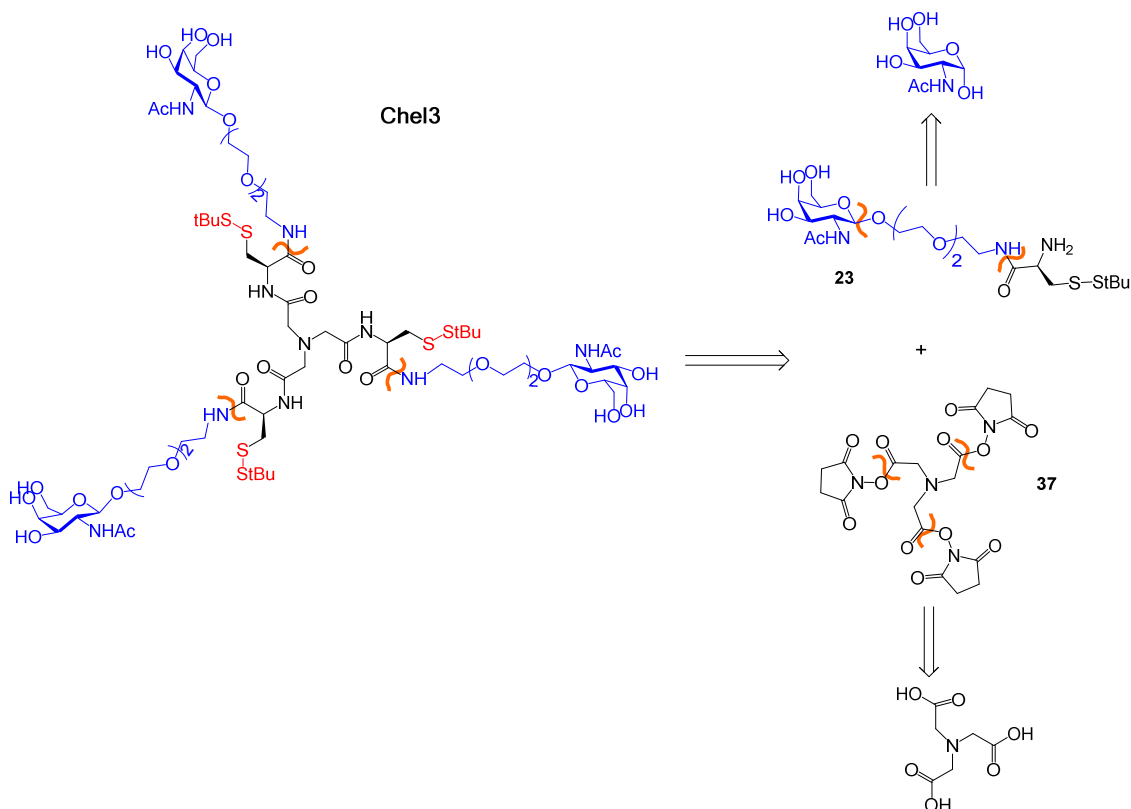


Schéma 8 : Rétrosynthèse du glycoconjugué Chel3 ; les unités de ciblage et bras espaceurs sont représentées en bleu, les ponts disulfures masquant les fonctions chélatrices en rouge, et les unités tripodales chélatrices en noir.

Les synthèses des différents glycoconjugués ont été mises au point et optimisées lors de précédents travaux au laboratoire RICC/SCIB/INAC/CEA. Les synthèses de Chel2 et son homologue asymétrique ont été mises au point par Pujol *et al.*¹², celle de Chel4 par Jullien *et al.*⁷² Puis Rivaux *et al.* ont à la fois optimisé ces synthèses et mis au point la synthèse des glycoconjugués Chel3 et Chel6. Enfin, la synthèse de T^{3α} a été adaptée par Robert *et al.* Les composés Chel2, Chel3, Chel4 et Chel6 utilisés dans ces travaux de thèse ont été synthétisés par Céline Rivaux, et le composé T^{3α} par Faustine Robert. J'ai pour ma part réalisé la synthèse des composés asymétriques.

1.3) Synthèse des unités de ciblage des ASGP-R reliées aux bras espaceurs

Sur les différents glycoconjugués de la famille T, les unités de ciblage GalNAc sont reliées à des bras espaceurs PEG de 11-12 Å par liaison O-glycosidique, sauf pour Chel6 pour lequel un lien triazole est utilisé. Les généralités sur la synthèse de sucres modifiés sont rappelées dans le chapitre III.

I.3.a - Unité de ciblage de T^{3β}, T^{1β} et de Chel4

L'intermédiaire **59** permettant d'introduire l'unité de ciblage est utilisée pour la synthèse de T^{3β}, T^{1β} et Chel4. Le composé **59** est synthétisé en six étapes à partir du GalNAc commercial, avec un rendement global de 20% (schéma 9).¹² Une chaîne 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol commerciale est introduite en position anomérique du GalNAc. Puis un thiol activé est inséré en bout de chaîne PEG afin de promouvoir la formation chimiosélective d'un pont disulfure intermoléculaire entre le système de ciblage ainsi obtenue et l'unité de chélation.¹²

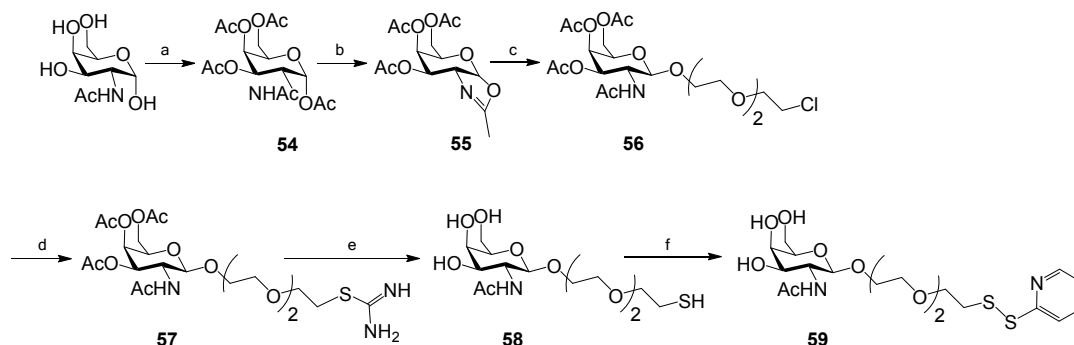


Schéma 9 : Synthèse de l'unité GalNAc-PEG possédant un thiol activé en bout de chaîne ; (a) Ac₂O (10 eq.), pyridine (17 eq.), 12h, t.a. (Qtt) ; (b) TMSOTf (3,4 eq.), CH₂Cl₂, 12h, 45°C. (Qtt) ; (c) 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol (1,65 eq.), TMSOTf (0,6 eq.), CH₂Cl₂, 12h, t.a. (55%) ; (d) Thiourée (2,2 eq.), H₂O, 24h, 110°C ; (e) NaOH (pH 9,6), MeOH/H₂O, 7h, 85°C ; (f) Aldriothiol (3 eq.), MeOH, 4h, t.a. (33%).

Les fonctions hydroxyles du sucre sont tout d'abord acétylées par traitement à l'aide d'anhydride acétique en présence de pyridine, pour conduire au composé **54**.^{259,260} Le GalNAc acétylé obtenu est ensuite activé sous forme d'oxazoline **55** en présence de TMSOTf (trifluorométhylsulfonate de triméthylsilyle).^{175,259} Cet intermédiaire gêne l'attaque du nucléophile sur la face α du sucre, tel que montré dans le phénomène d'assistance anchimérique dans le chapitre 3 (figure 90). Il permet ainsi l'obtention sélective de la configuration β dans un ration 8/2 (β/α) lors de l'étape de couplage glycosidique avec l'alcool 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol. Le composé **56** purifié par chromatographie sur gel de silice est ainsi obtenu, avec un rendement global de 55% sur les trois étapes. Il est à noter que le sucre de configuration anomérique α est également isolé mais en faible quantité et qu'il est difficilement purifiable parce qu'élué en même temps que l'alcool en excès.

Une fonction thiol activé par un motif S-Pys est ensuite insérée en bout de la chaîne PEG. Parmi de multiples méthodes d'activation possibles, le radical 2-pyridyl-sulfanyl (PYS) est le plus couramment employé et a été choisi parce qu'il s'est révélé être le plus efficace.^{14,292,293} Pour cela, une fonction thiol est introduite en bout de chaîne PEG puis elle est activée par l'aldriothiol au moyen d'un échange de disulfure. Les thiols étant sensibles à l'oxydation, ceci est réalisé en trois étapes *in situ*, à l'abri de l'oxygène sous flux d'argon et en solvants dégazés. Dans un premier temps, l'intermédiaire thiourée **57** est généré à partir du dérivé chloré **56** par addition de thiourée dans l'eau.²⁹⁴ La coupure de la fonction thiourée en thiol et la déprotection sélective des groupements hydroxyles du sucre sont exécutées de manière simultanée par traitement basique à l'aide de soude, à reflux. Lors de cette étape, le pH est rigoureusement contrôlé, et maintenu à 9,6 afin de déprotéger les

groupements hydroxyles sans dépasser 10 pour ne pas déprotéger l'amine acétylée en position 2 du sucre.²⁹⁵ Cette réaction est suivie par RMN ¹H, et la formation du composé **58** ainsi que d'un sous-produit d'oxydation (10%) sont observés (figure 108).

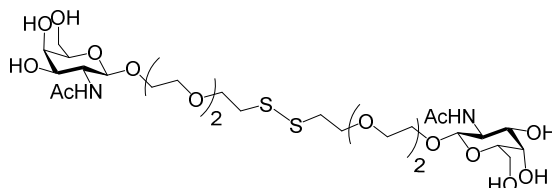


Figure 108 : Sous-produit de dimérisation de l'unité de ciblage.

Enfin, le produit activé **59** est obtenu après addition de l'aldrithiol, avec un rendement de 33% à partir du dérivé chloré. Il est purifié par HPLC (« *high pressure liquid chromatography* ») préparative sans acide trifluoroacétique (TFA).

I.3.b - Unité de ciblage de T^{3α}

L'emploi du GalNAc comme synthon de départ favorise la formation du composé de configuration β par assistance de groupe voisin, comme nous l'avons vu dans le chapitre III. Par conséquent, l'accès à la configuration anomérique α par la voie de synthèse décrite dans le paragraphe précédent est difficile ; l'anomère α n'est obtenu qu'en faible quantité et il est difficilement purifiable.

En s'inspirant de la synthèse du GalNAcαONH₂ présentée dans le chapitre précédent, une nouvelle voie de synthèse de cet anomère a été mise au point au sein de l'équipe RICC/SCIB/INAC/CEA, en 8 étapes avec un rendement global de 6%. Elle consiste à utiliser le tri-O-acétyl galactal commercial comme synthon de départ, à partir duquel le tri-O-acétyl 2-azido-2-déoxy galactose **5** est obtenu après une azidonitration en présence de Cérium Ammonium Nitrate (IV) et d'azoture de sodium puis une hydrolyse au thiophénol, selon la voie de synthèse décrite dans le chapitre III. Ensuite, une méthode d'activation différente est utilisée : celle des trichloroacétimide (schéma 10).^{267,296}

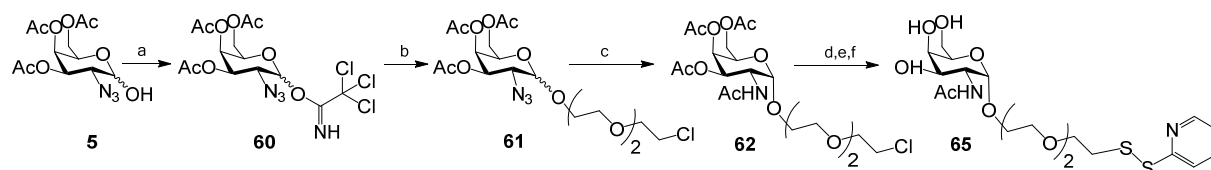


Schéma 10 : Synthèse du GalNAc O-glycosylé en configuration α : (a) Trichloroacétonitrile (5 eq.), K₂CO₃ (5 eq.), CH₂Cl₂, 16h, t.a. (83%) ; (b) 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol (1,5 eq.), TMSOTf (2 eq.), Et₂O/CH₂Cl₂ (2/1, v/v), 30 min., -20°C (91%) ; (c) H₂, Pd/C (10%, 1 eq.), MeOH/Ac₂O (9 :1), 1h30, t.a. (33%) ; (d) Thiourée (2,2 eq.), H₂O, 24h, 110°C ; (e) NaOH (pH 9,6), MeOH/H₂O, 7h, 85°C ; (f) Aldrithiol (3 eq.), MeOH, 4h, t.a. (46%).

Le sucre activé formé **60** est plus stable que les dérivés halogénés, et il est possible de contrôler la stéréochimie de la réaction (schéma 10). Par ajout de trichloroacétonitrile en présence d'une base forte, le sucre activé de configuration α est obtenu majoritairement par effet anomère, la réaction d'activation est sous contrôle thermodynamique (voir chapitre III). A l'inverse, en présence de base faible, la réaction est sous contrôle cinétique et la configuration β est majoritaire. En se plaçant ici sous contrôle cinétique à l'aide de K₂CO₃, le composé activé tri-O-acétyl 2-azido-2-déoxy galactopyranosyl trichloroacétimide **60** est

obtenu avec un rendement de 83% et un ratio α/β de 0.7/1. L'obtention d'un sucre activé de configuration anomérique β permet de favoriser une glycosylation en α , grâce à l'attaque du nucléophile sur la face α du sucre selon un mécanisme de type SN2 avec inversion de configuration (figure 109).

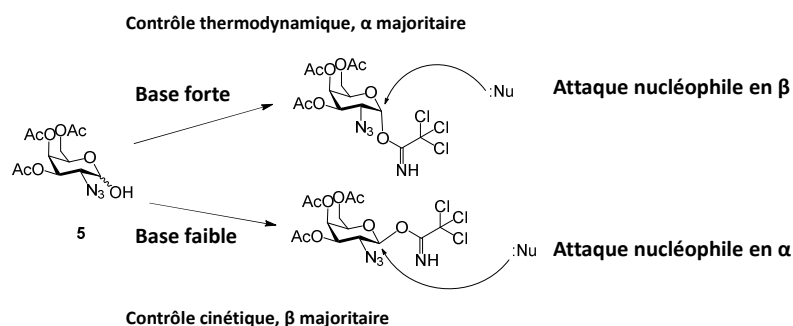


Figure 109 : Activation du sucre 5 par voie aux trichloroacétimidates ; contrôle de la stéréochimie.

Le couplage glycosidique avec le 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol est ensuite réalisé en présence de TMSOTf, conduisant au composé **61** en mélange α/β avec un rendement de 91%. Le ratio entre les deux anomères déterminé par RMN ^1H est de 1:0,7 ($\alpha:\beta$). Ce ratio est l'exact opposé de celui obtenu pour le sucre trichloroacétimide **60**, ce qui confirme un mécanisme d'attaque nucléophile SN2. Les deux anomères sont séparés après la réduction et acétylation *in situ* de l'azoture de la position 2, au moyen d'une hydrogénation catalytique par palladium sur charbon activé (10%), en présence d'anhydride acétique. Le composé **62** de configuration α est obtenu avec un rendement de 33% après purification par chromatographie sur gel de silice. Les étapes suivantes de synthèse pour l'obtention du thiol activé par un S-PYS sont identiques à celles décrite pour le composé d'anomérisation β . Une fonction thiol est introduite en bout de chaîne PEG par réaction avec la thiourée puis traitement basique, qui permet par la même occasion de déprotéger les groupements hydroxyles du sucre **62**. La fonction thiol est ensuite activée par échange de disulfure avec l'aldrithiol, conduisant au composé **65** avec un rendement de 46% sur ces trois étapes à partir du dérivé chloré. Ce rendement est légèrement supérieur à celui obtenu avec le composé d'anomérisation β **59**.

I.3.c - Unité de ciblage de Chel3 et Chel6

Le glycoconjugué **Chel3** diffère de Chel2 par le mode de greffage du système GalNAc-PEG sur le tripode. Ce greffage se fait par un lien amide et non par formation de ponts disulfures sur les thiols. De ce fait, la chaîne PEG portée par le GalNAc est fonctionnalisée par une amine à la place du thiol activé (schéma 11).

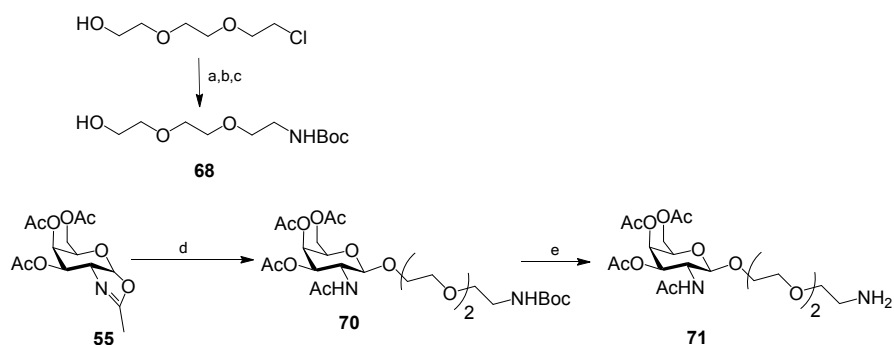


Schéma 11 : Synthèse du système GalNAc-PEG pour le glycoconjugué Chel3 ; (a) NaN₃ (2 eq.), DMF, 16h, 80°C ; (b) PPh₃ (1,1 eq.), H₂O, 16h, t.a. ; (c) Boc₂O (1,1 eq.), EtOH, 5h, t.a. ; (d) **68** (1,65 eq.), TMSOTf (0,6 eq.), CH₂Cl₂, 12h, t.a. (58%) ; (e) TFA (50 eq.), Et₃SiH (3 eq.), CH₂Cl₂, 5h, t.a.

La chaîne PEG-amine **68** est réalisée en 3 étapes à partir du 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol : une fonction azoture est introduite sur l'extrémité de la chaîne PEG par substitution nucléophile, puis elle est réduite en amine par la triphénylphosphine avant d'être protégée par un groupement tert-butyl carbonate (Boc).²⁹⁷⁻³⁰⁰ Cette nouvelle chaîne est ensuite introduite sur l'intermédiaire oxazoline **55**, et le composé **70** de configuration anomérique β est isolé avec un rendement de 58%. Enfin, l'amine en bout de chaîne du composé **70** est déprotégée par traitement acide, conduisant au composé **71** prêt à être introduit sur la fonction acide carboxylique de la Cys.

Le glycoconjugué **Chel6** possède quant à lui un lien triazole entre le sucre et la chaîne PEG, qui est obtenu par cycloaddition de Huisgen entre une fonction alcyne et un azoture (schéma 12).³⁰¹ Il est obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 21%. L'hydroxyle de la chaîne 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol est transformé en fonction propargyle, par un traitement au bromure de propargyle en présence d'hydruure, conduisant à la chaîne PEG **24**.³⁰² Le tri-O-acétyl 1-azido *N*-acétyl-galactosamine **25** est obtenu par traitement à l'azoture de triméthylsilyle en présence de chlorure d'étain.³⁰³ Puis, la cycloaddition chimiosélective de Huisgen catalysée par le Cu est réalisée entre la chaîne **24** et le sucre **25**, conduisant au composé **26** d'anométrie β isolé avec un rendement de 80% (schéma 12).³⁰⁴ Un thiol activé est introduit en bout de chaîne PEG par la voie de synthèse présentée précédemment, donnant le composé **29**. Le rendement des trois étapes impliquant successivement la thiourée, le traitement basique et l'activation par l'aldrithiol est de 32% ; il est comparable à celui obtenu pour le composé O-glycosylé de configuration β (**6**).

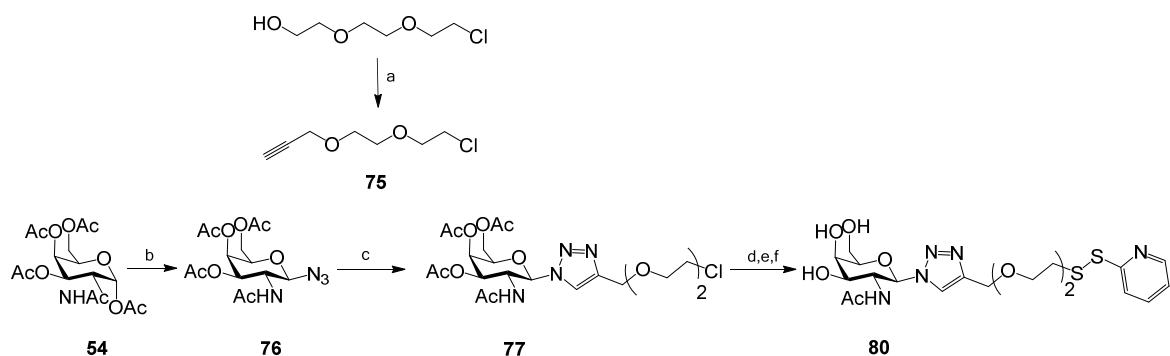


Schéma 12 : Synthèse du système GalNAc-PEG pour le glycoconjugué Chel6 ; (a) NaH (60%, 2 eq.), bromure de propargyl (80% dans toluène, 1,1 eq.), THF, 12h, t.a. (81%) ; (b) TMSN₃ (1,5 eq.), SnCl₄ (0,5 eq.), CH₂Cl₂, 12h, t.a. ; (c) **75** (1,1 eq.), CuSO₄ (0,6 eq.), ascorbate de sodium (1,2 eq.), CH₃CN, 72h., t.a. (80%) ; (d) Thiourée (2,2 eq.), H₂O, 24h, 110°C ; (e) NaOH (pH 9,6), MeOH/H₂O, 7h, 85°C ; (f) Aldrithiol (3 eq.), MeOH, 4h, t.a. (32%).

I.4) Synthèse des unités de chélation tripodales

Les unités de chélation pseudopeptidique sont synthétisées en condition de synthèse peptidique classique en milieu homogène. Le principe de la synthèse peptidique est développé dans le chapitre III. Les activateurs utilisés pour les réactions de couplage peptidique sont l'EDCI (1-éthyl-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide) et l'HOBT (hydroxybenzotriazole). La fonction acide carboxylique est activée par l'EDCI : ils forment un premier intermédiaire qui est ensuite attaqué par l'HOBT, libérant une urée. Ce second intermédiaire formé avec l'HOBT est plus réactif, il réagit donc plus facilement avec l'amine secondaire.

I.4.a - Unité de chélation symétrique

Deux unités de chélation tripodales différentes ont été synthétisées à partir du NTA commercial : L^2 et L^5 .^{12,72} Toutes deux possèdent un axe de symétrie C_3 et diffèrent par la présence de deux groupements méthyles sur le carbone adjacent aux fonctions thiols de L^5 .

Unité de chélation de Chel2 et Chel6 : L^2

L'unité de chélation L^2 est obtenue en deux étapes, avec 34% de rendement (schéma 13).¹² Le pseudopeptide protégé **81** est tout d'abord obtenu par couplage du composé Cys(Trt)-NH₂ en condition de synthèse peptidique, en présence d'EDCI et d'HOBT, avec un rendement de 40% et purifié par chromatographie sur gel de silice. Celui-ci est ensuite déprotégé en milieu acide, donnant l'unité chélatrice NTA(Cys-NH₂)₃ L^2 avec un rendement de 85% après purification par HPLC préparative.

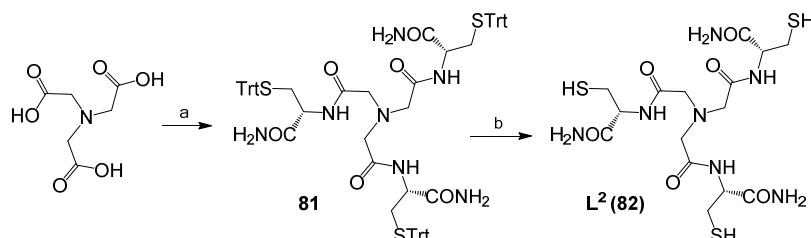


Schéma 13 : Synthèse de l'unité L^2 ; (a) Cys(Trt)-NH₂ (3 eq.), EDCI (3 eq.), HOBT (3 eq.), CH₃CN, 72h, t.a. (40%); (b) TFA (50 eq.), Et₃SiH (6 eq.), CH₂Cl₂, 1,5h, t.a. (85%).

Unité de chélation de Chel4 : L^5

De la même manière, l'unité de chélation NTA(D-PenNH₂)₃ L^5 est synthétisée à partir du synthon D-pen amide **85** couplé sur le NTA commercial en présence d'EDCI et d'HOBT (schéma 14).⁷² Le synthon D-Pen amide est quant à lui obtenu en 3 étapes à partir de la Fmoc-D-Pen(Trt) commerciale, après activation de la fonction acide avec un *N*-hydroxysuccinimide, traitement à l'ammoniac puis déprotection de l'amine.³⁰⁵

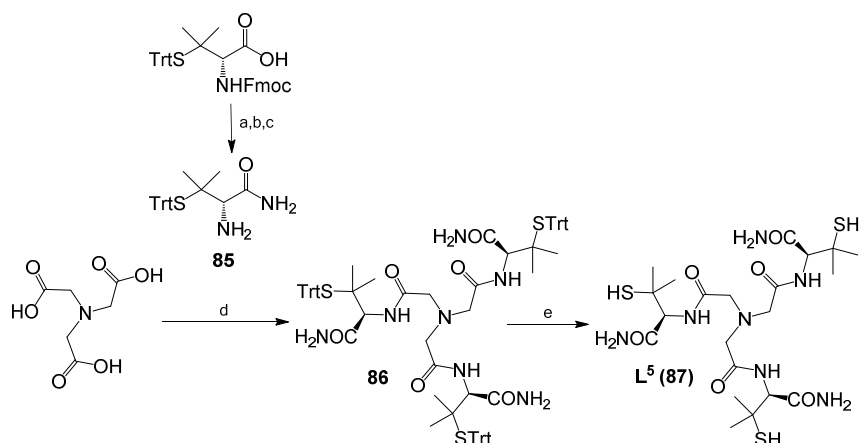


Schéma 14 : Synthèse de l'unité L⁵ ; (a) NHS (1,45 eq.), EDCI (1,3 eq.), CH₃CN, 16h, t.a. (92%) ; (b) NH₃ (30 eq.), CH₃CN, 1h, t.a. ; (c) Et₃N (36 eq.), CH₃CN, 8h, t.a. ; (d) **85** (3 eq.), EDCI (3,1 eq.), HOBT (3,1 eq.), CH₃CN, 16h, t.a. ; (e) TFA (50 eq.), Et₃SiH (9,1 eq.), CH₂Cl₂, 1h, t.a. (35%).

Cas particulier de Chel3

Le couplage des fonctions amines des chaînes PEG du composé **71** sur les fonctions acides de Cys greffées sur le NTA n'ayant pas fonctionné, le glycoconjugué Chel3 a été synthétisé d'une manière différente (schéma 15). Des unités Boc-tert-butyle mercapto L-Cystéine activée par un *N*-hydroxysuccinimide **69** sont donc directement introduites sur les amines des chaînes PEG. Le produit **72** obtenu avec un rendement de 71% est ensuite déprotégé successivement en milieu acide puis par trans-estérification avec le méthanolate de sodium, donnant le composé **74** prêt à être introduit sur le NTA. Les fonctions thiols des Cys de ce composé sont masquées par leur implication dans des ponts disulfures avec des thio-ter-butyles. Les fonctions acides carboxyliques du NTA sont quant à elles activées par des groupements *N*-hydroxysuccinimides (NHS), conduisant au tripode activé **88** (schéma 15).

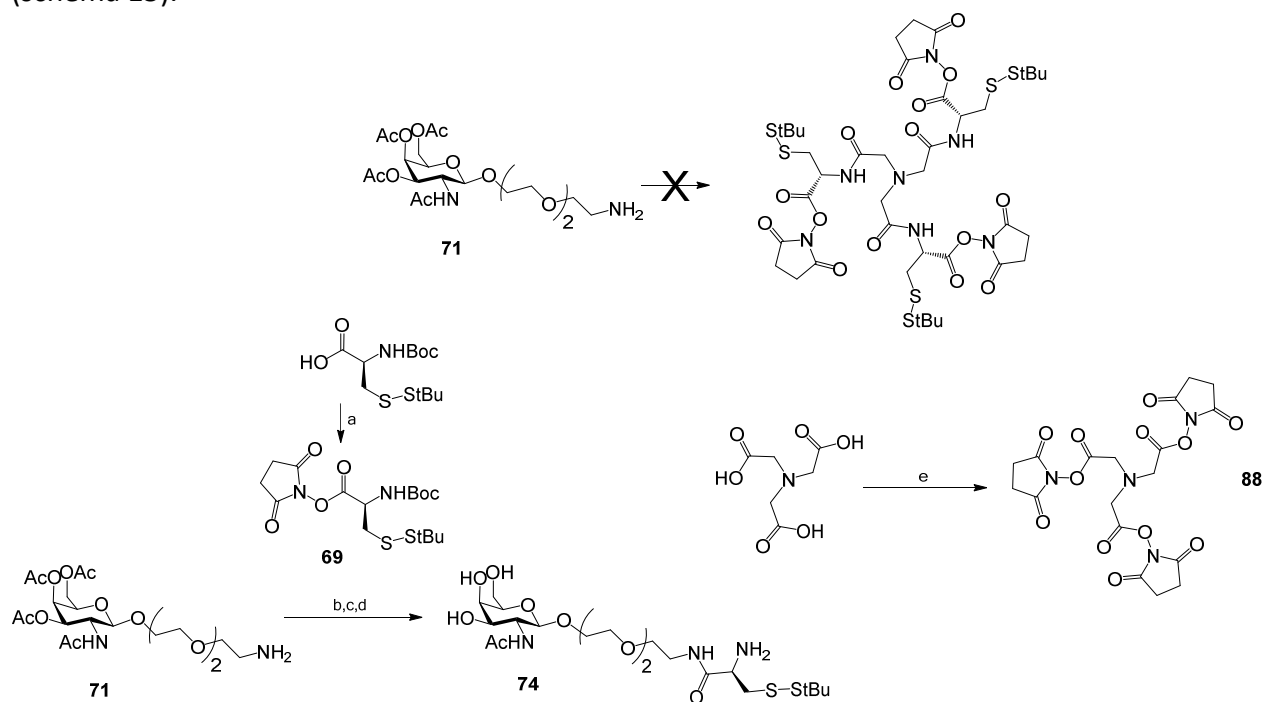


Schéma 15 : Synthèse des synthons pour l'obtention de Chel3 ; (a) NHS (1,4 eq.), EDCI (1,3 eq.), CH₃CN, 24h, t.a. ; (b) **69** (1,1 eq.), DIPEA (pH7), CH₃CN, 20h, t.a. (71%) ; (c) TFA (50 eq.), Et₃SiH (3 eq.), CH₂Cl₂, 3h, t.a. (Qtt) ; (d) NaOMe (1,5 eq.), MeOH, 12h, t.a. (Qtt) ; (e) NHS (42 eq.), EDCI (41 eq.), 20h, t.a.

I.4.b - Unité de chélation asymétrique

L'unité de chélation asymétrique portant une fonction amine primaire pour l'introduction du fluorophore est obtenue en trois étapes à partir de la $N\alpha,N\alpha$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine commerciale, avec un rendement global de 60% (schéma 16).

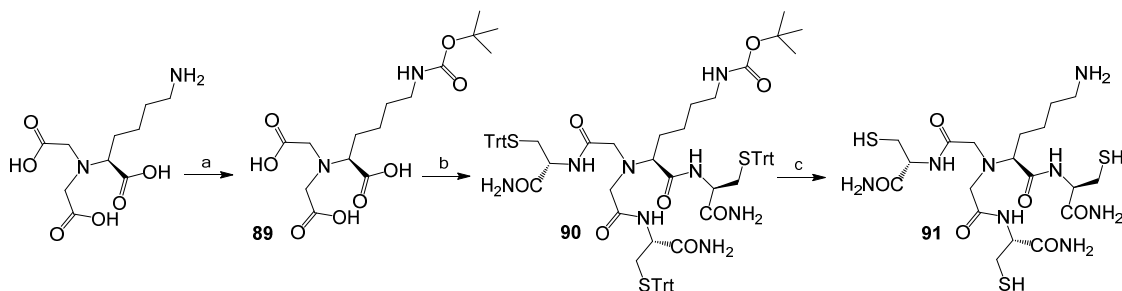


Schéma 16 : Synthèse de l'unité asymétrique analogue de L^2 ; (a) Boc_2O (1,5 eq.), NaHCO_3 (2,6 eq.), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 24h, t.a. ; (b) $\text{Cys}(\text{Trt})\text{-NH}_2$ (3 eq.), EDCI (3,1 eq.), HOBT (3,1 eq.), CH_3CN , 30h, t.a. (74%); (c) TFA (50 eq.), Et_3SiH (6 eq.), CH_2Cl_2 , 1,5h, t.a. (96%).

La première étape consiste en la protection de l'amine de la $N\alpha,N\alpha$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine par un groupement tert-butyl carbonate (Boc), donnant le composé **89**. Les trois résidus $\text{Cys}(\text{Trt})\text{-NH}_2$ sont ensuite introduites par couplage peptidique sur les fonctions acides carboxyliques, en présence des agents de couplage EDCI et HOBT comme dans le cas de L^2 . Le composé **90** est obtenu avec un rendement de 74% après purification par chromatographie sur gel de silice, sur les deux étapes. Les fonctions thioles et amine de ce pseudopeptide sont enfin déprotégées en milieu acide, donnant le composé **91** purifié par HPLC préparative, avec un rendement de 96%.

I.5) Assemblage des deux unités et marquage par la cyanine 5

Une fois les unités de ciblage et de chélation obtenues, celles-ci sont assemblées pour accéder aux différents glycoconjugués. Le glycoconjugué $T^{3\beta}$ est ensuite marqué avec le fluorophore Cy5.

I.5.a - Assemblage des unités de ciblage avec les unités de chélation

Lien disulfure

Les glycoconjugués sont assemblés par formation régiosélective d'un pont disulfure dissymétrique par réaction intermoléculaire entre les fonctions thioles portés par les résidus Cys ou D-Pen des tripodes, et les fonctions thioles activés en bout de chaîne PEG des unités de ciblage (schéma 17).^{293,306} Il n'est donc pas nécessaire de protéger la fonction amine de la chaîne latérale de la Lys sur les tripodes asymétriques. Cette réaction est réalisée à pH4, dans un mélange eau/THF dégazé et sous flux d'argon pour conduire aux glycoconjugués d'intérêt avec de rendement de 40 à 60%.

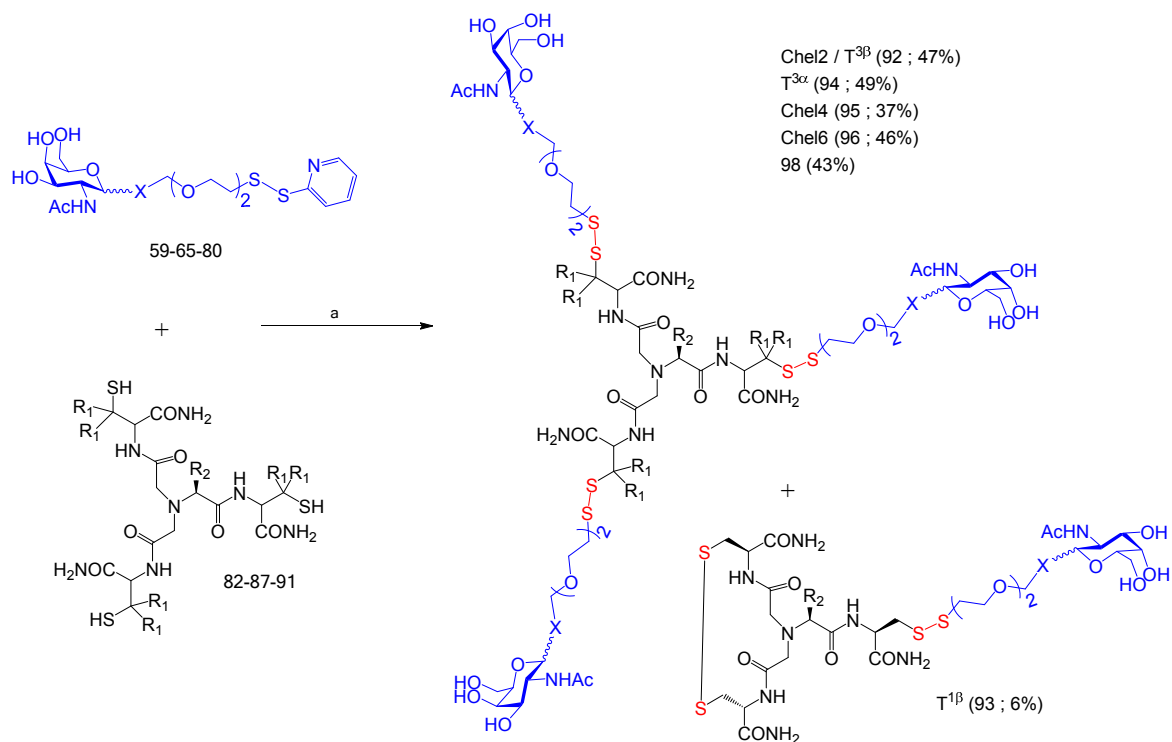


Schéma 17 : Assemblage des glycoconjugués T^{3β}, T^{3α}, Chel4, Chel6, 98, et obtention de T^{1β} ; (a) 81/87/91 (1 eq.), 59/65/80 (3,5 eq.), THF/H₂O (pH4), 4h, t.a. ; R₁ = H ou CH₃, R₂ = H ou (CH₂)₄NH₂, X = CH₂O ou triazole.

Le produit de couplage chimiosélectif n'est pas le seul observé ; la dimérisation d'unités de ciblage ainsi que la formation de ponts-disulfures intra-moléculaires sont observés (4-6%). Ainsi, lors de la synthèse du glycoconjugué **Chel2**, le sous-produit monovalent **T^{1β}** présentant une unité de ciblage et un pont disulfure intramolécule est isolé (6%). Celui-ci est utilisé pour étudier l'influence de la multivalence des glycoconjugués tripodaux.

Le rendement obtenu pour le glycoconjugué **Chel2** est supérieur à celui de son analogue de configuration opposée **T^{3α}**. Par ailleurs, une différence est observée entre le tripode **Chel2** et son analogue asymétrique. En effet, la réaction de couplage est gênée par la présence du bras Lys : le rendement passe de 47% pour **31** à 39% pour le tripode asymétrique. Il est à noter que cet effet d'encombrement est également observé avec le tripode **87**, dont les groupes diméthyles conduisent à un rendement de couplage de 40%.

Cas particulier de Chel3

Enfin, concernant Chel3, le synthon **74** pré-fonctionnalisée par une Cys est introduit sur le NTA NHS activé **88**, de manière à obtenir le glycoconjugué **Chel3** (**97**) avec un rendement de 16% après purification par HPLC préparative.

I.5.b - Marquage à la sulfo-cyanine 5

Seul le glycoconjugué $T^{3\beta}$ (**98**) a été marqué par la Cy5. Le marquage du glycoconjugué $T^{3\beta}$ s'effectue par couplage de l'ester activé NHS du fluorophore sur l'amine libre de la chaîne de la Lys portée par le glycoconjugué, à pH8-9 (schéma 18). Le glycoconjugué $T^{3\beta}$ -Cy5 (**99**) est obtenu avec un rendement de 30% après purification par HPLC préparative.

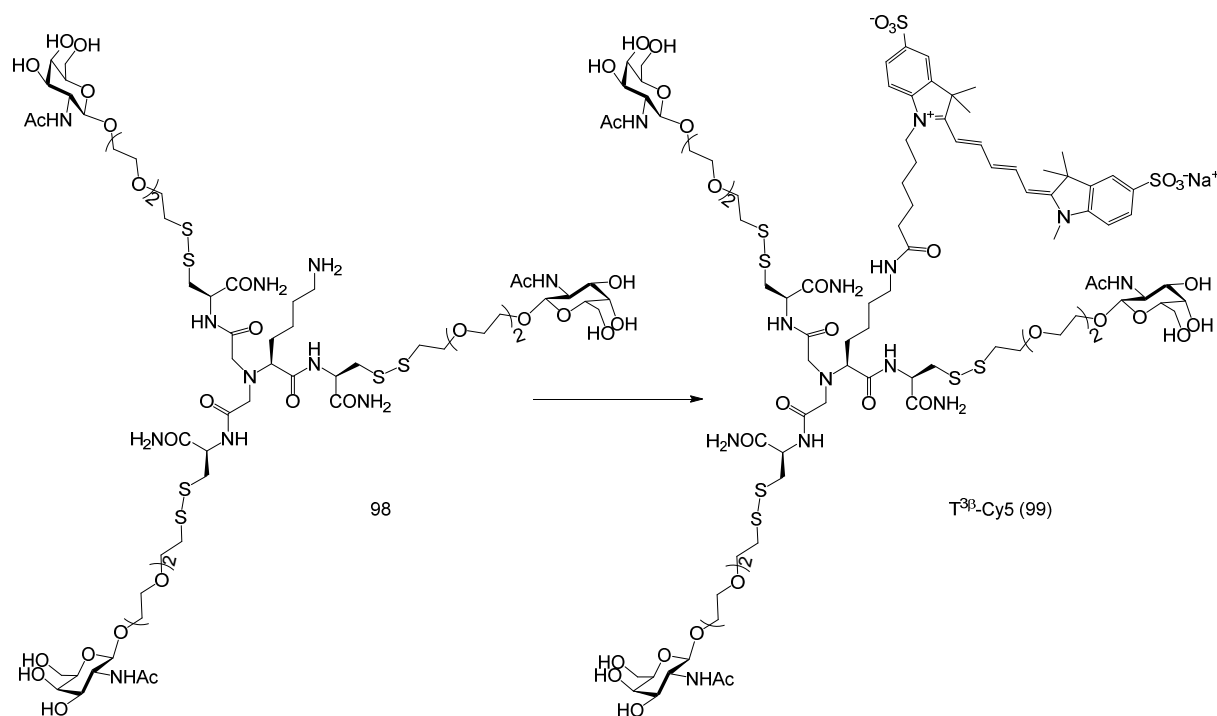


Schéma 18 : Synthèse du glycoconjugué $T^{3\beta}$ -Cy5 ; sulfo-cyanine 5 NHS-ester (1,2 eq.), DIPEA (pH 8-9), CH_3CN , 2h, t.a. (30%)

Pour aller à l'essentiel

La synthèse des glycoconjugés de la famille *T* est réalisée en 10 à 13 étapes, avec des rendements globaux allant de 1 à 10% environ. Une stratégie efficace et applicable à tous les glycoconjugés a été développée, sauf pour *Chel3* mettant en jeu un lien amide. Des unités GalNAc, sur lesquelles sont introduites une chaîne PEG par liaison O-glycosidique ou triazole, sont greffées sur l'unité chélatrice pseudopeptidique par pont disulfure. Pour les pseudopeptides *91* et *L⁵*, l'encombrement apporté par la chaîne latérale Lys ou les groupes diméthyles diminue les rendements de fonctionnalisation d'environ 10%. Une stratégie différente est utilisée pour *Chel3*, pour lequel les résidus GalNAc couplés à des chaînes PEG sont introduits par des liens amides et non par des ponts disulfures sur l'unité tripodale.

Enfin, seul le glycoconjugué $T^{3\beta}$ a été marqué par le fluorophore Cy5. Pour les tests cellulaires, les autres glycoconjugés sont donc utilisés en tant que compétiteurs du $T^{3\beta}$ -Cy5.

II - Etude de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux

Le **mécanisme et l'efficacité d'internalisation** des différents glycoconjugués de la famille T dans les hépatocytes humains HepG2 sont étudiés par cytométrie en flux. Ces glycoconjugués sont comparés par expérience de compétition avec le T^{3β}-Cy5. L'influence de deux paramètres structuraux est de plus analysée pour Chel2, à savoir le nombre de sucre et leur configuration anomérique.

II.1) T^{3β}-Cy5 est internalisé sélectivement et efficacement dans les hépatocytes par l'ASGP-R

Le mécanisme et l'efficacité d'internalisation dans les cellules du glycoconjugué Chel2 sont étudiés grâce à son analogue marqué par un fluorophore : le T^{3β}-Cy5. Le principe des expériences de saturation et de compétition avec le GalNAc sont expliqués dans le chapitre II, et décrites pour le composé CP^{4α}-Cy5 dans le chapitre III. L'étude du glycoconjugué T^{3β}-Cy5 a été réalisée dans les mêmes conditions que celles présentées pour le glycoconjugué CP^{4α}-Cy5.

II.1.a - Saturation des récepteurs par le glycoconjugué T^{3β}-Cy5

Les expériences de saturation des récepteurs permettent d'établir le mécanisme d'internalisation du glycoconjugué et d'en estimer l'efficacité. Les cellules HepG2 sont incubées avec une concentration croissante en T^{3β}-Cy5, de 0 à 15 μM. La courbe d'intensité moyenne de fluorescence des cellules en fonction de la concentration en glycoconjugué obtenue a l'allure d'une hyperbole avec palier de saturation, ce qui est caractéristique d'une internalisation pas des récepteurs (figure 110).¹²⁶ L'**EC₅₀**, correspondant à la concentration en T^{3β}-Cy5 pour la saturation de 50% des récepteurs, est de l'ordre de **2,4 ± 0,5 μM**.

Un contrôle est réalisé sur les cellules HeLa, cellules endothéliales humaines qui n'expriment pas l'ASGP-R : la fonction affine obtenue témoigne d'une faible internalisation passive, comparable à celle du fluorophore seul.

Le glycoconjugué T^{3β}-Cy5 est donc internalisé dans les cellules HepG2 par les ASGP-R.

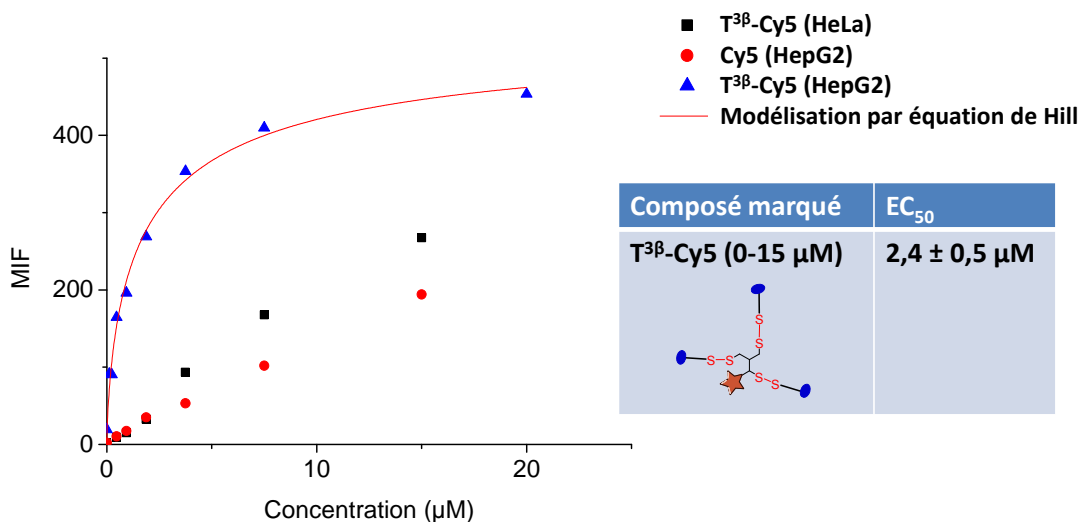


Figure 110 : Courbes de saturation des récepteurs ASGP-R par le T^{3β}-Cy5 de 0 à 15 µM sur cellules HepG2 (▲) modélisée par une équation de Hill et contrôle sur les cellules HeLa (■). Contrôle de l'internalisation de la sulfo-cyanine 5 seule sur cellules HepG2 (●) ; MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

II.1.b - Compétition entre le glycoconjugué T^{3β}-Cy5 et le GalNAc

Des expériences de compétitions avec le ligand monovalent GalNAc sont réalisées afin de mesurer l'efficacité d'internalisation par la lectine. Le glycoconjugué T^{3β}-Cy5 est introduit à concentration fixe sur les cellules HepG2, 1 µM, et la concentration en GalNAc fluctue entre 0 et 300 mM. L'IC₅₀ obtenue, correspondant à la concentration en GalNAc pour inhiber l'internalisation de 50% du glycoconjugué, est de **1,5 ± 0,1 mM** (figure 111).

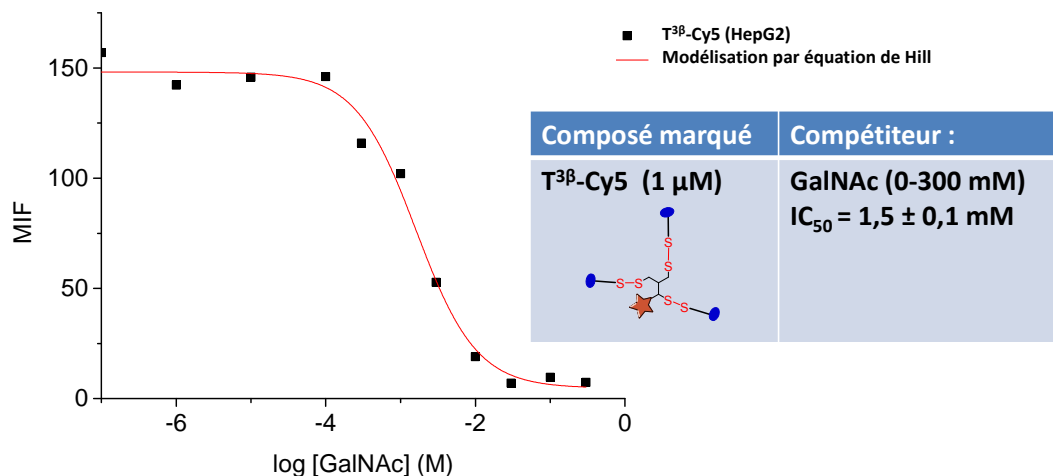


Figure 111 : Courbe de compétition entre le T^{3β}-Cy5 (1 µM) et le GalNAc (0-300 mM) sur cellules HepG2 modélisée par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Cette IC₅₀ de l'ordre du millimolaire témoigne d'une plus forte interaction entre l'ASGP-R et le tripode comparée à celle du GalNAc seul : le tripode est environ 1500 fois plus efficacement internalisé que le GalNAc. De plus, l'existence d'une telle compétition et le retour à zéro de la fluorescence à 300 mM de GalNAc confirment que l'internalisation du glycoconjugué T^{3β}-Cy5 s'effectue par un mécanisme actif *via* l'ASGP-R.

II.2) Etude des différents paramètres sur l'efficacité d'internalisation

Partant de l'hypothèse que tous les glycoconjugués analogues de $T^{3\beta}$ -Cy5 sont internalisés dans les hépatocytes par un mécanisme dépendant des ASGP-R, leurs efficacités d'internalisation sont comparées. Pour cela, des expériences de compétition sur cellules HepG2 sont réalisées entre le **composé marqué de référence $T^{3\beta}$ -Cy5** et les autres glycoconjugués non marqués : Chel3, Chel4, Che6, $T^{1\beta}$ et $T^{3\alpha}$.

II.2.a - Influence du nombre de sucre

Il a été montré que le glycoconjugué $T^{3\beta}$ -Cy5 est 1500 fois mieux internalisé que le GalNAc dans les hépatocytes, ce qui signifie que la présentation multivalente des sucres sur le tripode augmente considérablement l'efficacité de reconnaissance. Il est donc nécessaire de vérifier que cette différence de reconnaissance entre le GalNAc seul et le glycoconjugué $T^{3\beta}$ -Cy5 est due à la multivalence des sucres.

L'influence du nombre de sucre portés par les tripode sur leur efficacité de reconnaissance par la lectine est étudiée par la comparaison des composés $T^{3\beta}$ -Cy5 et $T^{1\beta}$. Le glycoconjugué $T^{1\beta}$ est utilisé en tant que compétiteur, il diffère de $T^{3\beta}$ -Cy5 par sa fonctionnalisation avec un unique sucre et l'absence de marquage. Bien que le palier inférieur de la sigmoïde ne soit pas atteint dans la gamme de concentration choisie, l' IC_{50} est extrapolée en fixant ce palier à la valeur de fluorescence obtenue pour la concentration la plus forte en compétiteur (figure 112). L'incubation des cellules en présence de 1 μ M du composé $T^{3\beta}$ -Cy5 et 0 à 3 mM de compétiteur $T^{1\beta}$ conduit à une IC_{50} de **200 μ M** environ. Ceci signifie que le tripode portant 3 sucres est environ 200 fois mieux internalisé que le monovalent. La multivalence du glycoconjugué $T^{3\beta}$ augmente donc de manière très significative son efficacité de reconnaissance par l'ASGP-R.

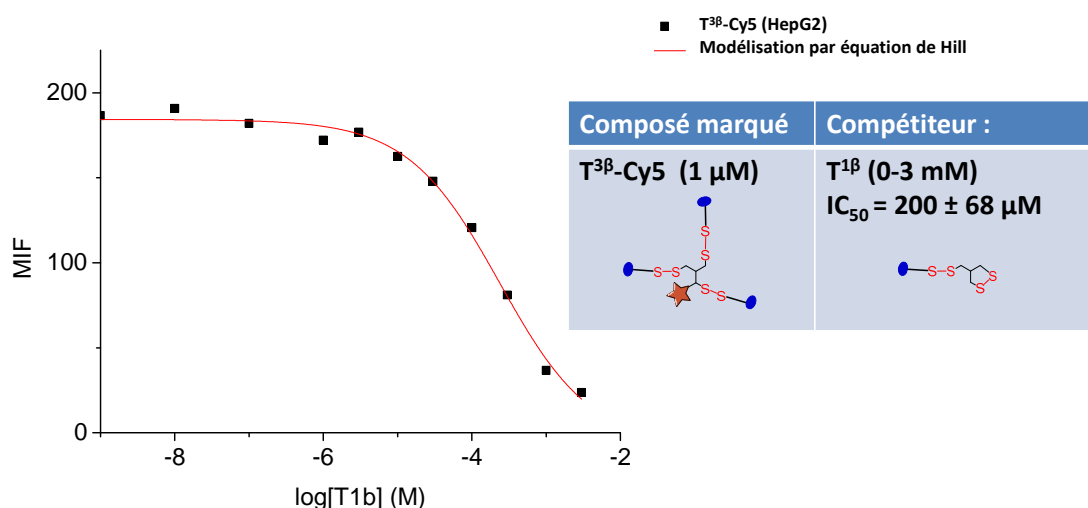


Figure 112 : Courbe de compétition entre le $T^{3\beta}$ -Cy5 (1 μ M) et le $T^{1\beta}$ (0-3 mM) sur cellules HepG2 modélisée par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Cependant, il est à noter le $T^{1\beta}$ est à approximativement un compétiteur 7 fois plus efficace que le GalNAc seul. Ceci implique que pour le glycoconjugués $T^{1\beta}$, la partie de la molécule substituée au GalNAc intervient dans le mécanisme d'internalisation.

II.2.b - Influence de la configuration anomérique des sucres

L'influence de la configuration anomérique des sucres est assez controversée. Les informations de la littérature et l'étude réalisée sur la famille CP tendent à montrer qu'elle est très dépendante de la nature du glycoconjugué, mais elle reste de faible impact. Ainsi, ce paramètre est étudié sur les molécules de la famille T grâce à l'emploi du composé $T^{3\alpha}$ en tant que compétiteur du glycoconjugué $T^{3\beta}$ -Cy5. Le $T^{3\alpha}$ ne diffère de $T^{3\beta}$ -Cy5 que par la configuration des sucres en α au lieu de β et l'absence de marquage. La gamme de concentration choisie pour le $T^{3\alpha}$ est de 0 à 300 μM , contre 1 μM de glycoconjugué marqué. L' IC_{50} obtenue de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ démontre que l'efficacité d'internalisation des deux glycoconjugués est identique (figure 113). Par conséquent, la configuration anomérique des GalNAc n'a pas d'effet majeur sur la reconnaissance des tripodes par la lectine ASGP-R.

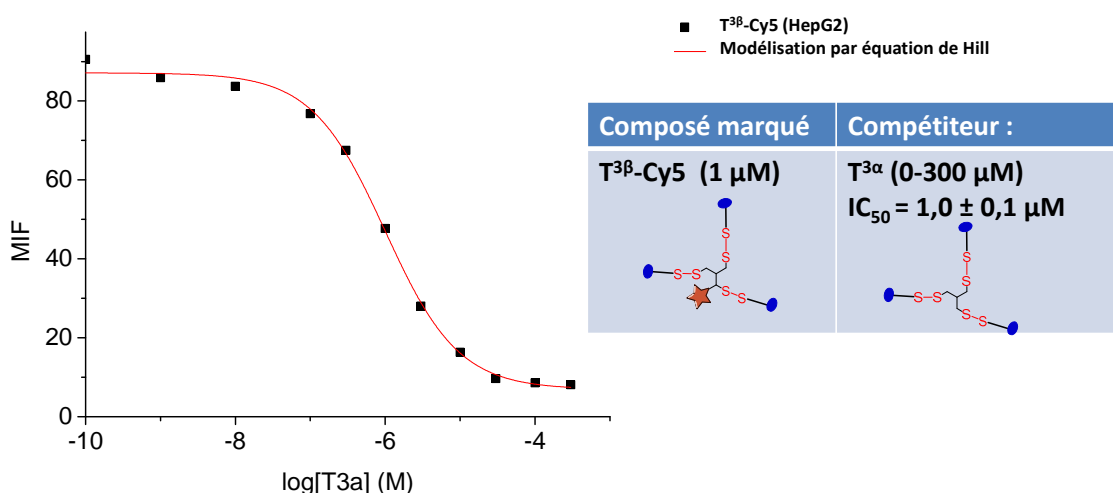


Figure 113 : Courbe de compétition entre le $T^{3\beta}$ -Cy5 (1 μM) et le $T^{3\alpha}$ (0-300 μM) sur cellules HepG2 (carrés) modélisée par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

II.2.c - Glycoconjugués analogues de Chel2 : Chel3, Chel4 et Chel6

Les glycoconjugués Chel3, Chel4 et Chel6 sont étudiées dans des conditions identiques au dérivé $T^{3\alpha}$. Les IC_{50} obtenues pour les glycoconjugués Chel3 et Chel6 sont proches de 1 μM (figure 114). Les trois glycoconjugués Chel3, Chel6 et $T^{3\beta}$ -Cy5 possèdent donc des efficacités d'interaction équivalentes avec la lectine ASGP-R. Les modifications apportés sur le tripode n'influencent donc pas les propriétés de ciblage des hépatocytes dans les conditions d'expérimentation *in cellulo* choisies :

- Le lien glycosidique triazole entre la GalNAc et la chaîne PEG présent sur le composé Chel6 n'influe par de manière significative sur l'interaction monovalente sucre-lectine,

- l'introduction des **systèmes GalNAc-PEG par lien amide sur le pseudopeptide** pour **Chel3** ne semble pas modifier l'architecture de présentation des sucres sur le tripode.

Or, il a été montré lors de précédentes études que les **propriétés de chélation du Cu(I)** des glycoconjugués **Chel6** et **Chel3** sont similaires à celle du composé **Chel2** *in vitro* mais inférieures *in cellulo*. L'internalisation de tous ces composés dans les hépatocytes est donc équivalente. Les différences d'efficacité de chélation du Cu(I) intracellulaire proviennent donc probablement du mécanisme de relargage du chélateur dans les cellules, par exemple au niveau de la compartimentalisation des conjugués ou de la rupture des ponts disulfures.

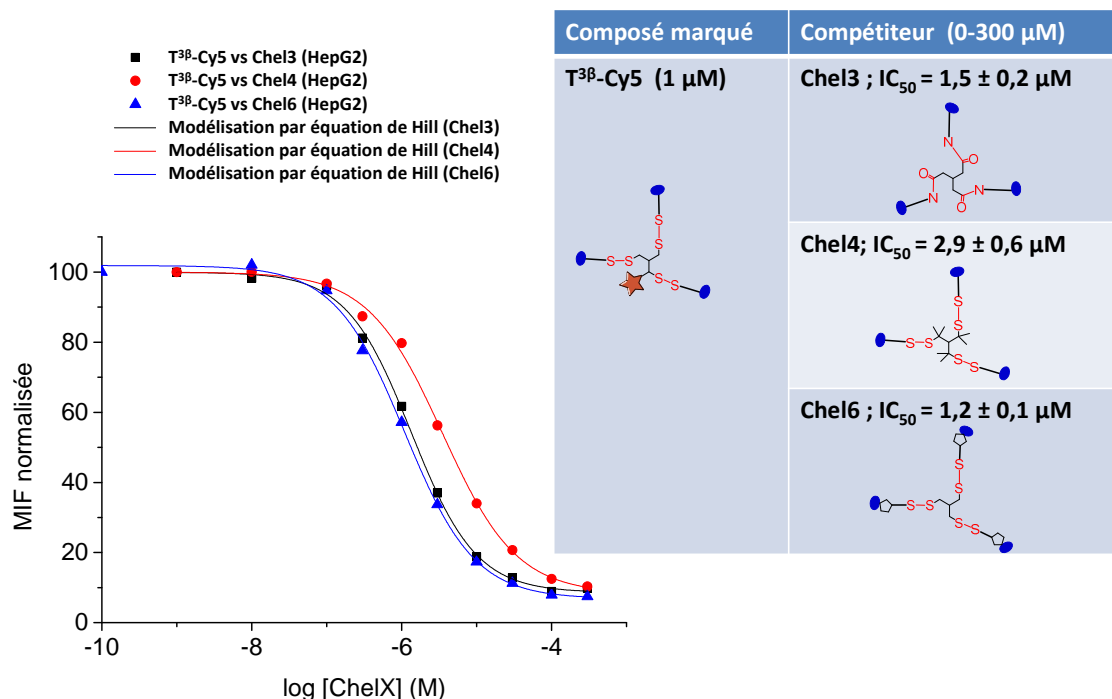


Figure 114 : Courbes de compétition entre le T^{3β}-Cy5 (1 μM) et les glycoconjugués Chel3 (■), Chel4 (●) et Chel6 (▲) (0-300 μM) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

La valeur d'IC₅₀ obtenue pour le glycoconjugué **Chel4** est quant à elle de **2,9 ± 0,6 μM**. Ce dernier présente donc une efficacité d'internalisation environ trois fois moins élevée. Ceci pourrait être attribué à un **encombrement apporté par les di-méthyls**, qui modifie la flexibilité globale de la molécule tripodale ou un changement de lipophilie. Par ailleurs, il a été montré que le composé **Chel4** possède de moins bonnes propriétés de chélation du Cu(I) à la fois *in vitro* et *in cellulo* que **Chel2**. Ceci est donc attribué à deux facteurs :

- le premier est le relargage du chélateur L⁵ par Chel4 suite à la réduction de ses ponts disulfures, dont les propriétés de chélation sont inférieures au chélateur L² relargué par Chel2.
- Le deuxième, qui ne concerne que l'étude *in cellulo*, est la moins bonne internalisation de Chel4 dans les cellules hépatiques.

Pour aller à l'essentiel

Les glycoconjugués de la famille T sont internalisés efficacement et sélectivement dans les hépatocytes par l'intermédiaire du récepteur ASGP-R. Le glycoconjugué de référence T^{3β}-Cy5 est environ 1500 fois mieux internalisé que le GalNac, et la multivalence augmente l'efficacité d'internalisation de façon significative. Les variations apportées au niveau de la configuration anomérique, de la nature de la liaison glycosidique, du type d'ancrage des espaceurs sur l'unité chélatrice ou encore l'introduction d'unités chélatrices D-pen, respectivement analysés à l'aide de T^{3α}, Chel6, Chel3 et Chel4, ne modifient pas significativement les propriétés d'internalisation.

III - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu que de nombreux glycoconjugués de nature tripodale ont été synthétisés selon une stratégie commune. L'étude de leur internalisation dans les hépatocytes humains a révélé que ces derniers sont efficacement et sélectivement internalisés par les lectines ASGP-R. Lors de précédentes études, il a été montré que le glycoconjugué Chel2, ou T^{3β}, possède les meilleures propriétés de chélation intracellulaire face aux autres composés de la même famille. Ceci ne peut donc pas être attribué à des différences de propriétés de ciblage des hépatocytes en ce qui concerne les glycoconjugués Chel3 et Chel6, mais plutôt à une différence de mécanisme de libération de chélateur intracellulaire. L'efficacité de chélation plus faible *in cellulo* du composé Chel4 peut quant à elle être expliquée par une moins bonne efficacité d'internalisation et le relargage d'un chélateur de moins forte affinité dans le cytoplasme.

En définitive, le glycoconjugué de la famille T réunissant à la fois les meilleures propriétés d'incorporation dans les hépatocytes et de chélation du cuivre intracellulaire est le composé Chel2.

Tableau 12 : Récapitulatif des efficacités d'internalisations relatives au glycoconjugué de référence, le T^{3β}-Cy5, du GalNac monovalent et des différents glycoconjugués de la famille T.

T ^{3β} -Cy5 (1μM)	Compétiteur	IC ₅₀
	GalNac	1,5 ± 0,1 mM
	T ^{1β}	200 ± 68 μM
	T ^{3α}	1,0 ± 0,1 μM
	Chel3	1,5 ± 0,2 μM
	Chel4	2,9 ± 0,1 μM
	Chel6	1,2 ± 0,1 μM

Chapitre V-

Comparaison des deux familles CP et T

L'incorporation des glycoconjugués des familles CP et T dans les hépatocytes humains a été étudiée dans les chapitres précédents. Un des objectifs de cette thèse est de comparer les propriétés d'internalisation des deux familles dans le but de déterminer les caractéristiques structurales optimales pour l'internalisation par la lectine ASGP-R. Les analyses de cytométrie en flux présentées dans les chapitres III et IV sont mises en parallèle. Une étude de modélisation moléculaire est également présentée afin d'apporter des informations complémentaires sur les interactions des glycoconjugués des deux familles avec la lectine.

I - Comparaison des efficacités d'internalisation des glycoconjugués des familles CP et T dans les hépatocytes par cytométrie en flux

Les deux familles de molécules CP et T sont comparées à l'aide des analyses effectuées sur les glycoconjugués suivants (figure 115) :

- **CP^{4α}** et **T^{3β}** sont les **têtes de séries** de chacune des deux familles ; ils réunissent les meilleures propriétés de chélation du Cu(I) et de ciblage des ASGP-R. Les comparer entre eux conduit à l'identification du composé possédant les meilleures propriétés de ciblage des hépatocytes.
- **CP^{3β}** possède la même valence et la même configuration anomérique des sucres que T^{3β}. La comparaison de ces deux glycoconjugués renseigne donc sur l'influence de l'**architecture moléculaire** vis-à-vis de l'efficacité d'internalisation par ASGP-R.

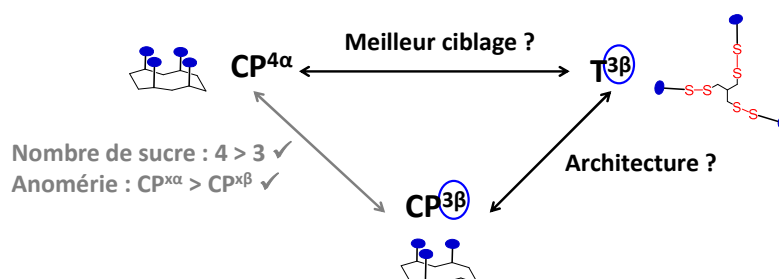


Figure 115 : Comparaison entre les glycoconjugués des deux familles, CP et T, afin de déterminer quel est le composé ciblant le plus efficacement l'ASGP-R, et l'impact de l'architecture moléculaire sur la reconnaissance par la lectine. Les influences des paramètres structuraux au sein de chaque famille ont été déterminés précédemment, comme par exemple indiqué en gris pour la famille CP.

Les études de saturation des récepteurs ASGP-R et de compétition avec le GalNAc sont ici mises en relation et complétées par une compétition directe entre les glycoconjugués CP^{4α} et T^{3β}.

I.1) Saturations des récepteurs ASGP-R

Lors des expériences de saturation des récepteurs ASGP-R mettant en jeu les CP^{4α}-Cy5, CP^{3β}-Cy5 et T^{3β}-Cy5, nous avons vu que les allures des courbes témoignent d'une internalisation active *via* des récepteurs. Des différences au niveau des EC₅₀ sont observées (figure 116).

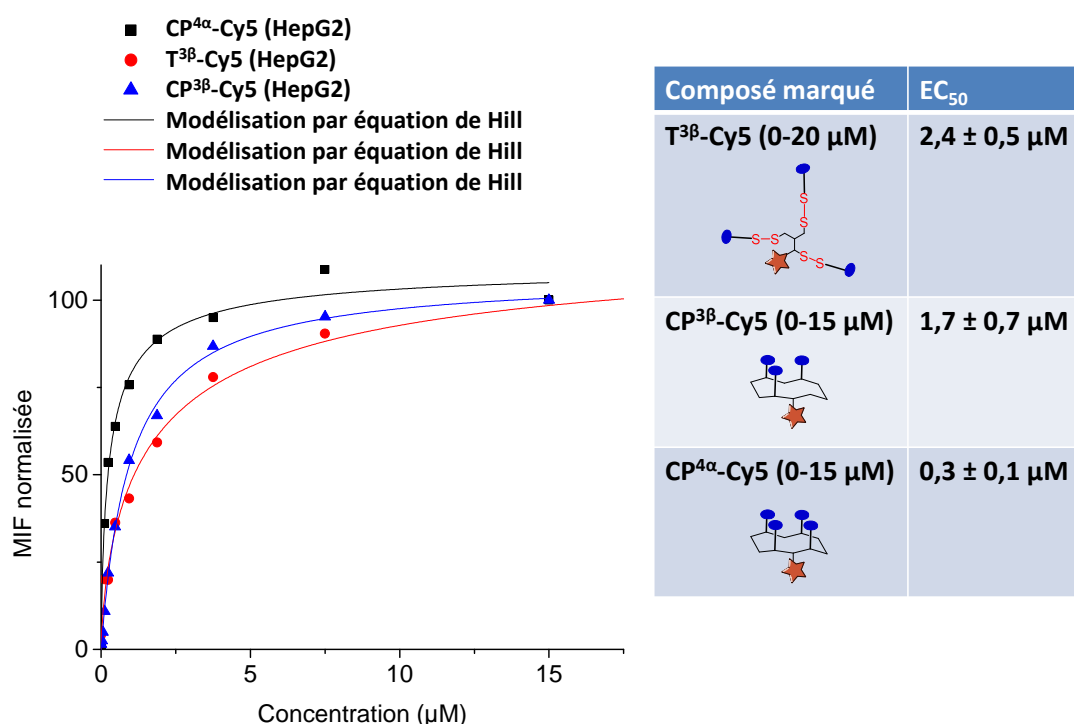


Figure 116 : Courbes de saturation des récepteurs ASGP-R par les glycoconjugués T^{3β}-Cy5 (●), CP^{3β}-Cy5 (▲) et CP^{4α}-Cy5 (■) de 0 à 20 µM sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill ; MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Ces résultats démontrent que le CP^{4α}-Cy5 a une meilleure affinité pour l'ASGP-R que les deux composés trivalents, dont les EC₅₀ sont 7 à 10 fois supérieures. Il est à noter qu'aucune conclusion ne peut être établie entre les glycoconjugués trivalents aux vues des larges intervalles d'erreurs.

Par ailleurs, les intensités maximales de fluorescence atteintes aux paliers de saturation diffèrent selon le glycoconjugué. Afin de vérifier si cette différence provient d'une extinction du fluorophore sur certains glycoconjugués, l'intensité de la fluorescence des solutions utilisées pour les expériences cellulaires a été mesurée. Les résultats montrent que les composés ont tous la même intensité de fluorescence au sein des solutions d'incubation. Les différences de fluorescence peuvent être dues à une localisation intracellulaire différente des glycoconjugués, ou bien à des différences dans les cinétiques d'internalisation par le récepteur, ou encore à des quantités d'internalisation maximale différentes.

I.2) Affinement des résultats par expériences de compétition

I.2.a - Comparaison avec un compétiteur commun : le GalNAc

Lors des expériences de compétition avec le GalNAc, les IC_{50} suivants sont obtenues (figure 117).

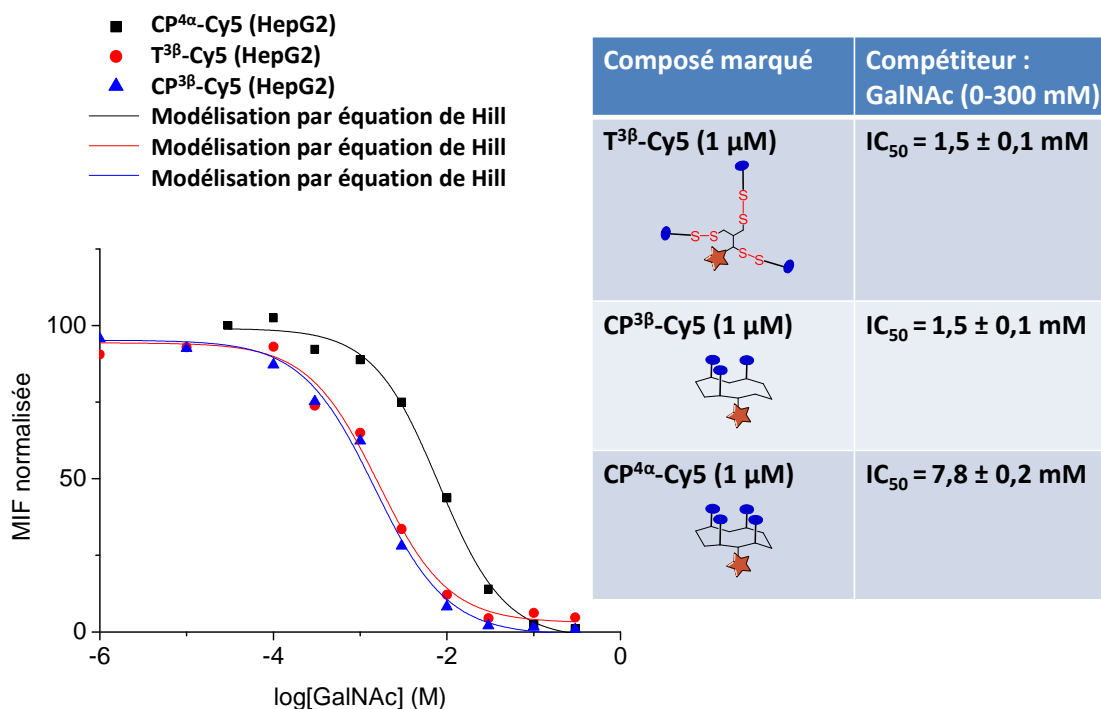


Figure 117 : Courbes de compétition entre les glycoconjugués marqués T^{3β}-Cy5 (●), CP^{3β}-Cy5 (▲) et CP^{4α}-Cy5 (■) (1 μM) et le GalNAc (0-300 mM) sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill. MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

L' IC_{50} pour le CP^{4α}-Cy5 est 5 fois plus élevée que celle du T^{3β}-Cy5, donc ce glycoconjugué est 5 fois plus efficacement internalisé que le tripode. La compétition du CP^{3β}-Cy5 avec le GalNAc permet de comprendre si cette différence provient de l'architecture ou du nombre de sucres des glycoconjugués. Les IC_{50} obtenues avec le GalNAc sont les mêmes pour les deux glycoconjugués CP^{3β}-Cy5 et T^{3β}-Cy5, qui possèdent le même nombre de GalNAc, dans la même configuration, mais portés par des plateformes d'architectures différentes. On en déduit donc que **les deux architectures, bien que très différentes, sont équivalentes pour cibler les ASGP-R**. De ce fait, la différence entre CP^{4α}-Cy5 et T^{3β}-Cy5 est due majoritairement à **l'effet du 4^{ème} sucre** porté par le cyclodécapeptide.

I.2.b - Compétitions inter-familles

Une compétition entre glycoconjugués est également réalisée. Le glycoconjugué T^{3β}-Cy5 (1 μM) est utilisé comme référence et le composé CP^{4α} comme compétiteur, conduisant à un résultat cohérent avec les compétitions précédentes, à savoir une IC_{50} de **0,075 ± 0,004 μM**. Celle-ci confirme la plus forte efficacité d'internalisation du cyclodécapeptide CP^{4α} observé lors des compétitions avec le GalNAc.

II - Etude de l'interaction glycoconjugué-lectine par modélisation moléculaire

L'étude de l'interaction entre les glycoconjugués et la lectine ASGP-R a été réalisée par modélisation moléculaire en collaboration avec Dr Anne Imberty et le Dr Jérémie Topin. Celle-ci a pour but de comparer les deux systèmes CP et T, selon les deux composantes de l'interaction avec la protéine : monovalente et multivalente (voir chapitre I). Il est ici question d'établir un modèle du mécanisme de liaison des glycoconjugués avec la protéine ASGP-R, afin de comprendre les caractéristiques d'interaction monovalentes et multivalentes pour chacune des deux familles.

II.1) Modélisation de l'interaction monovalente des GalNAc avec la sous unité H1 de l'ASGP-R

Nous avons vu dans le chapitre I que la fonctionnalisation du galactoside en position 1 a un effet variable sur l'affinité de la lectine ASGP-R, allant d'un facteur 2 pour la configuration anomérique jusqu'à un facteur 10 concernant certains substituants linéaires peu encombrés.^{153,155,171,173,174} Les deux familles de composés CP et T présentent des GalNAc avec des espaceurs, chaînes reliant le sucre au reste de la molécule, et liens *O*-glycosidiques différents. Une étude *in silico* est réalisée dans le but d'évaluer l'influence de deux facteurs sur la reconnaissance du GalNAc par le domaine de reconnaissance de la sous unité H1 de la protéine ASGP-R :

- la **nature chimique de ces liens**
- la **configuration anomérique** des GalNAc

Tous les calculs ont été réalisés au moyen de la suite logicielle Schrödinger, à travers l'interface graphique Maestro (<http://www.schrodinger.com>, Schrödinger LLC, New York).

Quatre ligands monovalents portant les cinq premiers atomes de la chaîne reliant les GalNAc aux plateformes CP et T ont été construits, ainsi que deux autres ligands correspondant à des monosaccharides étudiés dans la littérature et présentés dans le chapitre 1 (figure 118).¹⁷⁴ Ces ligands ont été choisis pour avoir montré une préférence de reconnaissance similaire à la famille CP concernant leurs configurations anomériques. En effet le GalNAc- α -Oallyl présente une affinité environ 1,7 fois supérieure à celle de son isomère de configuration β , alors que l'inverse est observé pour les GalNAc portés. Nous souhaitons donc voir si nous retrouvons cette tendance par **modélisation moléculaire**.

Une série de docking (amarrage moléculaire) a été réalisée en utilisant les paramètres suivants. Tout d'abord, les ligands ont été construits et optimisés. Les charges partielles de chacun des atomes des ligands ont été obtenues par calcul quantique (module Jaguar, méthode B3LYP, base 6-31G*). La flexibilité des ligands a été prise en compte par la génération de 10 conformères (module confgen, recherche extensive, champ de force MM3). L'interaction de ces derniers avec la poche de reconnaissance des sucres de la sous unité H1 de la lectine ASGP-R a été étudiée par modélisation moléculaire.

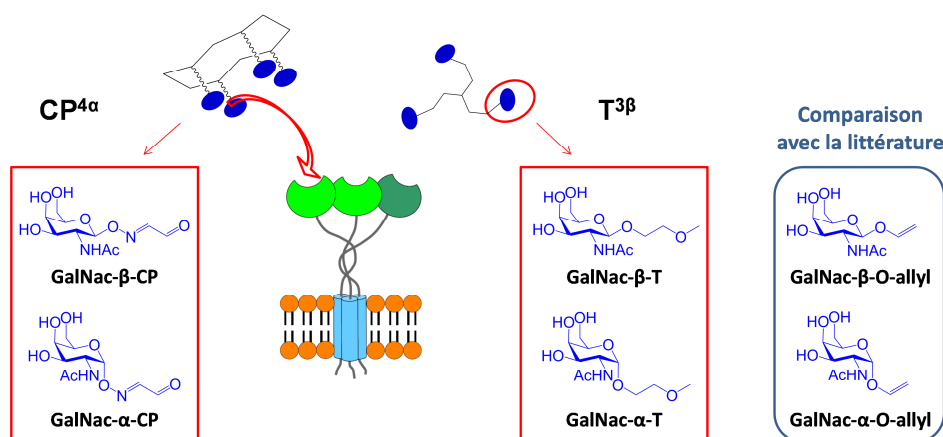


Figure 118 : Construction de ligands pour la modélisation moléculaire. Les ligands des cadres rouges correspondent aux GalNac portant les 5 premiers atomes du bras espaceur présent sur les composés de la famille CP et T, en configuration α et β ; les ligands du cadre bleu (à droite) correspondent aux ligands monovalents décrits dans la littérature par Wong *et al.*¹⁷⁴ Au centre, représentation schématique de la lectine ASGP-R.¹²⁶

La structure de la protéine a été préparée en utilisant le module prepWizard à partir du fichier pdb 1DV8.^{127,307} L'état de protonation de chacun des résidus a été déterminé à un pH de 7.0 (module proPka). Après avoir retiré les molécules d'eau, la structure a été minimisée en appliquant des contraintes sur le squelette. Finalement la grille de docking de 10 Å a été générée autour des résidus Gln239, Asp241 et Trp243. Le docking des ligands a été réalisé en considérant le site de liaison comme rigide et en utilisant le mode haute précision du module glide (XPdocking).³⁰⁸ Finalement l'énergie d'interaction entre les ligands et la protéine a été calculée par décomposition MM-GBSA (module Prime) à partir des poses précédemment obtenues. Ces calculs ont permis d'établir un modèle d'interaction protéine ligand en accord avec la littérature.

II.1.a - Modèle d'interaction monovalente du GalNac par mutagenèse dirigée

L'interaction monovalente des sucres dans le domaine de reconnaissance d'une lectine de type C s'effectue par l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène, d'interactions de van der Waals et la coordination d'un ion calcium, comme ceci a été détaillé dans le chapitre I.

Le domaine de reconnaissance des sucres de la sous unité majoritaire H1 de la lectine ASGP-R humaine a été cristallisé et sa structure résolue (référence 1DV8, *Protein databank*). Néanmoins, ce domaine n'a pas été cristallisé en présence de ligand. Le site de liaison du sucre a été déterminé par analogie avec les domaines de reconnaissance d'autres lectines de types C, dont le mode de liaison des sucre est connu. Ces résultats constituent le point initial de l'étude de modélisation moléculaire visant à décrire les interactions ligand-protéine.

Des études par mutagenèse dirigée ont été réalisées par Drickamer *et al.*^{116,117,133,147-150} Elles reposent sur le principe que tous les domaines de reconnaissance des lectines de types C partagent les mêmes acides aminés très conservés alors que leur spécificité de reconnaissance diffèrent. L'analyse des différences entre les séquences des domaines de reconnaissance permet d'identifier les acides aminés essentiels dans l'interaction d'un type de sucre particulier. Une lectine très proche de l'ASGP-R est employée afin d'étudier sa forte

affinité et spécificité vis-à-vis des galactoside : la « *Mannose Binding Protein* » (MBP) (figure 119). Cette lectine de type C reconnaît spécifiquement les mannosides et elle est grandement homologue avec l'ASGP-R, avec une homologie de séquence de 39% entre le domaine de reconnaissances des sucres de la MBP de rat et celui de H1.³⁰⁹ Pour l'étude de mutagenèse dirigée, Drickamer *et al.* ont choisi de comparer la MBP de rat avec la sous unité RHL-1 de l'ASGP-R provenant de la même espèce, équivalente de la sous-unité H1.

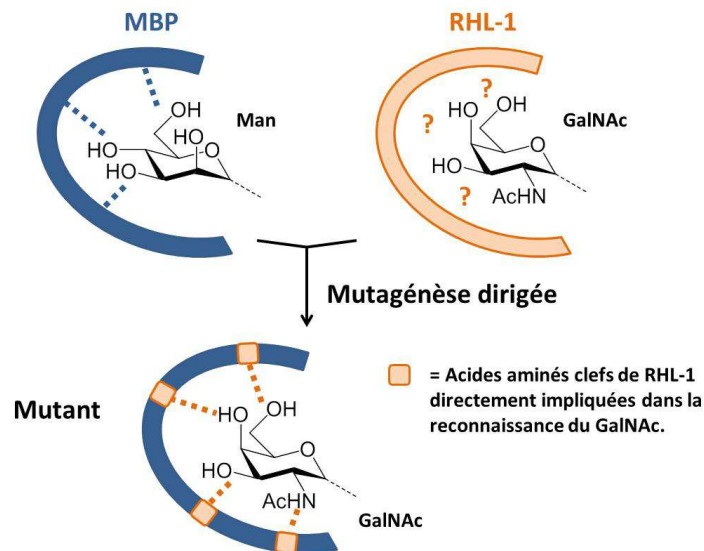


Figure 119 : Principe de la mutagenèse dirigée. Le domaine de reconnaissance de sucre de la lectine MBP de type C est choisi comme modèle en raison de sa forte homologie avec celui de RHL-1 et ses caractéristiques de liaison du sucre connues. Ce domaine modèle est ensuite muté sur ses acides aminés de la poche de reconnaissance des sucres. Ces mutations ne sont pas choisies au hasard, elles consistent à remplacer certains acides aminés par ceux présents aux mêmes positions sur RHL-1. Puis les caractéristiques de reconnaissance des sucres par le mutant obtenu sont étudiées. Ainsi, les mutations permettent d'instaurer des caractéristiques de liaisons du sucre identiques à celles de RHL-1. En procédant par étapes, il est possible de conclure sur les points de contacts entre les acides aminés et le sucre.

Un mutant a été réalisé à partir de la MBP murine et réunit les caractéristiques principales de reconnaissances des sucres de l'ASGP-R. Grâce à seulement 5 mutations et 5 insertions au niveau du site de reconnaissance du Man de la MBP, un mutant reconnaissant les résidus Gal avec une affinité et une sélectivité équivalente à RHL-1 a été obtenu et cristallisé en présence de Gal.¹¹⁷ Ainsi, il a été mis en évidence que la mutation du motif « EPN » impliqué dans la coordination de l'atome de calcium du site de reconnaissance en motif « QPD » change la préférence du Man pour celle du Gal. La mutation de 4 résidus supplémentaires a permis l'obtention d'un mutant présentant une préférence pour le GalNAc similaire à RHL-1. Ce mutant a été cristallisé en présence de GalNAc, servant ainsi de modèle d'interaction monovalente du sucre dans la poche de reconnaissance de l'ASGP-R.¹⁴⁸

Les principales mutations sont récapitulées dans le schéma ci-après, et reprennent les caractéristiques de liaison du GalNAc par l'ASGP-R développées dans le chapitre I (figure 120).

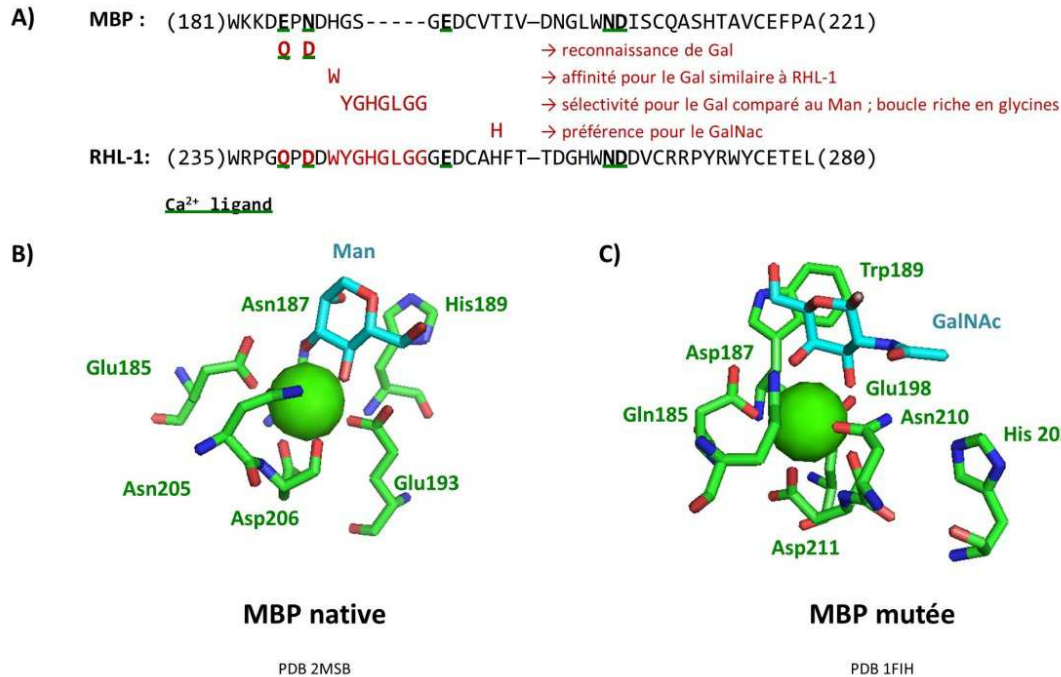


Figure 120 : Schéma récapitulant les mutations les plus déterminantes du domaine de reconnaissance des carbohydrates de la MBP (en rouge) pour conduire à la forte affinité et sélectivité pour le GalNac observée sur RHL-1. A) Alignement des séquences des sites de reconnaissance des carbohydrates de la MBP et de la sous unité RHL-1 de l'ASGP-R de rat. B) Site de coordination de la MBP native (en vert) en présence de mannose (en bleu) (protein databanck 2MSB).¹³³ C) Site de coordination de la MBP mutée (en vert), cristallisée en présence de GalNac (en bleu) (Protein Data Bank 1FIH).¹⁴⁸ Les sphères vertes représentent les ions Ca²⁺ (images réalisées grâce au logiciel PyMol).

Les mutations effectuées sur la MBP conduisant à une reconnaissance du Gal correspondent aux deux résidus interagissant majoritairement avec les hydroxyles 3 et 4 des sucres. Ce sont des Glu et Asn dans le site de coordination du Man (motif EPN) tandis qu'on observe des Gln et Asp dans le site de coordination du Gal (motif QDP). Une affinité et une sélectivité pour les galactosides équivalentes à celles de RHL-1 est obtenue grâce à la mutation de l'His189 en Trp. De plus, l'insertion d'une boucle riche en glycine maintient la position de la chaîne latérale indolique de ce Trp. Enfin, l'His introduite en position 202 est le résidu le plus déterminant parmi ceux impliqués dans la préférence du GalNac par rapport au Gal.^{117,133,147,148}

Nous avons donc utilisé ce mutant afin de valider les modèles construits par modélisation moléculaire.

II.1.b - Modélisation de l'interaction des GalNac portés par les glycoconjugués des familles CP et T avec le domaine de reconnaissance de H1

Les modèles d'interaction déterminés par modélisation moléculaire entre les différents ligands monovalents (figure 118) et le site de reconnaissance de la sous unité H1 reproduisent les principales caractéristiques structurales des interactions décrites dans la littérature.¹⁴⁸ Les fonctions hydroxyles portées en position 3 et 4 du GalNac sont impliquées dans la sphère de coordination de l'atome de calcium. On retrouve également le réseau de

liaisons hydrogène et d'interactions de van der Waals avec les résidus clés mentionnés précédemment (figure 120 et figure 34). De plus, l'orientation du sucre dans la poche de reconnaissance notamment par rapport à la chaîne latérale indolique du résidu Trp243 est conservée.

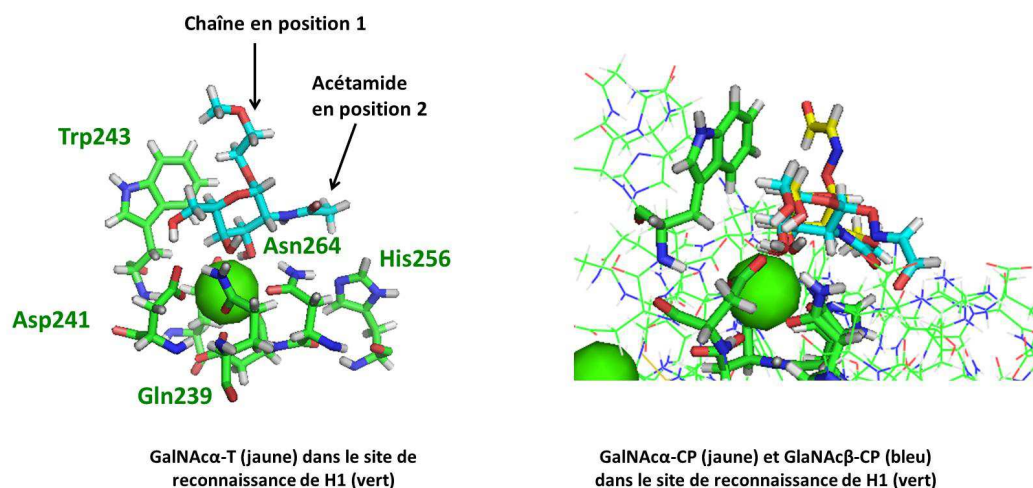


Figure 121 : Modèle d'interaction des ligands dans le site de reconnaissance de la sous unité H1 de l'ASGP-R (en vert ; sphère = ion Ca^{2+}). A gauche, positionnement du ligand GalNAc- α -T (bleu) dans le site de reconnaissance, avec les résidus clés de l'ASGP-R impliqués dans l'interaction avec le sucre. A droite, superposition des ligands GalNAc- α -CP (jaune) et GalNAc- β -CP (bleu) au site de reconnaissance ; le substituant de la position 1 en α pointe vers le solvant tandis que celui en β pointe vers la protéine.

Enfin, un calcul de déviation (« *root mean square deviation* » RMSD, sur les atomes lourds du sucre) entre le positionnement du GalNAc dans le domaine de reconnaissance de H1 calculé et celui déterminé par cristallisation du mutant MBP est inférieur ou égal à 1 Å. Cette faible déviation signifie que les modèles établis par le calcul sont assez précis pour retrouver les résultats expérimentaux de liaison du GalNAc, validant ainsi notre approche. Ces résultats permettent de décrire l'interaction monovalente des glycoconjugués avec la sous unité H1 de l'ASGP-R.

On remarque sur les complexes que les anomères α voient leur substituant de la position 1 dirigée vers le solvant, tandis que les anomères β ont leur substituant en interaction avec la protéine (figure 121). Cette différence structurale apparaît comme un artefact dû à la non prise en compte de la totalité du substituant.

Pour la meilleure pose de chaque ligand, l'énergie libre d'interaction $\Delta G_{\text{MM-GBSA}}$ entre le ligand et le récepteur est calculée à l'aide des équations suivantes :^{310,311}

$$\Delta G_{\text{MM-GBSA}} = G_{\text{complexe}} - G_{\text{protéine}} - G_{\text{ligand}} \quad (1)$$

$$G = H - T\Delta S \quad (2)$$

$$\text{Et } H = E_{\text{vdW}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{int}} + G_{\text{sol}} \quad (3)$$

Avec H et $-T\Delta S$ le changement d'enthalpie et d'entropie lors de la formation du complexe ligand-récepteur. E_{vdW} , E_{ele} , et E_{int} représentent respectivement les interactions de van der Waals, électrostatiques et l'énergie interne. G_{sol} est l'énergie libre de solvation. Il est à noter que les variations d'entropies n'ont ici pas été prises en compte dans le calcul du ΔG , comme nous n'avons pas réalisé de dynamique moléculaire.

Les énergies d'interaction déterminées pour chacun des ligands sont comparables, et comprises entre -72 et -50 kcal/mol (figure 122).

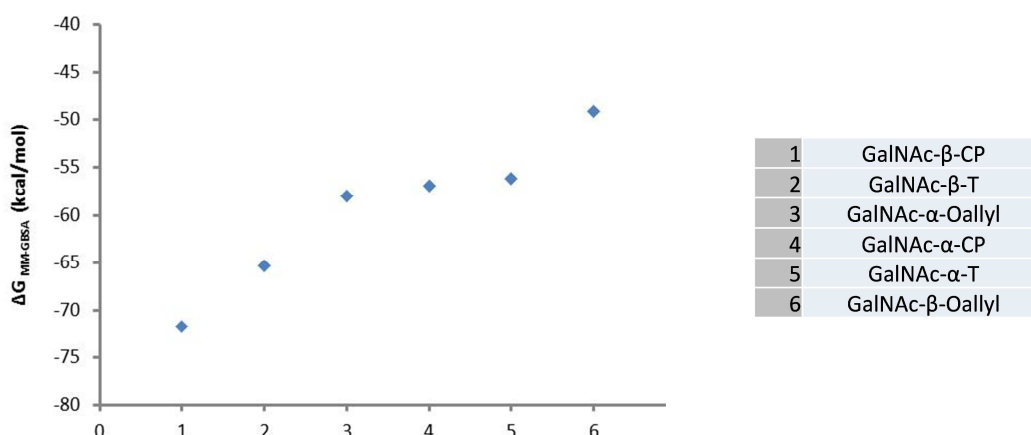


Figure 122 : Energies d'interaction entre les ligands monovalents et le site de reconnaissance de la sous-unité H1 de l'ASGP-R, $\Delta G_{MM-GBSA}$ (en kcal/mol), en fonction de la chaîne glycosidique portée par le GalNAc. Il apparaît que les meilleures poses pour les ligands ont des valeurs de $\Delta G_{MM-GBSA}$ très proches.

Il apparaît que les ligands de configuration α , à savoir les GalNAc- α -Oallyl, GalNAc- α -CP et GalNAc- α -T, ont des énergies d'interaction similaires autour de -57 kcal/mol. Ces énergies sont très proches quelle que soit la fonctionnalisation du GalNAc en position anomérique. Par conséquent, **la nature des liens glycosidiques des deux différentes chaînes présentes sur les familles CP et T ne présente pas d'influence notable sur l'interaction monovalente** du GalNAc avec le domaine de reconnaissance de la protéine. Les deux meilleurs ligands, les composés GalNAc- β -CP et GalNAc- β -T, sont en configuration β et ont des affinités de -72 et -65 kcal/mol respectivement. Cet écart par rapport à leurs isomères s'explique principalement par un changement dans le réseau de liaisons hydrogène : l'atome d'oxygène en extrémité de chaîne des deux différents substituants en β établit une liaison hydrogène avec la Gln239. Cette liaison hydrogène supplémentaire pour les chaînes glycosidiques en β ne doit certainement pas pouvoir s'établir lorsque ces dernières sont reliées au reste du glycoconjugué, du fait de la perte de flexibilité et l'occupation spatiale qui en résultent. Par conséquent, **la différence observée entre les anoméries α et β sur la famille CP lors des tests biologiques par cytométrie en flux provient majoritairement de la présentation générale des GalNAc sur la plateforme peptidique**. L'anomérie α permet certainement de diminuer la gêne stérique en éloignant la molécule ligand de la lectine. Enfin, une légère différence est observée entre les ligands de la littérature GalNAc- α -Oallyl et GalNAc- β -Oallyl, en faveur du sucre d'anomérie α . Cette différence est faible mais suit la tendance des résultats obtenus par l'expérimentation, qui montrent que la lectine a une affinité pour le GalNAc- α -Oallyl 1,7 fois supérieure à celle pour le GalNAc- β -O-Allyle.¹⁷⁴ Ceci contribue donc à la validation de notre modèle calculatoire.

II.2) Interaction multivalente : difficulté de trouver un modèle

Il serait intéressant de pouvoir modéliser l'interaction des glycoconjugués CP^{4 α} et T^{3 β} avec la lectine ASGP-R entière. Ceci permettrait d'appréhender de quelle manière l'architecture et la valence peuvent influencer sur les mécanismes de reconnaissance.

Cependant, seul le domaine de reconnaissance des carbohydrates de cette protéine a été cristallisé, et non la protéine dans son ensemble. De ce fait, deux solutions sont possibles :

- construire une structure prédictive de l'ASGP-R trimérique en se basant sur la structure de la sous-unité H1 ; néanmoins cette méthode est très lourde en calcul, longue et complexe à mettre en place.¹⁷²

- trouver un modèle pertinent de l'ASGP-R entièrement cristallisé afin d'étudier l'interaction entre les glyconconjugués et cette protéine modèle oligomérique.

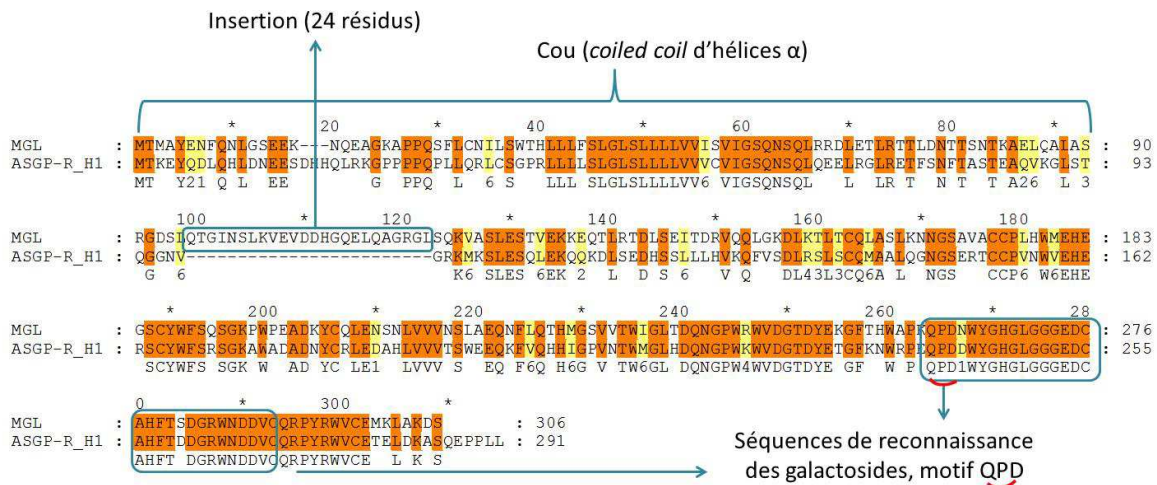
L'ASGP-R est une lectine de type C qui possède de nombreux homologues. Son domaine de reconnaissance des carbohydrates est notamment très conservé et fortement homologues avec d'autres lectines comme la MGL, DC-SIGN ou encore la MBP. Cependant, ces différentes lectines possèdent des disparités au niveau de leurs cous, segments protéiques reliant les domaines de reconnaissance aux domaines transmembranaires, et la séquence charnière entre le cou et le domaine de reconnaissance en termes de longueur, rigidité et motifs de repliement. Il en résulte une grande diversité de l'assemblage des sous-unités de la protéine et de la présentation des domaines de reconnaissance des carbohydrates : différences de stœchiométrie, de flexibilité, d'organisation des sous-unités, orientation et distances entre les domaines de reconnaissance... La tableau 13 présente des lectines de type C toutes homologues de l'ASGP-R, composées de plusieurs protéines transmembranaires s'oligomérisant selon une association en « *coiled-coil* » d'hélices α . Il illustre la difficulté de trouver un bon modèle à la fois structuralement proche de l'ASGP-R et entièrement cristallisé. Ces lectines peuvent être classées en deux groupes suivant les propriétés de leur domaine de reconnaissance : les 3 premières reconnaissent les mannosides grâce aux motifs « EPN » et les autres reconnaissent les galactosides grâce au motif « QDP », à l'exception de la tétranectine qui reconnaît les mannosides par un motif « EPN ».

Tableau 13 : Lectines de type C hautement homologues avec l'ASGP-R. Pour rappel, la distance entre les domaines de reconnaissance de l'ASGP-R est d'environ 20 Å.

Lectine	Cristallisation	Différences avec l'ASGP-R	Ref.
MBP	Oui	19 séquences collagène consécutive au cou qui induit notamment l'oligomérisation de plusieurs trimères en hexamères ; distance entre les domaines de reconnaissance de 50 Å environ ; groupe des collectines	83,312-314
Langérine	Oui mais tronquée	Trimère rigide avec une position précise des domaines de reconnaissance, espacés de 42 Å ; présence d'un site de reconnaissance secondaire et d'un seul ion Ca^{2+} ; cou plus long et séquence charnière très rigide	315,316
DC-SIGN DC-SIGNR	Oui mais tronquée	homotétramère, cou très long (répétition de 23 heptades contre 4 pour l'ASGP-R) et beaucoup plus flexible ; site de reconnaissance de sucre étendu et domaines de reconnaissance espacés de 40 Å environ	114,317,318
MGL (M-ASGP-R)	Non	Organisation plus flexible des domaines de reconnaissances due à une insertion de 24 résidus au niveau de la charnière	188,189
KCR	Non	Cou plus long	184
SRLC	Oui	Cou plus long et insertion de type collagène	115,191
Tétranectine	Oui mais domaine de reconnaissance uniquement	Distance entre les domaines de reconnaissance d'environ 55 Å.	319

MBP = « *Mannose Binding Protein* » ; DC-SIGN = « *cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* » ; MGL = « *Macrophage Galactose Lectin* » ; KCR = « *Kupffer Cell Receptor* ».

La MGL est la lectine la plus proche de l'ASGP-R, avec une homologie de séquence supérieure à 50%. Néanmoins, une insertion sur la MGL de 24 résidus dans la séquence charnière entre le cou et le domaine de reconnaissance conduit à une plus grande flexibilité de cette dernière, et donc des caractéristiques de reconnaissance multivalentes différents (figure 123). De plus, cette dernière n'a pas été cristallisée. La Lectine SRLC est elle aussi très proche de l'ASGP-R et possède l'avantage d'être entièrement cristallisée. Cependant, elle possède un cou plus long et plus flexible du fait d'une insertion de type collagène riche en glycines et en prolines analogue à celle de la MBP, dans la séquence du cou.



Exemple de séquence collagène : SRLC PPPEPRPRDRCSQPPPTENKQKQEKCEPPPPPAERPTCPACPPPERGKESKCSQCPKCSRSPPKPCPCPSGDPGPPGPPKELPQPCPPCFQGLQCTVGEFVPCPRGLPELPGVPMPCPKCPPPPSPSCAV

Figure 123 : Alignement de séquence de la sous-unité H1 de l'ASGP-R (P07306) avec le récepteur le plus similaire de cette lectine : la MGL (rat ; P49301). En dessous, exemple de séquence collagène riche en glycines (bleu) telles que présentes sur la lectine SRLC (ici) ou MBP. Alignement réalisé à l'aide du programme Gene Doc ; estimation de la conservation des séquences : identiques (orange) ou très fortement conservées (>80%, jaune). Séquences récupérées sur www.ebi.ac.uk.

Par ailleurs, l'ASGP-R est un hétérooligomère et peu de données sont disponibles sur la sous-unité minoritaire H2. Par conséquent aucun modèle pertinent n'a pu être trouvé pour réaliser une étude de l'interaction multivalente avec les glycoconjugués CP^{4 α} et T^{3 β} .

III - Conclusion

La comparaison des glycoconjugués CP^{4 α} et T^{3 β} , identifiées comme les plus efficacement internalisés de leur familles respectives, montre que **CP^{4 α} est environ 5 fois mieux internalisé que T^{3 β}** .

L'étude de modélisation moléculaire montre que la différence entre les deux familles de la **nature chimique du substituant en position 1 du GalNAc a peu ou pas d'influence sur l'interaction monovalente** avec le site de reconnaissance de la protéine ASGP-R. Cependant, l'utilisation de ligands monovalents tronqués rend difficile la conclusion quant à l'effet de l'anomérisation. Il semblerait que la différence observée entre les configurations α et β sur les composés de la famille CP soient essentiellement due au mode de présentation multivalente des sucres sur le cyclopeptide. Or, le mode d'interaction multivalente n'a pas pu être analysé par cette technique computationnelle à cause de l'absence de modèle pertinent de la lectine trimérique.

L'interaction multivalente ligand-lectine, et donc l'effet de l'architecture sur l'efficacité d'internalisation, a été étudié par cytométrie en flux. La comparaison des efficacités d'internalisation des glycoconjugués CP^{3 β} et T^{3 β} montre que **les deux architectures sont équivalentes pour le ciblage de la lectine ASGP-R**. La différence entre les deux glycoconjugués semble donc due exclusivement au nombre de sucre, avec la présence de 4 sucres sur le cyclodécapeptide contre 3 sur le glycoconjugué tripodal. Enfin, il est probable que les glycoconjugués CP^{4 α} et T^{3 β} interagissent avec ASGP-R selon des mécanismes différents lors de la reconnaissance à la membrane des hépatocytes.

Conclusion générale

Ce travail de thèse apporte des éléments de compréhension concernant la vectorisation de composés actifs vers le foie, par l'intermédiaire des lectines ASGP-R, dans le cadre de la maladie de Wilson. Cette maladie génétique conduit à une **accumulation de Cu** dans l'organisme. L'organe majoritairement touché par cette surcharge est le **foie**, parce qu'il joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie de ce métal. Dans cette pathologie les hépatocytes, cellules hépatiques constituant majoritairement le foie, sont incapables d'éliminer correctement le Cu. Des chélateurs sont donc administrés aux patients afin de promouvoir son excrétion. Néanmoins, ces traitements systémiques entraînent beaucoup d'effets secondaires. Une stratégie innovante et plus sélective est proposée par Delangle *et al.*, visant à **piéger sélectivement le Cu accumulé à l'intérieur des hépatocytes**. Cette stratégie et les questions étudiées au cours de cette thèse sont représentées sur la figure 124.

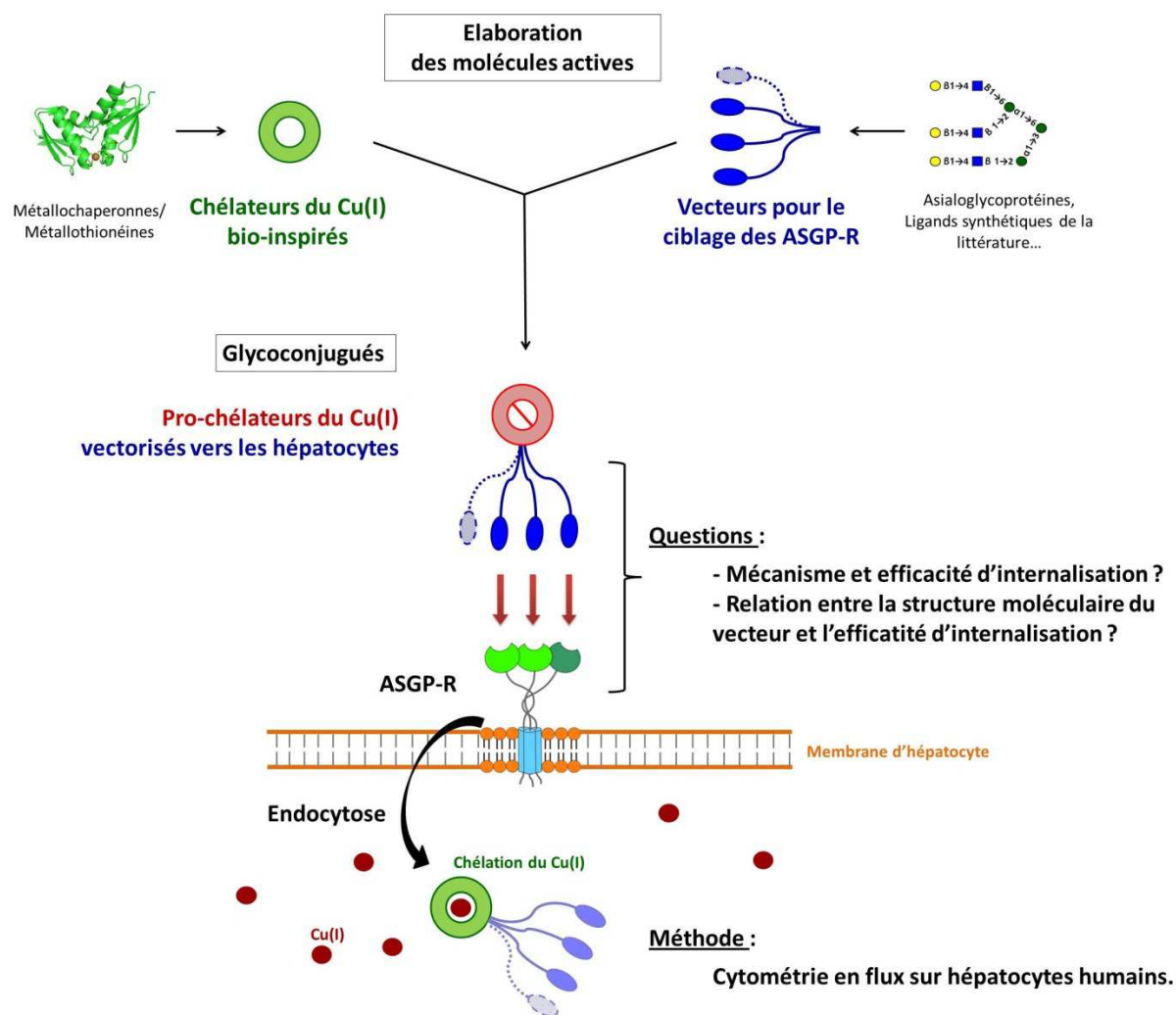


Figure 124 : Les différentes étapes de la conception de pro-chélateurs sélectifs du Cu(I) ciblés vers les hépatocytes, pour la conception de nouveaux candidats médicaments dans le cadre de la maladie de Wilson, selon la stratégie développée par Delangle *et al.*

Le développement des composés répond au trois critères suivants :

- concevoir des **chélateurs sélectifs du Cu(I)**, degré d'oxydation du Cu disponible intracellulaire, sur le modèle de protéines responsables de l'homéostasie du Cu dans l'organisme.
- **transformer ces chélateurs en pro-drogues** qui ne deviennent actives qu'après leur entrée dans la cellule cible pour une action localisée.
- **vectoriser ces pro-chélateurs** vers les cellules d'intérêt par l'intermédiaire de leur **récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R)**. Cette lectine, abondamment et presque exclusivement exprimée à la membrane des hépatocytes, reconnaît avec une forte affinité les résidus galactosides présentés de manière multivalente et réalise une endocytose rapide, efficace et spécifique de ses ligands.

Les unités pro-chélatrices ont été fonctionnalisées par des unités de vectorisation répondant aux critères optimaux identifiés dans la littérature pour un ciblage efficace et sélectif de la lectine ASGP-R :

- **trois à quatre GalNAc présentés en cluster,**
- **distants de 20 Å environ,**
- **avec des bras espaceurs flexibles.**

Il a été montré lors de précédents travaux que ces glycoconjugués libèrent des chélateurs de forte affinité et sélectivité pour le Cu(I). De plus, ils ont la capacité d'entrer dans les cellules hépatiques et faire diminuer le taux de Cu disponible intracellulaire. Les deux composés présentant les meilleures propriétés de chélation du Cu intracellulaire sont les glycoconjugués **Chel1 et Chel2**, qui appartiennent **aux familles Cyclodécapeptide CP et Tripode T**.

Les propriétés de ciblage des hépatocytes par les glycoconjugués des familles CP et T ont été étudiées par **cytométrie en flux sur une lignée d'hépatocytes humains, et donc sur les ASGP-R humains membranaires**. Cette technique est particulièrement adaptée à la **quantification de l'incorporation** des glycoconjugués dans les hépatocytes. Elle permet l'analyse multiparamétrée et individualisée de populations cellulaires entières, afin d'extraire des statistiques fiables et reproductibles. Nous avons dans un premier temps mis en évidence que les glycoconjugués des familles CP et T sont **internalisés dans les hépatocytes par un mécanisme dépendant des récepteurs ASGP-R**. Les vecteurs introduits sur les unités chélatrices du Cu sont donc capables de **cibler les ASGP-R de manière sélective**, ce qui permet leur endocytose dans les hépatocytes. De plus, nous avons montré que **l'internalisation dans les cellules hépatiques de ces glycoconjugués est très efficace**. Les deux glycoconjugués T^{3β} et CP^{4α}, Chel2 et un analogue de Chel1, sont 1500 à 8000 fois mieux internalisés que le GalNAc. De plus, des concentrations en glycoconjugué de l'ordre de 0,2 à 2 μM sont suffisantes pour saturer la moitié des récepteurs ASGP-R à la surface des hépatocytes. Ceci valide la stratégie de vectorisation des pro-chélateurs développée par Delangle *et al.* **Chel1 et Chel2 sont donc d'excellents candidats pour la vectorisation de médicaments**. Il a par ailleurs été vérifié qualitativement que des concentrations en Cu jusqu'à 100 μM dans le milieu de culture cellulaire ne diminuent pas l'internalisation des

glycoconjugués par la lectine de manière significative. Ceci étaye la faisabilité de l'approche thérapeutique pour la maladie de Wilson.

L'influence de la **structure moléculaire sur l'efficacité d'internalisation** a également été étudiée, et les résultats représentés en figure 125.

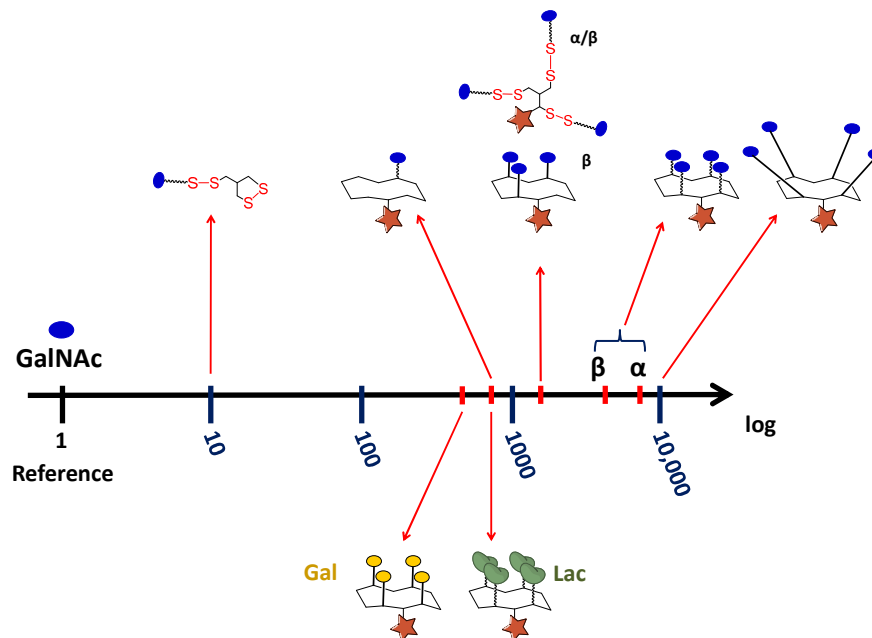


Figure 125 : Echelle d'efficacité d'internalisation relative au compétiteur de référence : le GalNAc.

La **multivalence joue un rôle essentiel pour une internalisation efficace** des glycoconjugués dans les hépatocytes. La **présence de trois à quatre sucres** sur $T^{3\beta}$ et $CP^{4\alpha}$ respectivement, augmente jusqu'à 8000 fois l'efficacité d'internalisation en comparaison avec le GalNAc seul. Cette tendance est confirmée par la comparaison avec les glycoconjugués monovalents, cependant d'autres facteurs non élucidés interviennent dans la reconnaissance de ces derniers, en particulier le glycoconjugué $CP^{1\alpha}$.

La **nature du sucre** est également un paramètre clé. Le choix des GalNAc est donc justifié et pertinent puisque ces sucres **augmentent significativement l'efficacité d'internalisation** des glycoconjugués par l'ASGP-R comparé au Gal et au Lac. De plus, les GalNAc permettent non seulement une forte efficacité d'internalisation mais peuvent aussi accroître la sélectivité par rapport à d'autres lectines endogènes reconnaissant les galactosides.

La **configuration anomérique** n'a qu'une faible influence sur l'internalisation par la lectine. Aucune différence entre les configurations n'a été observée sur la famille T, tandis que sur la famille CP, les glycoconjugués portant des GalNAc de configuration α sont deux fois plus efficacement internalisés que ceux de configuration β . La modélisation moléculaire indique que les interactions monovalentes des sucres portés par les deux types de glycoconjugués avec le domaine de reconnaissance de la sous unité H1 de l'ASGP-R semblent équivalentes. La préférence observée au sein de la famille CP pour la configuration α est certainement due à un positionnement différent des sucres par rapport à la molécule porteuse.

La **flexibilité et la longueur des bras espaceurs** des deux familles de glycoconjugués semble adéquate pour une **interaction multivalente** de plusieurs sucres avec plusieurs

domaines de reconnaissance de la lectine. En effet, à valence égale, les deux architectures CP et T présentent des propriétés de vectorisation équivalentes. Sur les glycoconjugués de la famille CP, l'augmentation de la longueur des bras espaceurs ne modifie pas significativement l'efficacité d'internalisation. En outre, les variations de structures sur la famille T n'affectent pas ou très peu ses propriétés d'incorporation, que ce soit au niveau du point d'ancrage des bras espaceurs sur le tripode ou de son encombrement.

Parmi les glycoconjugués étudiés au sein de chacune des deux familles, **le meilleur système de ciblage est celui du glycoconjugué CP^{4α}**. Ce dernier est cinq fois plus efficacement internalisé que les composés de la famille T du fait de la présence d'un quatrième sucre. Ceci apporte un élément d'explication concernant les efficacités de chélation du Cu(I) intracellulaires observées pour les composés Chel1 et Chel2. En effet, Chel1 et Chel2 font diminuer le taux de Cu intracellulaire disponible avec la même efficacité bien que le chélateur libéré par Chel1 possède une affinité moins forte pour le Cu(I) que celui libéré par Chel2. La meilleure efficacité d'internalisation de Chel1 compense donc en partie ses moins bonnes propriétés de chélation du Cu(I).

Le meilleur compromis entre ciblage des hépatocytes et chélation du Cu(I) dans le but de concevoir un candidat médicament pour la maladie de Wilson pourrait donc consister en la combinaison de l'unité chélatrice du tripode avec une plateforme cyclodécapeptidique CP^{4α} (figure 126).

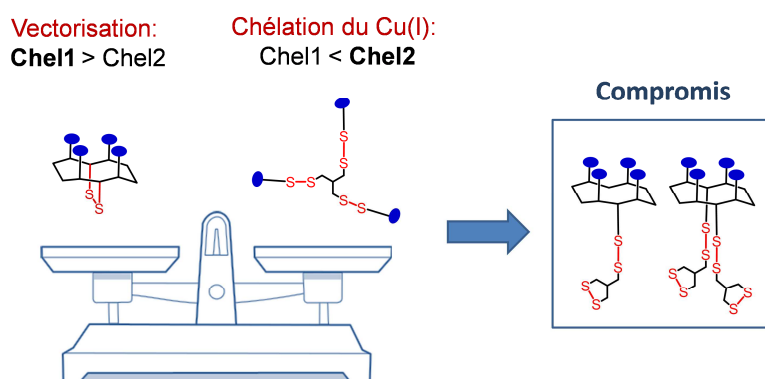


Figure 126 : Possibilité de nouveaux glycoconjugués hybrides combinant le meilleur chélateur de Cu(I) avec le meilleur système de ciblage.

Toutefois, l'interprétation de la relation entre la chélation intracellulaire et l'efficacité de ciblage pour les composés de la famille T est plus complexe. En effet, tous les glycoconjugués de cette famille libèrent des chélateurs d'affinité similaire pour le Cu(I) et sont internalisés dans les hépatocytes avec la même efficacité. Pourtant, le composé Chel2 bénéficie d'une plus forte capacité à faire diminuer le taux de Cu disponible intracellulaire. D'autres facteurs sont donc impliqués dans ces différences de chélation intracellulaire. Pour qu'un composé soit efficace, il faut non seulement qu'il pénètre dans les hépatocytes mais aussi que son **devenir intracellulaire** lui permette de rencontrer le Cu(I) et de former avec lui des complexes stables. Ces observations soulèvent donc des questions de localisation intracellulaire des glycoconjugués et de spéciation des complexes formés, qui sont difficiles à maîtriser.

Ainsi, des questions essentielles demeurent : où se **localisent les glycoconjugués dans la cellule ? Sont-ils excrétés** après la complexation du Cu ? Ces systèmes de vectorisation sont-ils **sélectifs vis-à-vis d'autres lectines endogènes** reconnaissant les galactosides, en particulier la « *Macrophage Galactose Lectin* » (MGL) ? Des expériences de colocalisation des glycoconjugués marqués avec différents compartiments cellulaires par immunofluorescence permettraient d'élucider le cheminement intracellulaire des glycoconjugués. Par ailleurs, des expériences de cytométrie en flux sur des lignées cellulaires exprimant la MGL ou des mesures d'affinité avec cette lectine par résonance plasmonique de surface (SPR) pourraient être mises en place afin d'étudier la sélectivité de ciblage.

Ces travaux de thèse apportent des éléments de compréhension cruciaux pour l'élaboration de chélateurs de Cu(I) ciblés vers les hépatocytes et de façon plus générale pour la vectorisation de molécules actives vers le foie. Nous avons démontré que les glycoconjugués élaborés étaient efficacement internalisés par les cellules cibles ce qui est un gage de réussite pour l'approche thérapeutique proposée. L'efficacité des composés les plus prometteurs est actuellement en cours d'étude sur la souris modèle de la maladie de Wilson pour proposer un candidat médicament.

Partie expérimentale

I - Synthèse des composés de la famille CP

I.1) Généralités

I.1.a - Réactifs

Tous les réactifs de départ et les solvants sont commerciaux. Ils ont été commandés chez Aldrich, Acros, Interchim, Bachem ou Invitrogen. Tous les acides aminés protégés sont de série L et la résine Fmoc-Gly-Sasrin® a été achetée chez Advanced ChemTech Europe. Le PyBOP® a été commandé chez France Biochem. Aucune purification n'a été mise en œuvre avant l'utilisation de ces produits. Les solvants anhydres ont été utilisés de la même façon, sans purification avant manipulation. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultrapure filtrée et purifiée par osmose inverse. Enfin, de l'argon a été utilisé pour les manipulations sous atmosphère inerte.

I.1.b - Equipements

- *Chromatographie*

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice 60 F254 (Merck). Pour révéler ces plaques, nous avons utilisé une lampe UV, une solution au KMnO_4 , une solution de H_2SO_4 à 10% dans l'éthanol, ou de la ninhydrine à 1% dans l'éthanol.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec du gel silice, préparé à base de silice 60 F254 (Merck, 40-63 μm).

Les RP-HPLC analytiques ont été réalisées sur un système Waters équipé d'un détecteur Waters 2487 et d'une colonne EC 125/3 nucleosil 300-5 (RP18), et sur un système VWR équipé d'une colonne Purosphere (RP18 ; L = 250 mm, \varnothing = 4.6 mm et p = 5 μm). Les analyses ont été réalisées à 1 mL/min avec une détection UV à 214 et 250 nm, en utilisant des gradients A-B (A: H_2O / 0,01% TFA, B: CH_3CN / 0,01% TFA / 10% H_2O). Les RP-HPLC préparatives ont été réalisées sur Gilson GX 281 et GX 271 à respectivement 22 mL/min et 4,65 mL/min, équipées de colonnes VP 250/21 nucleosil 300-7 et VP 250/10 nucleosil 300-7 (RP18), avec des détections à 214 nm et 250 nm ou 600 nm. Les purifications ont été réalisées en gradients A-B et les échantillons sont filtrés avant injection sur filtre 0.45 μm .

- *Caractérisations*

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm). Plusieurs abréviations sont utilisées pour décrire les spectres : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublets), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). La configuration anomérique est établie à partir des constantes de couplage $J_{1,2}$ et des déplacements chimiques.

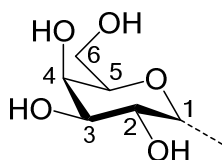


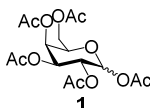
Figure 127 : Rappel de la numérotation des carbones des sucres pour les interprétations des spectres RMN.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre Esquire 3000 (Bruker) ou un système UPLC/MS Acquity (Waters), en mode d'ionisation électrospray.

I.2) Synthèse des sucres modifiés avec une fonction oxyamine en position anomérique

Compound 1: Peracetyl-D-galactose

Adapted from the procedure described by Wu et al.²⁵⁹



Chemical Formula: $C_{16}H_{22}O_{11}$

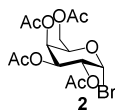
MW: $390.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of commercial D-galactose (20 g, 0.111 mol, 1 eq.) in acetic anhydride (264 mL, 2.76 mmol, 25 eq. = 5 eq. per hydroxyl group), pyridine (224 mL, 2.76 mmol, 25 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 12 hours at room temperature and monitored by thin layer chromatography (TLC) (SiO_2 , CH_2Cl_2 /ethyl acetate, 80/20, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (150 mL) and washed with 10% aqueous citric acid (until pH 3; $3 \times 100 \text{ mL}$), water ($1 \times 100 \text{ mL}$) and 5% aqueous NaHCO_3 (until basic pH; $3 \times 50 \text{ mL}$). The organic fraction was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **1** ($m = 45 \text{ g}$, $R_f = 0.75$) as an orange oil was used without purification ($\alpha/\beta = 2/1$).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K): $\delta = 6.37$ (d, $J_\alpha = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1 $_\alpha$); 5.69 (d, $J_\beta = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H-1 $_\beta$); 5.42-5.49 (m, 2H, H-4 $_\alpha$, H-4 $_\beta$); 5.29-5.35 (m, 3H, H-2 $_\alpha$, H-3 $_\alpha$, H-2 $_\beta$); 5.07 (m, 1H, H-3 $_\beta$); 4.34 (t broad, $J_\alpha = 5.6 \text{ Hz}$, 1H, H-5 $_\alpha$); 4.04-4.18 (m, 3H, H-5 $_\beta$, H-6 $_{\alpha,\beta}$); 1.98-2.15 (10s, 30H, $5 \times \text{COCH}_{3\alpha}$, $5 \times \text{COCH}_{3\beta}$).

Compound 2: Tetra-acetyl-D-galactosyl bromide

Adapted from the procedure described by Lemieux et al.²⁶²



Chemical Formula: C₁₄H₁₉BrO₉

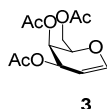
MW: 411.20 g.mol⁻¹

To a solution of peracetylated galactose **1** (43 g, 0.110 mol) in acetic anhydride (11 mL) at 0°C, HBr (33% in acetic acid glacial, 54 mL, 0.33 mmol, 3 eq.) was added carefully. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/ethyl acetate, 80/20, v/v). Then CH₂Cl₂ (300 mL) was added and the organic fraction was washed with iced water (300 mL), a 5% NaHCO₃ solution in water (until basic pH; 2 × 100 mL), a saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 3 × 100 mL) and a saturated aqueous NaCl solution (1 × 100 mL). The organic fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **2** (m = 43 g, Rf = 0.8) as an orange oil was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 6.67 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H-1); 5.49 (dd, J = 3.2 and 1.0 Hz, 1H, H-4); 5.38 (dd, J = 3.2 and 10.6 Hz, 1H, H-3); 5.03 (dd, J = 3.5 and 10.6 Hz, 1H, H-2); 4.46 (t broad, J = 6.5 Hz, 1H, H-5); 4.07-4.21 (m, 2H, H-6); 1.99, 2.03, 2.09, 2.13 (4s, 12H, 4×COCH₃).

Compound 3: 2,4,6-Tri-O-acetyl-D-galactal

Adapted from the procedures describes by Roy et al.³²⁰ and Kozikowski et al.²⁵⁵



Chemical Formula: C₁₂H₁₆O₇

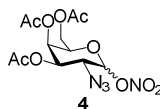
MW: 272.25 g.mol⁻¹

To a solution of crude compound **2** (10 g, 24.3 mmol) in acetic acid (195 mL), Zn dust (25.5 g, 389 mmol, 16 eq.) and copper sulfate (1.8g,7.05 mmol, 0.29 eq.) in an aqueous solution of NaH₂PO₄ (48.6 mL, 0.1M, pH4.21) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for 30 min at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/ethyl acetate, 90/10, v/v). Then, ethyl acetate was added (240mL) and the reaction mixture was vigorously stirred for 30 min at room temperature. After filtration over celite, the organic fraction is washed with cold water (2 × 100 mL) and a saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH; 3 × 100mL). The organic fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **3** (m = 6 g, Rf = 0.8) as a yellow oil was used without purification.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K): δ = 6.42 (dd, 1H, J = 1.8 and 6.3 Hz, H-1); 5.53-5.50 (m, 1H, H-3); 5.39 (td, J = 4.6 and 1.6 Hz, 1H, H-4); 4.69 (ddd, 1H, J = 1.6, 2.6 and 6.3 Hz, 1H, H-2); 4.31-4.14 (m, 3H, H-5, H-6); 2.08, 2.04, 0.98 (3s, 9H, $3 \times \text{COCH}_3$).

Compound 4: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyrannosyl nitrate

Adapted from the procedure described by Lemieux and al.²⁶²



Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_{10}$

MW: $376.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

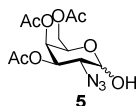
To a solution of crude tri-*O*-acetyl galactal **3** (9 g, 33.07 mmol) in acetonitrile (227 mL) cooled at -15°C , cerium (IV) ammonium nitrate (CAN: 54.4 g, 99.21 mmol, 3eq.) and sodium azide (6.4 g, 99.21 mmol 3eq.) was carefully added (orange suspension). The reaction mixture was vigorously stirred for 3 hours at -15°C and monitored by TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2 /ethyl acetate, 80/20, v/v). Then the reaction mixture was poured into a mixture of cold ether (200 mL) and ice water (100 mL), before the washing of the organic fraction with cold water ($1 \times 100\text{mL}$), a saturated aqueous NaHCO_3 solution (until basic pH, $3 \times 100\text{mL}$) and brine ($1 \times 100\text{mL}$). The organic fraction was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **4** was purified by column chromatography on silica gel (400g, gradient CH_2Cl_2 /ethyl acetate from 100/0 to 80/20, v/v) to obtain the compound **4** (5.05 g, 41% over 4 steps, R_f = 0.83) as a colorless oil. The individual stereoisomers were not isolated.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ ppm = 6.33 (d, J_α = 4.1 Hz, H-1 $_\alpha$); 5.57 (d, J_β = 8.6 Hz, H-1 $_\beta$); 5.49 (dd, J_α = 1.4 and 3.4 Hz, H-4 $_\alpha$); 5.39 (dd, J_β = 3.4 and 1.0 Hz, H-4 $_\beta$); 5.22 (dd, J_α = 3.2 and 11.0 Hz, H-3 $_\alpha$); 4.94 (dd, J_β = 3.0 and 10.3 Hz, H-3 $_\beta$); 4.34 (t large, J_α = 7.2 Hz, H-5 $_\alpha$); 4.16-4.03 (m, H-2 $_\alpha$, H-5 $_\beta$, H6 $_{\alpha,\beta}$); 3.79 (m, H-2 $_\beta$); 2.17-1.97 (6s, $6 \times \text{COCH}_3$).

ES-MS: calculated mass: 376.09; found m/z : 399.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 314.9 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Compound 5: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactose

Adapted from the procedure described by Allen et al.²⁶² and Parry et al.²⁶⁷



Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$

MW: $331.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

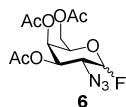
To a solution of the compound **4** (5.05 g, 13.4 mmol) in CH_3CN (45 mL) cooled at 0°C , *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA: 2.66 mL, 16.1 mmol, 1.2 eq.) and thiophenol (4.1 mL, 40.2 mmol, 3eq.) were added. The reaction mixture was stirred 1 hour at 0°C and then 1 hour at room temperature (precipitate) and monitored by TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2 /ethyl acetate,

90/10, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (100mL) and the organic fraction was washed with water (1 × 50mL), saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 3 × 50mL) and saturated aqueous NaCl (3 × 50mL). The organic fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **5** was purified by column chromatography on silica gel (200g, gradient cyclohexane/ethyl acetate from 100/0 to 70/30) to obtain the compound **5** (4.25g, 96%, R_f = 0.5) as a pale yellow oil. The individual stereoisomers were not isolated.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ ppm = 6.31 (d, J_α = 4.1 Hz, 1H, H-1_α); 5.55 (d, J_β = 8.9 Hz, 1H, H-1_β); 5.47 (dd, J_α = 1.4 Hz and 3.4 Hz, 1H, H-4_α); 5.36 (d broad, J_β = 3.4 Hz, 1H, H-4_β); 5.22 (dd, J_α = 3.2 and 11.0 Hz, 1H, H-3_α); 4.94 (dd, J_β = 3.0 and 10.3 Hz, 1H, H-3_β); 4.34 (t broad, J_α = 7.2 Hz, 1H, H-5_α); 4.16-4.03 (m, 6H, H-2_α, H-5_β, H6_{α,β}); 3.79 (m, 1H, H-2_β), 2.17-1.97 (6s, 18H, 6×COCH₃).

ES-MS: calculated mass: 331.10; found m/z: 354.1.0 [M+Na]⁺; 370.0 [M+K]⁺.

Compound 6: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyrannosyl fluoride



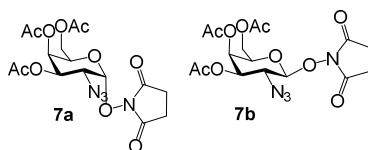
Chemical Formula: C₁₂H₁₆FN₃O₈
MW: 333.27 g.mol⁻¹

To a solution of compound **5** (4.25 g, 12.8 mmol) in anhydrous THF (18 mL) cooled at -40°C under inert atmosphere (argon), diethylaminosulfur trifluoride (DAST: 2 mL, 15.4 mmol, 1.2eq.) was dropwise added. The orange reaction mixture was stirred 2 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/ethyl acetate, 90/10, v/v). Then the reaction mixture is cooled at -40°C, methanol (20 mL) was added dropwise and the mixture was stirred 5 min at room temperature. After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (150mL) and the organic fraction was washed with water (1 × 50mL), saturated aqueous NaHCO₃ (until basic pH; 3× 50mL) and saturated aqueous NaCl (3 × 50mL). The organic fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **6** (m = 4.1 g, R_f = 0.6) as a yellow oil was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ ppm = 5.71 (dd, J_α = 2.6 and 52.2 Hz, 1H, H-1_α); 5.48 (dd, J_α = 1.2 and 3.2 Hz, 1H, H-4_α); 5.34-5.36 (m, 1H, H-3_α); 5.32 (td, J_β = 1.1 and 3.3 Hz, 1H, H-4_β); 5.09 (dd, J_β = 7.5 and 51.8 Hz, 1H, H-1_β); 4.83 (ddd, J_β = 3.3, 0.8 and 10.9 Hz, 1H, H-3_β); 4.36 (td, J_α = 1.2 and 6.4 Hz, 1H, H-5_α); 3.96 (t broad, J_β = 6.3, 1H, H-5_β); 4.06-4.17 (m, 4H, H-6_{α,β}); 3.78 (ddd, J_β = 7.5, 10.9 and 12.7, 1H, H-2_β); 3.68-3.78 (m, 1H, H-2_α); 2.01-2.13 (6s, 6×COCH₃).

Compound 7: O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyrannosyl)-N-oxy succinimide

Adapted from the procedure described by Renaudet et al.²⁵³



Chemical Formula: C₁₆H₂₀N₄O₁₀

MW: 428.35 g.mol⁻¹

To a solution of compound **6** (4.1 g, 12.3 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (50mL) under inert atmosphere (argon), *N*-hydroxysuccinimide (NHS: 2.95 g, 25.6 mmol, 2 eq.), trimethylamine (Et₃N: 3.57 mL, 25.6 mmol, 2eq.) and boron trifluoride (BF₃.Et₂O: 6.4mL, 51.2 mmol, 4eq.) were successively added (reaction mixture was successively yellow, red and pale brown). The reaction mixture was stirred 3 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/ethyl acetate 95/5, v/v). Then CH₂Cl₂ (50mL) was added and the organic fraction was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (until the organic fraction became colorless, 5 × 50mL) and saturated aqueous NaCl (1 × 50mL). The organic fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **7** was purified on silica gel by flash chromatography on Grace Revelis (12 g, 5 injections, gradient CH₂Cl₂/ethyl acetate from 100/0 to 20/80, v/v) to obtain the pure α and β isomers of compound **7** (**7a**: 3.23 g, 61%, R_f_α = 0, 46; **7b**: 1.25 g, 24%, R_f_β = 0,38) as a brown oil.

α anomer **7a**:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K): δ ppm = 5.53 (d broad, J = 3.5 Hz, 1H, H-4); 5.49 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1); 5.42 (m, 1H, H-3); 5.06 (t broad, J = 6.6 Hz, 1H, H-5); 4.18 (dd, J = 11.3 Hz, 1H, H-6a); 3.92-3.85 (m, H-2, 2H, H-6b); 2.74 (s, 4H, 2×CH₂); 2.12, 2.04, 2.02 (3s, 9H, 3×COCH₃).

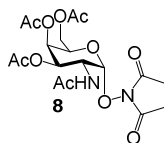
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ ppm = 170.4 (C=O); 169.5 (C=O); 169.9(C=O); 102.2 (C-1); 68.9, 67.6, 67.3 (C-3, C-4, C-5); 61.2 (C-6); 56.6 (C-2); 25.4 (2×CH₂); 20.7 (COCH₃); 20.5 (COCH₃).

β anomer **7b**:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K): δ ppm = 5.34 (d broad, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 4.96 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-1); 4.83 (m, 1H, H-3); 4.22-4.06 (m, 2H, H-5, H-6a); 3.96-3.84 (m, 2H, H-2, H-6b); 2.78 (s, 4H, 2×CH₂); 2.16, 2.06, 2.01 (3s, 9H, 3×COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ ppm = 170.2 (C=O); 170.0 (C=O); 104.6 (C-1); 71.3, 70.9, 65.7, 60.5, 59.0 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6); 25.4 (2×CH₂); 20.6 (COCH₃); 20.5 (COCH₃).

Compound 8: *O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyrannosyl)-*N*-oxysuccinimide



Chemical Formula: C₁₈H₂₄N₂O₁₁

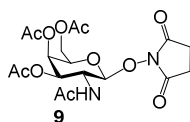
MW: 444.39 g.mol⁻¹

To a solution of the compound **7a** (3.23g, 7.52 mmol) in MeOH/Ac₂O (90 mL, 90/10, v/v), Pd/C (10%, 0.8g, 1eq.) was added carefully. Then the reaction mixture was carefully subjected to dihydrogen 1 min, and then was stirred 1h30 at room temperature under hydrogen atmosphere and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate). After removal of the catalyst by filtration on celite washed with methanol, the filtrate was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in toluene and evaporated under reduced pressure to co-evaporate the remaining acetic acid. The crude compound **8** was purified on silica gel by flash chromatography on Grace Revelis (12 g, 2 injections, gradient CH₂Cl₂/Et₂O from 100/0 to 100/0, v/v) to obtain the compound **8** (1 g, 30%, R_f = 0.67) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K): δ ppm = 6.07 (s broad, J = 9.6 Hz, 1H, NH); 5.48 (dd, J = 1.3 and 3.0 Hz, 1H, H-4); 5.28 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H-1); 5.26 (m, 1H, H-3); 4.95 (td, J = 6.1 and 6.6 Hz, 1H, H-5); 4.71 (m, 1H, H-2); 4.23 (m, 1H, H-6a); 3.91 (m, 1H, H-6b); 2.71 (s, 4H, 2 \times CH₂); 2.13, 2.03, 2.02, 1.99 (4s, 12H, 4 \times COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ ppm = 170.9 (C=O); 170.7 (C=O); 170.6 (C=O); 170.4 (C=O); 170.1 (C=O); 104.2 (C-1); 69.2, 67.3, 67.1 (C-3, C-4, C-5); 61.6 (C-6); 47.2 (C-2); 25.4 (2 \times CH₂); 23.2 (NHOCOCH₃); 20.7 (OCOCH₃).

Compound 9: *O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyrannosyl)-*N*-oxysuccinimide



Chemical Formula: C₁₈H₂₄N₂O₁₁

MW: 444.39 g.mol⁻¹

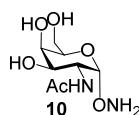
To a solution of the compound **7b** (1g, 2.33 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL), triphenylphosphine (0.8 g, 3.03 mmol, 1.3 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature half an hour and acetic anhydride (1.1mL, 11.65 mmol, 5eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature 3 hours and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/Methanol 95/5, v/v). After the addition of CH₂Cl₂ (30 mL) the organic fraction was washed with saturated aqueous NaHCO₃ aqueous solution (until basic pH; 3 \times 30mL) dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude

compound **9** was precipitate in CH₂Cl₂/Et₂O and purified by flash chromatography Grace Revelris on silica gel (24g, gradient CH₂Cl₂/MeOH 100/0 to 85/5) to obtain the compound **9** (152 mg, 15%, R_f = 0.6) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.77 (s broad, J = 8.0 Hz, 1H, NH); 5.35 (m, 1H, H-4); 5.27 (dd, J = 4.0 and 11.2 Hz, 1H, H-3); 5.05 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-1); 4.28 (m, 2H, H-5, H-2); 4.20 (dd, J = 7.2 and 11.2 Hz, 1H, H-6a); 3.92 (m, 1H, H-6b); 2.72 (s, 4H, 2×CH₂); 2.15, 2.01, 2.00, 1.99 (4s, 12H, 4×COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ ppm = 170.9 (C=O); 170.7 (C=O); 170.6 (C=O); 170.4 (C=O); 170.1 (C=O); 104.2 (C-1); 69.2, 67.3, 67.1 (C-3, C-4, C-5); 61.6 (C-6); 47.2 (C-2); 25.4 (2×CH₂); 23.2 (NHOCOCH₃); 20.7 (OCOCH₃).

Compound 10: 2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyrannosyl-oxyamine



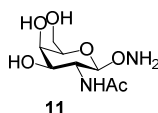
Chemical Formula: C₈H₁₆N₂O₆
MW: 236.22 g.mol⁻¹

To a solution of the compound **8** (0.226 g, 0.51 mmol) in absolute ethanol (8 mL), hydrazine (1.2 mL, 25.5 mmol, 50 eq.) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/Ethanol 50/50, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was precipitate in methanol/CH₂Cl₂ and filtered under reduced pressure. The resulting white powder was dissolved in water and lyophilisated to obtain the compound **10** (0.115 g, 95%, R_f = 0.2) as a white solid.

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K): δ ppm = 4.99 (d, 1H, J = 4.1 Hz, 1H, H-1); 3.99-4.03 (m, 2H, H-4, H-5); 4.24 (dd, J = 4.1 and 11.3 Hz, 1H, H-2); 3.76-3.89 (m, 3H, H-3, H-6); 2.08 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ ppm = 22.3 (HNCOCH₃); 49.6 (C-2); 61.5 (C-6); 68.0 (C-3); 68.8, 71.4 (C-4, C-5); 101.0 (C-1); 175.0 (HNCOCH₃).

Compound 11: 2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyrannosyl-oxyamine



Chemical Formula: C₈H₁₆N₂O₆
MW: 236.22 g.mol⁻¹

To a solution of the compound **9** (0.152 g, 0.34 mmol) in absolute ethanol (5mL), hydrazine (830 μ L, 17.1 mmol, 50 eq.) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2 /Ethanol 50/50, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was precipitate in methanol/ CH_2Cl_2 and filtered under reduced pressure. The resulting white powder was dissolved in water and lyophilisated to obtain the compound **11** (0.755 mg, 94%, Rf = 0.2) as a white solid.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1); 4.03-3.72 (m, 6H, H-3, H-4, H-4, H-5, H-6); 2.09 (s, 3H, NHCOCH_3).

I.3) Synthèse peptidique

General procedures for peptides syntheses

Syntheses of linear protected peptides by SPPS: Procedure A

The synthesis of linear peptide precursors with protected side-chains was performed manually by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/tBu) protection strategy.²⁷⁶ The solid phase support used was the GlySASRIN[®] resin (substitution 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), introduced in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit, on a mechanic stirring system. The glass frit allowed elimination of excess reagents in solution and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated overnight with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH_2Cl_2 until complete acid trace clearance.

The peptide synthesis is an iterative procedure, and the following protocole was used for each amino-acid coupling.

Deprotection of the N-terminus:

At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the GlySASRIN[®] resin (1 g) was washed and swollen with CH_2Cl_2 (10 mL, 1 \times 10 min) and once with DMF (10 mL, 1 \times 10 min). The GlySASRIN[®] resin, preloaded by the Fmoc-Gly-OH amino-acid, has to be deprotected before the coupling the second amino-acid of the linear chain. N- α -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF solution (20/100; v/v) (10 mL, 1 \times 10 min and 2 \times 5 min). The resin was further washed with DMF (10 mL, 6 \times 2 min, until neutral pH). The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299$ nm, $\epsilon = 7800$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value with MeOH.

Peptide coupling:

After complete deprotection of the N- α -Fmoc, coupling reaction was performed using, relative to the resin loading, 2 eq. of N-Fmoc-protected amino acid in situ activated with PyBOP (0.822 g, 1 mmol, 2 eq.) and DIPEA (adjust to pH8-9, 3-4 eq.) in DMF (10 mL) for

30-45 min at room temperature. The resin was then washed with DMF (10 mL, 5 × 1 min) and with CH₂Cl₂ (10 mL, 1 × 1 min). The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test.²⁷⁸ To a small quantity of resin beads in a tube, three drops of a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF and a solution of 10% DIPEA in DMF were added. After 1 min at room temperature, a red coloration of the resin beads occurs if free amino functions remain (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

After complete coupling reaction, the N- α -Fmoc protecting group was removed using the same procedure presented previously before the coupling of the next amino acid. For peptid chain elongation, building blocks can be used instead of amino-acids. For one synthesis, a lysine functionalized by a serine on its lateral chain was used, the Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH. The coupling reaction mixture was stirred 1 hour at room temperature.

The synthesis can be paused for several hours. After the washing steps following an amino-acid coupling, the resin is washed with diethyl ether (10mL, 1 × 5 min) and stored at 5°C.

Peptide removal from the resin:

After the coupling and the deprotection of the last amino acid of the peptide chain, the peptide was cleaved from the resin by treatment with 1% trifluoroacetic acid (TFA) in CH₂Cl₂ (10mL, 10 × 5 min until dark violet coloration of the resin). The filtrate was collected and DIPEA (1 mL) was added to avoid deprotection during evaporation. After concentration under reduced pressure, the linear protected peptide was precipitated in diethyl ether. The white powder obtained by centrifugation was triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that was used in the next step without further purification.

The yield of the SPPS was calculating thanks to the dibenzofulvene adduct quantified during the last deprotection.

Cyclisation of the protected linear peptide precursor: Procedure B

To a solution of the protected linear peptide precursor at 0.5 mM in CH₂Cl₂/DMF (98/2, v/v), PyBOP (2 eq.) and DIPEA (3-4 eq., until pH 8-9) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was precipitated in diethyl ether. The white powder obtained by centrifugation was triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that was used in the next step without further purification.

Cleavage of protecting group N- ϵ : Procedure C

- N- ϵ Boc/tBu: **Procedure C1**

The peptide was dissolved in a solution of TFA/CH₂Cl₂ (50mL, 50/50, v/v). For -OtBu protecting group the peptide was treated with a mixture of TFA/TIS/H₂O (50 mL, 95/2.5/2.5, v/v). The reaction mixture was stirred during 1h at room temperature at room temperature and monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). After

evaporarion under reduced pressure, the resulting residue was precipitated and washed with diethyl ether. This material was further used without additional purification.

- N-ε Alloc: **Procedure C2**

To a solution of the Alloc-containing peptide in anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon, Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under inert atmosphere (argon). The reaction mixture was stirred 30 min at room temperature and then treated with methanol (10 mL) before evaporation under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a minimum of MeOH/CH₂Cl₂ (50/50, v/v) and finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound as a white powder. This material was further used without additional purification.

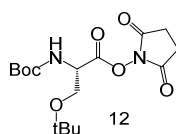
Oxidative cleavage: Procedure D

To a solution of the cyclodecapeptide in water (10⁻²M), NaIO₄ (10 eq./aldehyde) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and the product was directly purified by RP-HPLC (linear gradient: 100/0 to 40/60 A/B in 30 min) affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide as a white powder after lyophilisation.

Boc-Ser(tBu)OH coupling on the lateral chain of the Lysines: Procedure E

To a solution of the cyclodecapeptide (≈ 0.4 mmol) in DMF (30 mL), Boc-Ser(tBu)OH (1.2 eq./free Lys-NH₂), PyBOP (1.2 eq./free Lys-NH₂) and DIPEA (3-4eq., adjust to pH8-9) were added. The reaction mixture was stirred for 30-45 min at room temperature. After concentration under reduced pressure, the cyclodecapeptide was precipitated in diethyl ether. The white powder obtained by centrifugation was triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that was used in the next step without further purification.

Compound 12: Boc-Ser(tBu)-N-hydroxysuccinimide ester



Chemical Formula: C₁₆H₂₆N₂O₇

MW: 358.39 g.mol⁻¹

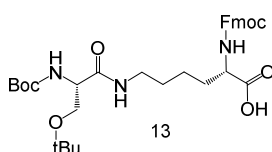
To solution of Boc-Ser(tBu)-OH (2.8 g, 10.7 mmol) in Ethyl Acetate/dioxan (100 mL, 50/50, v/v) cooled on ice bath, N-hydroxysuccinimide (1.8 g, 16 mmol, 1.5 eq.) and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC: 2.2 g, 10.7 mmol, 1eq.) were added. The reaction mixture was stirred 5 hours at room temperature and monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). After filtration on celite with ethyl acetate, the filtrate collected was evaporated under reduced pressure. The obtained oily residue was taken into ethyl acetate (150 mL) and washed with 5 % aqueous NaHCO₃ (2 × 70 mL), water (2 × 70 mL) and brine (2 × 70 mL). The organic fraction was then dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound Boc-Ser(tBu)-NHS **12** was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (3.5 g, 92%).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 298K): δ ppm = 5.41 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.78 (1H, d, J = 9.0 Hz), 3.92 (1H, m), 3.66 (1H, m), 2.82 (4H, s), 1.46 (9H, s), 1.20 (9H, s).

ES-MS: calculated mass: 359.2; found m/z: 381.17 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 13.8 min (*nucleosil*, A/B, linear gradient, 5% to 100% of B in 20 min).

Compound 13: Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH



Chemical Formula: $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8$

MW: $611.74 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

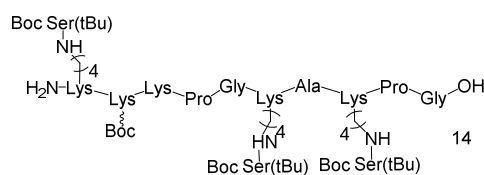
To a solution of Boc-Ser(tBu)-NHS **12** (8.00 g, 22.3 mmol) in CH_2Cl_2 (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered TFA-salt of Fmoc-lysine (8.19 g, 22.3 mmol, 1eq.) and DIPEA (adjust to pH9, 2-4 eq.) in CH_2Cl_2 (130 mL). The reaction mixture was stirred 5 hours at room temperature and monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). After evaporation under reduced pressure, the remaining residue was dissolved in Ethyl Acetate (400 mL), washed with 10 % aqueous citric acid solution (70 mL), water (2×100 mL), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na_2SO_4 and evaporation under vacuum to obtain the Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH **13** (12.5 g, 92%) as a white solid.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 298K): δ ppm = 7.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, s), 6.25 (1H, d), 5.62 (1H, s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m), 1.09 (9H, s).

ES-MS: calculated mass = 611.3; found m/z: 612.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 634.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 16.0 min (*nucleosil*, A/B, linear gradient: 5% to 100% of B in 20 min)

Compound 14



Chemical Formula: $\text{C}_{100}\text{H}_{179}\text{N}_{19}\text{O}_{29}$

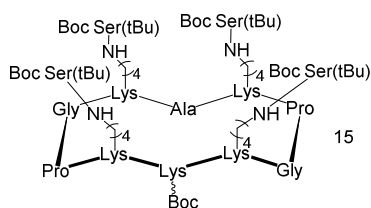
MW: $2111.60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The linear peptide precursor **14** was synthesised following procedure A, using the building block Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH **13** (94%, 0.47 mmol).

ES-MS: calculated mass = 2110.31; found m/z: 2110.93 [M+H]⁺; 2133.79 [M+Na]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 25 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 15



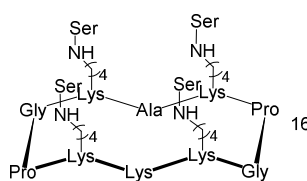
Chemical Formula: C₁₀₀H₁₇₇N₁₉O₂₈
MW: 2093.59 g.mol⁻¹

The linear peptide **14** was cyclised following procedure B to obtain the cyclodecapeptide **15** (3g, crude material with lot of salts).

ES-MS: calculated mass = 2092.30; found m/z: 2093.92 [M+H]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 29 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 16



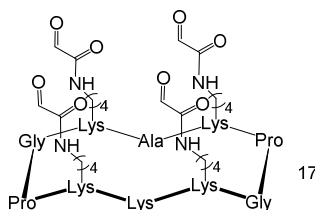
Chemical Formula: C₅₉H₁₀₅N₁₉O₁₈
MW: 1368.58 g.mol⁻¹

The crude cyclodecapeptide **15** (1.5 g, ≈ 0.27 mmol) was deprotected following procedure C1 to obtain the compound **16** (0.21 g, salts).

ES-MS: calculated mass = 1367.79; found m/z: 1368.60 [M+H]⁺; 684.81 [M+2H]²⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 9.6 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 17



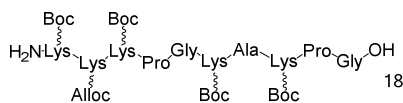
Chemical Formula: $C_{55}H_{85}N_{15}O_{18}$
MW: $1244.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The Ser of the cyclodecapeptide **16** (0.077 g, 0.06 mmol) were oxydised following procedure D to obtain the compound **17** (13.2 mg, 20%).

ES-MS: calculated mass = 1243.62; found m/z: 1316.54 $[M+4H_2O+H]^+$; 1298.56 $[M+3H_2O+H]^+$ (hydratation of the aldehyde)

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 91%; Rt = 9.8 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 18

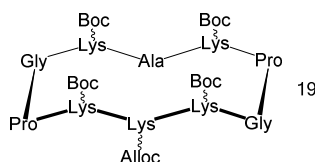


Chemical Formula: $C_{71}H_{123}N_{15}O_{21}$
MW: $1522.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The linear peptide precursor **18** was synthesised following procedure A, without using the building block (456 mg, 0.3 mmol, 73%).

ES-MS: calculated mass = 1521.90 ; found m/z: 1522.41 $[M+H]^+$

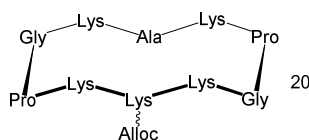
Compound 19



Chemical Formula: $C_{71}H_{121}N_{15}O_{20}$
MW: $1504.83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The linear peptide **18** (0.3 mmol) was cyclised following procedure B to obtain the cyclodecapeptide **19** (1.026 g, not pure).

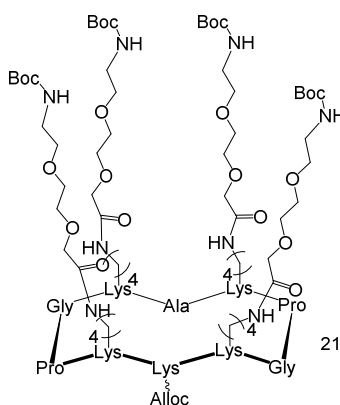
Compound 20



Chemical Formula: $C_{51}H_{89}N_{15}O_{12}$
MW: $1104.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **19** (677mg) was deprotected following procedure C1 to obtain the compound **20** (1.170 g, not pure).

Compound 21

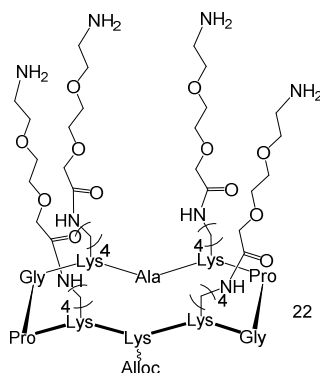


Chemical Formula: $C_{95}H_{165}N_{19}O_{32}$
MW: $2085.47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of the cyclodecapeptide **20** (0.297g, 0.27mmol) in DMF (10 mL), 2-[2-(Boc-amino) ethoxy] ethoxyacetic acid (0.120 g, 1.19 mmol, 4.4 eq.), PyBOP (0.619 g, 1.19 mmol, 4.4 eq.) and DIPEA (0.565 mL, 3-4 eq., adjust to pH8-9) were added. The reaction mixture was stirred for 30-45 min at room temperature. After concentration under reduced pressure, the cyclodecapeptide **21** was precipitated in diethyl ether. The brown gel obtained by centrifugation was triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that was used in the next step without further purification.

ES-MS: calculated mass = 2084.19; found m/z : 2107.69 $[M+Na]^+$; 1985.52 $[M-Boc+H]^+$;

Compound 22

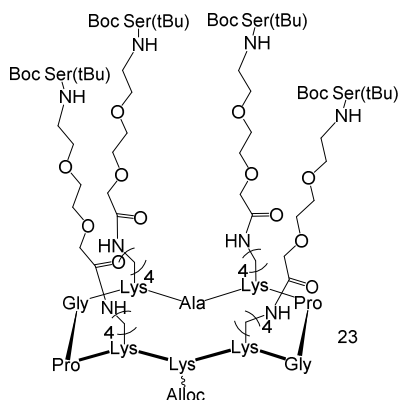


Chemical Formula: $C_{75}H_{133}N_{19}O_{24}$
MW: $1685.00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **21** was deprotected using the procedure C1 to obtain the crude peptide **22** (0.203 g, 0.12 mmol).

ES-MS: calculated mass = 1683.98; found m/z: 842.89 $[M+2H]^{2+}$

Compound 23

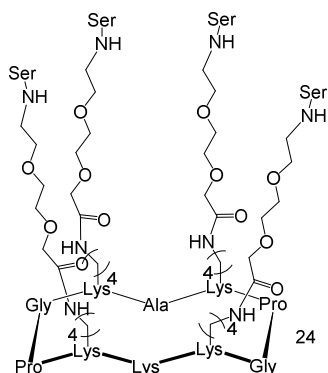


Chemical Formula: $C_{123}H_{217}N_{23}O_{40}$
MW: $2658.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **23** was obtained following procedure E (coupling reaction 2h30). (0.266g, 0.12mmol, 100%)

ES-MS: calculated mass = 2656.57; found m/z: 2679.55 $[M+Na]^+$; 2657.52 $[M+H]^+$; 2557.42 $[M-Boc+H]^+$

Compound 24

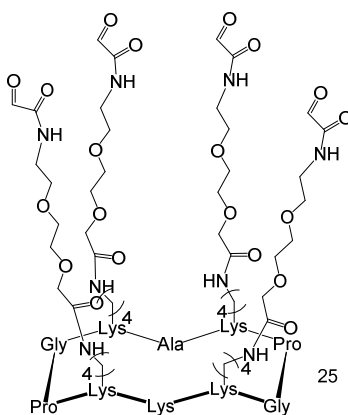


Chemical Formula: $C_{83}H_{149}N_{23}O_{30}$
MW: $1949.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **23** was deprotected using the procedure C2 and then the procedure C1 to obtain the peptide **24** (0.158 g, 0.08 mmol, 67%).

ES-MS: calculated mass = 1948.08; found m/z : 975.56 $[M+2H]^{2+}$

Compound 25

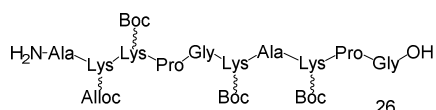


Chemical Formula: $C_{79}H_{129}N_{19}O_{30}$
MW: $1825.00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The Ser of the cyclodecapeptide **24** (0.03 g, 0.015 mmol) were oxydised following procedure D to obtain the compound **25** (0.015 g, 0.008 mmol, 53%).

ES-MS: calculated mass = 1823.92; found m/z : 1898.1 $[M+4H_2O+H]^+$; 913.1 $[M+2H]^{2+}$; 609.5 $[M+3H]^{3+}$

Compound 26



Chemical Formula: C₆₃H₁₀₈N₁₄O₁₉

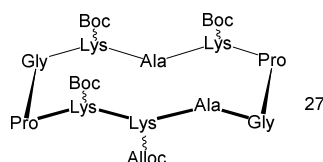
MW: 1365.61 g.mol⁻¹

The linear peptide precursor **26** was synthesised following procedure A, without using the building block (94%, 0.43 mmol).

ES-MS: calculated mass = 1364.79; found m/z: 1365.6 [M+H]⁺; 683.2 [M+2H]²⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 95%; Rt = 19.2 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 27



Chemical Formula: C₆₃H₁₀₆N₁₄O₁₈

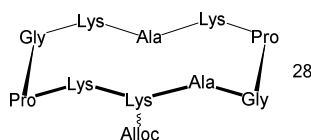
MW: 1347.60 g.mol⁻¹

The linear peptide **26** (0.43 mmol) was cyclised following procedure B to obtain the cyclodecapeptide **27** (crude material with lot of salts).

ES-MS: calculated mass = 1346.78; found m/z: 1347.3 [M+H]⁺; 1369.7 [M+2H]²⁺;

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 17.8 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 28



Chemical Formula: C₄₈H₈₂N₁₄O₁₂

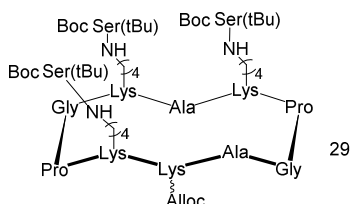
MW: 1047.25 g.mol⁻¹

The cyclodecapeptide **27** was deprotected following procedure C1 to obtain the compound **28** (1 g, salts).

ES-MS: calculated mass = 1046.62; found m/z: 1047.7 [M+H]⁺; 524.4 [M+2H]²⁺; 353.7 [M+3H]³⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 12.2 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 29



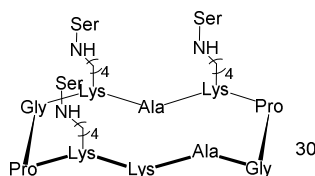
Chemical Formula: C₈₄H₁₄₅N₁₇O₂₄
MW: 1777.15 g.mol⁻¹

To a solution of the cyclodecapeptide **29** was obtained following procedure E (1.1 g, salts).

ES-MS: calculated mass = 1776.06; found m/z: 1777.15 [M+H]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 25.6 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 30



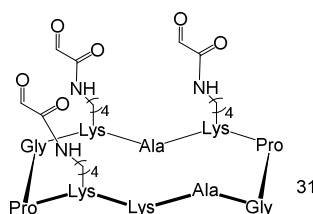
Chemical Formula: C₅₃H₉₃N₁₇O₁₆
MW: 1224.41 g.mol⁻¹

The cyclodecapeptide **29** was deprotected using the procedure C2 and then the procedure C1 to obtain the peptide **30** (230 mg, crude).

ES-MS: calculated mass = 1223.70; found m/z: 1224.7 [M+H]⁺; 612.9 [M+2H]²⁺; 409.0 [M+3H]³⁺

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 9.4 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 31



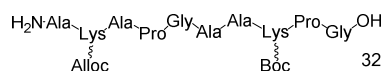
Chemical Formula: C₅₀H₇₈N₁₄O₁₆
MW: 1131.24 g.mol⁻¹

The Ser of the cyclodecapeptide **30** (0.077 g, 0.63 mmol) were oxidized following procedure D to obtain the compound **31** (0.041 mg, 57%).

ES-MS: calculated mass = 1130.57; found m/z: 1185.8 [M+3H₂O+H]⁺; 1167.8 [M+2H₂O+H]⁺; 1149.8 [M+H₂O+H]⁺ (hydratation of the aldehyde)

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 9.9 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

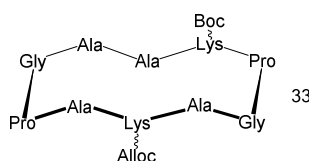
Compound 32



Chemical Formula: C₄₇H₇₈N₁₂O₁₅
MW: 1051.21 g.mol⁻¹

The linear peptide precursor **32** was synthesised following procedure A, without using the building block.

Compound 33

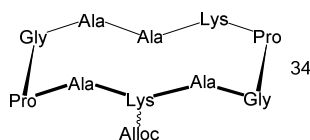


Chemical Formula: C₄₇H₇₆N₁₂O₁₄
MW: 1033.20 g.mol⁻¹

The linear peptide **32** (mmol) was cyclised following procedure B to obtain the cyclodecapeptide **33**.

Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 7.9 min (*nucleosil*, A/B, linear gradient: 5% to 100% of B in 15 min)

Compound 34

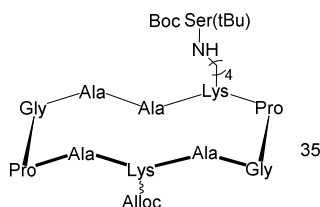


Chemical Formula: $C_{42}H_{68}N_{12}O_{12}$
MW: $933.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **33** was deprotected following procedure C1 to obtain the compound **34**.

Analytical C18 RP-HPLC: $R_t = 8.2 \text{ min}$ (*nucleosil*, A/B, linear gradient: 5% to 60% of B in 15 min)

Compound 35

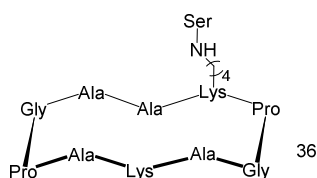


Chemical Formula: $C_{54}H_{89}N_{13}O_{16}$
MW: $1176.38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **35** was obtained following procedure E.

Analytical C18 RP-HPLC: $R_t = 7.5 \text{ min}$ (*nucleosil*, A/B, linear gradient: 5% to 100% of B in 15 min)

Compound 36

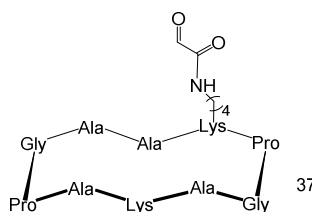


Chemical Formula: $C_{41}H_{69}N_{13}O_{12}$
MW: $936.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The cyclodecapeptide **35** (0.245 g, 0.2 mmol) was deprotected using the procedure C2 and then the procedure C1 to obtain the peptide **36** (0.180 g, 92%).

Analytical C18 RP-HPLC: $R_t = 10.2 \text{ min}$ (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 37



Chemical Formula: C₄₀H₆₄N₁₂O₁₂

MW: 905.02 g.mol⁻¹

The Ser of the cyclodecapeptide **36** (0.076 g, 0.08 mmol) were oxidized following procedure D to obtain the compound **37** (0.018 mg, 25%).

ES-MS: calculated mass = 904.48; found m/z: 924.6 [M+H₂O+H]⁺ (hydratation of the aldehyde)

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100%; Rt = 10.5 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

I.4) Assemblage des glyconconjugués

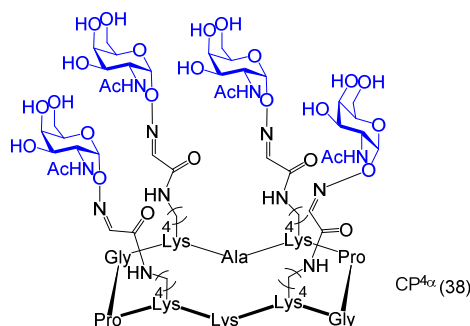
Oxime coupling: Procedure F

To a solution of the cyclodecapeptide with aldehyde functions in 0.1% TFA in H₂O (10 mM), the aminoxy carbohydrate (2 eq./aldehyde) was added. The reaction mixture was stirred 3 to 10 hours at 30°C and monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). The crude mixture was directly purified by preparative RP-HPLC (same gradient) without additional treatment to give, after lyophilisation, the glycoconjugate as a white powder.

Labelling with the fluorescent probe sulfo-cyanine5-NHS: Procedure G

To a solution of the glycoconjugate in anhydrous DMF which pH was set on 8 thanks to DIPEA (1 mL) under inert atmosphere (argon), the sulfo-cyanine 5-NHS (1.2 eq.) was added. The mixture was stirred 2 hours at room temperature, without light, and the reaction was monitored by analytical RP-HPLC (linear gradient: 95/5 to 0/100 A/B in 20 min). After evaporation under reduced pressure, the crude compound was purified by RP-HPLC (same gradient).

Compound 38: CP^{4α}



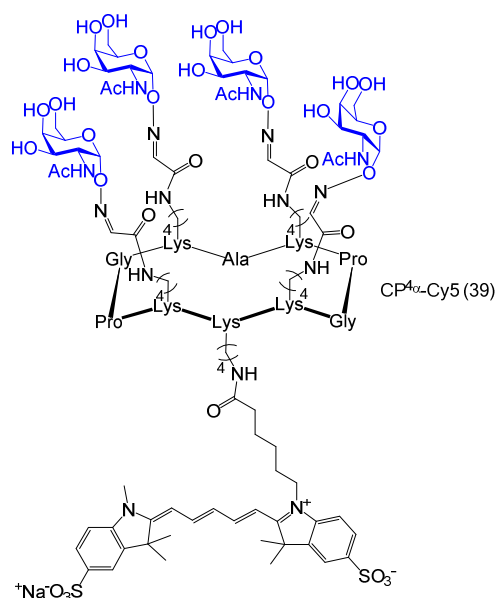
Chemical Formula: C₈₇H₁₄₁N₂₃O₃₈
MW: 2117.21 g.mol⁻¹

The peptide **17** and the GalNac oxyamine **10** were assembled to obtain the glycoconjugate **38** (0.02 g, 0.01 mmol, 87%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 2115.98; found m/z: 2116.9 [M+H]⁺; 2139.1 [M+Na]⁺; 2155.1 [M+K]⁺; 1059.6 [M+2H]²⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100%; Rt = 10.2 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 39: CP^{4α}-Cy5



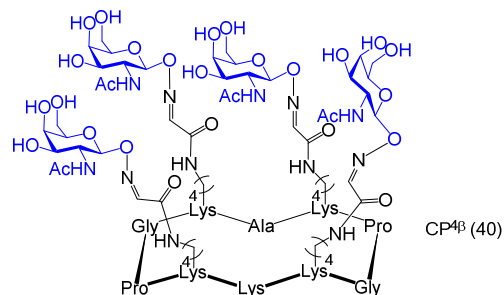
Chemical Formula: C₁₁₉H₁₇₆N₂₅O₄₅S₂⁻
MW: 2740.97 g.mol⁻¹

The labelled glycoconjugate **39** (5.5.10⁻⁴ g, 0.2 mmol, 20%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 2739.17; found m/z: 1371 [M+3H]²⁺; 914.9 [M+4H]³⁺; 1262.6 [M-GalNAc+2H]²⁺; 1153.6 [M-2GalNAc+2H]²⁺ (sugar fragmentation -203 not seen RP-HPLC).

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100%; Rt = 12.4 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 40: CP^{4β}



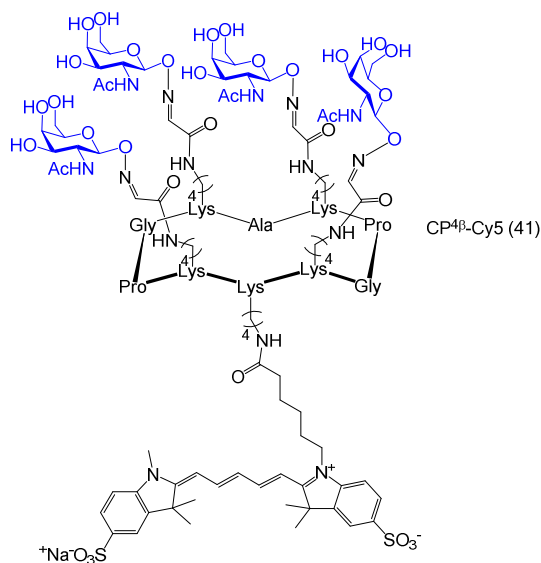
Chemical Formula: C₈₇H₁₄₁N₂₃O₃₈
MW: 2117.21 g.mol⁻¹

The peptide **17** and the GalNAc oxyamine **11** were assembled to obtain the glycoconjugate **40** (0.0059 g, 0.003 mmol, 66%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 2115.98 ; found m/z: 1059.6 [M+2H]⁺; 950 [M+-GalNAc+H]⁺ (sugar fragmentation -203 not seen RP-HPLC).

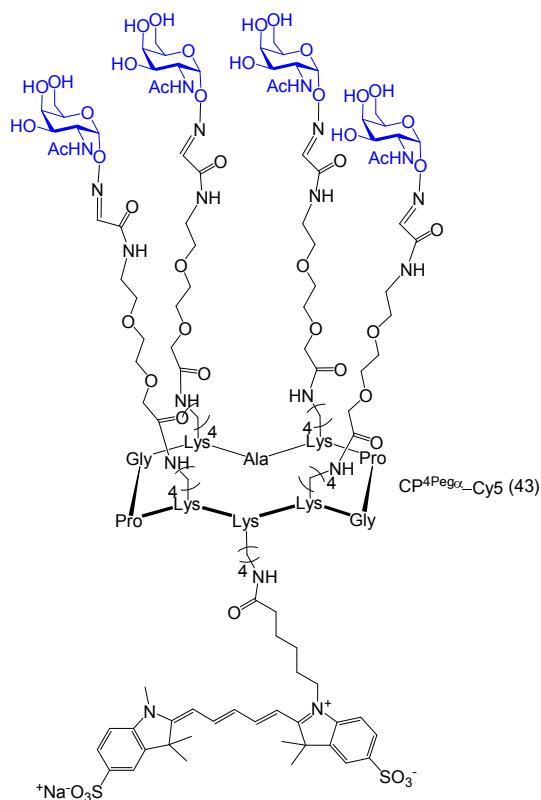
Analytical C18 RP-HPLC: Rt = 7.2 min (*nucleosil*, A/B ; 5 to 10 % of B in 20 min).

Compound 41: CP^{4β}-Cy5



Chemical Formula: C₁₁₉H₁₇₆N₂₅O₄₅S₂⁻
MW: 2740.97 g.mol⁻¹

Compound 43: CP^{4pegα}-Cy5



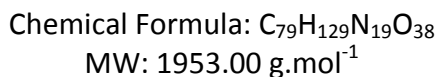
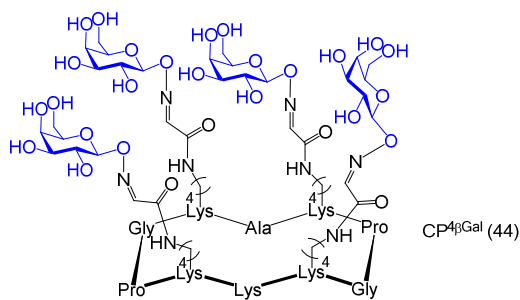
Chemical Formula: C₁₄₃H₂₂₀N₂₉O₂₇S₂⁻
MW: 3321,60 g.mol⁻¹

The labelled glycoconjugate **43** (1.26.10⁻³ g, 3.8.10⁻⁴ mmol, 35%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 3319,47; found m/z: (ES+) 1661.8 [M+3H]²⁺; 1108.5 [M+4H]³⁺; (ES-) 1716.5 [44-H+TFA]²⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 98%; Rt =12.5 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

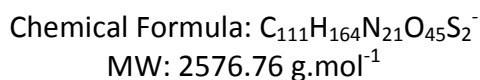
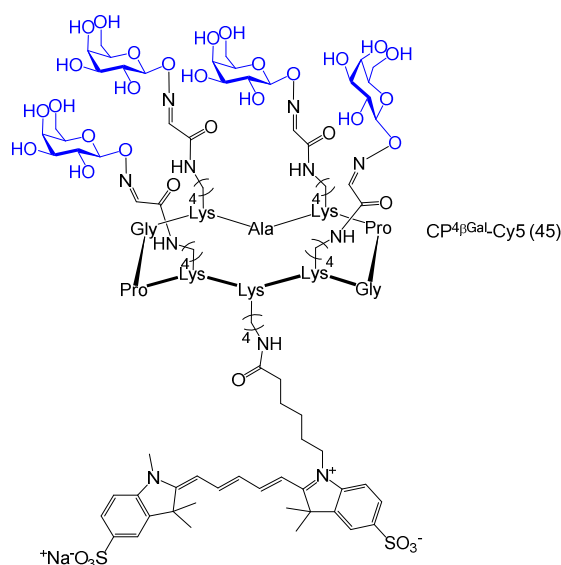
Compound 44: CP^{4βGal}



The peptide **17** and the galactose oxamine were assembled to obtain the glycoconjugate **44** (2.6.10⁻³ g, 1.33.10⁻³ mmol, 33%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 1951,87; found m/z: 1952.24 [M+H]⁺; 976.82 [M+2H]²⁺

Compound 45 : CP^{4βGal}-Cy5

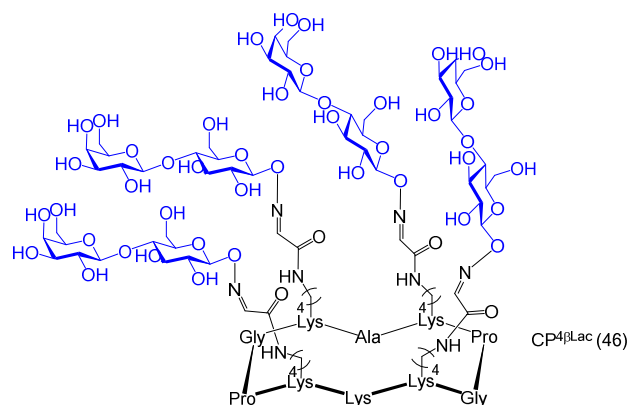


The labelled glycoconjugate **45** (1.26.10⁻³ g, 3.8.10⁻⁴ mmol, 35%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 2575.06; m/z: 1319.6 [M+Na+K+H]²⁺; 1311.6 [M+2Na+H]²⁺; 1308.6 [M+K+2H]²⁺; 1300.5 [M+Na+2H]²⁺; 1289.5 [M+3H]²⁺; 867.7 [M+Na+3H]³⁺;

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100%; Rt = 12.4 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min.)

Compound 46: CP^{4β}Lac



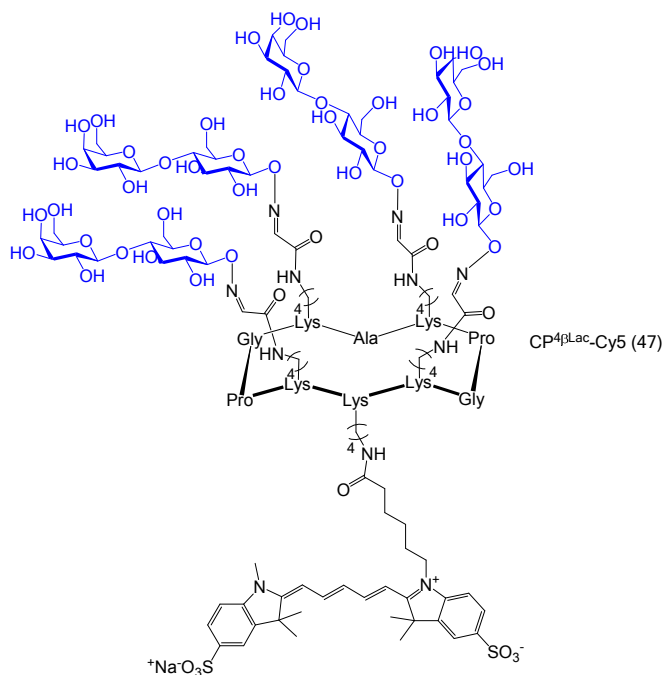
Chemical Formula: C₁₀₃H₁₆₉N₁₉O₅₈
MW: 2601.56 g.mol⁻¹

The peptide **17** and the lactose oxyamine were assembled to obtain the glycoconjugate **46** (2.7.10⁻³ g, 1.04.10⁻³ mmol, 25%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 2600.09; found m/z: 2602.01 [M+H]⁺; 1301.3 [M+2H]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100% ; Rt = 9.3 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 47: CP^{4β}Lac-Cy5



Chemical Formula: C₁₃₅H₂₀₄N₂₁O₆₅S₂⁻

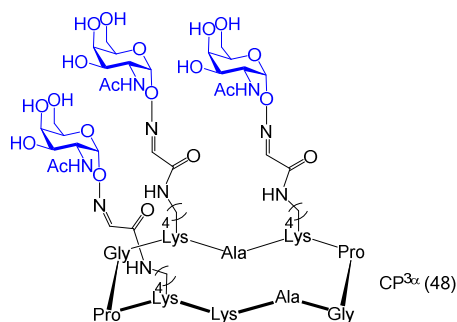
MW: 3225.32 g.mol⁻¹

The labelled glycoconjugate **47** (0.51.10⁻³ g, 1.58.10⁻⁴ mmol, 21%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 3223.28; found m/z: (ES+) 1643.7 [M+Na+K+H]²⁺; 1096.3 [M+Na+K+2H]³⁺; (ES-) 3225 [M]⁻; 1611.7 [M-H]²⁻; 1074 [M-2H]³⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 90% ; Rt = 12.4 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 48: CP^{3α}



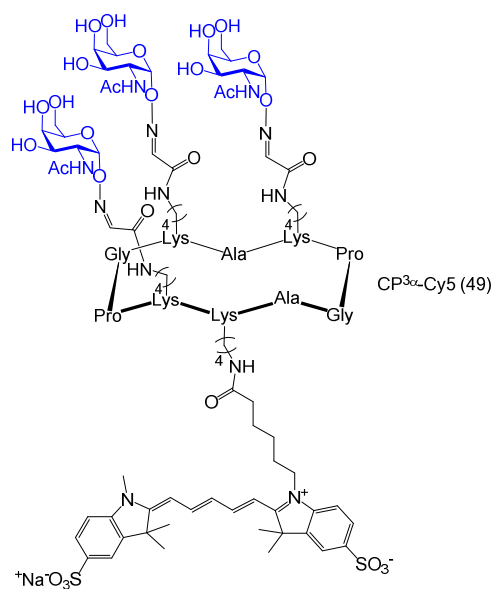
Chemical Formula: C₇₄H₁₂₀N₂₀O₃₁

MW: 1785.86 g.mol⁻¹

The peptide **31** and the GalNAc oxyamine **10** were assembled to obtain the glycoconjugate **48** (0.01 g, 0.01 mmol, 87%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 1784.84; found m/z: 1786.65 [M+H]⁺; 1582.61 [M+H-GalNAc]⁺; 1379.67 [M+H-2GalNAc]⁺; 893.4 [M+2H]²⁺; 791.82 [M+2H-GalNAc]²⁺ (sugar fragmentation - 203 not seen RP-HPLC)

Compound 49: CP^{3α}-Cy5



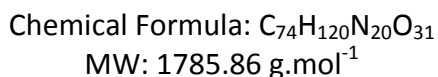
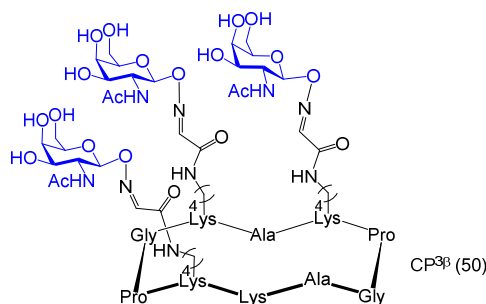
Chemical Formula: C₁₀₆H₁₅₅N₂₂O₃₈S₂⁻
 MW: 2409.64 g.mol⁻¹

The labelled glycoconjugate **49** (0.51.10⁻³ g, 1.58.10⁻⁴ mmol, 21%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 2408.03; found m/z: (ES+) 2571.2 [M+2Na+TFA]⁺; 2448.3 [M+K+H]⁺; 1236.5 [M+Na+K+H]²⁺; 830.3 [M+2K+2H]³⁺; (ES-) 2408.7 [M]⁻; 1203.6 [M-H]²⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100% ; Rt = 14.4 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 50: CP^{3β}

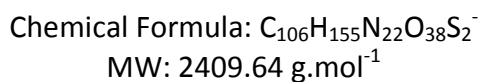
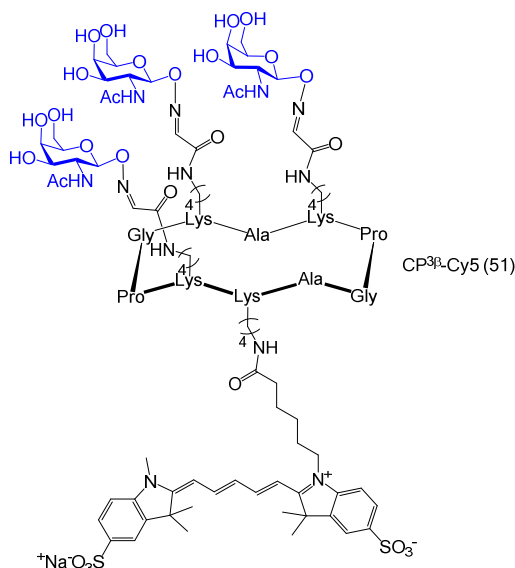


The peptide **31** and the GalNAc oxamine **11** were assembled to obtain the glycoconjugate **50** (0.006 g, 0.01 mmol, 61%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 1784.84; found m/z: 1786.45 [M+H]⁺; 1582.61 [M+H-GalNAc]⁺; 1380.62 [M+H-2GalNAc]⁺; 893.67 [M+2H]²⁺; 791.82 [M+2H-GalNAc]²⁺ (sugar fragmentation - 203 not seen RP-HPLC).

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100%; Rt = 10.2 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 51: CP^{3β}-Cy5

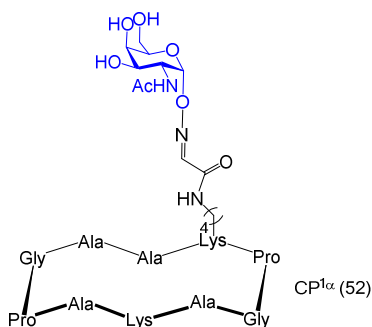


The labelled glycoconjugate **51** (0.51.10⁻³ g, 1.58.10⁻⁴ mmol, 21%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 2408.03; found m/z: (ES+) 2571.2 [M+2Na+TFA]⁺; 2449.3 [M+K+H]⁺; 1236.4 [M+Na+K+H]²⁺; 830.1 [M+2K+2H]³⁺; (ES-) 2408.8 [M]⁻; 1222.0 [M+Cl]²⁻; 1203.5 [M-H]²⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100% ; Rt = 14.2 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

Compound 52: CP^{1α}



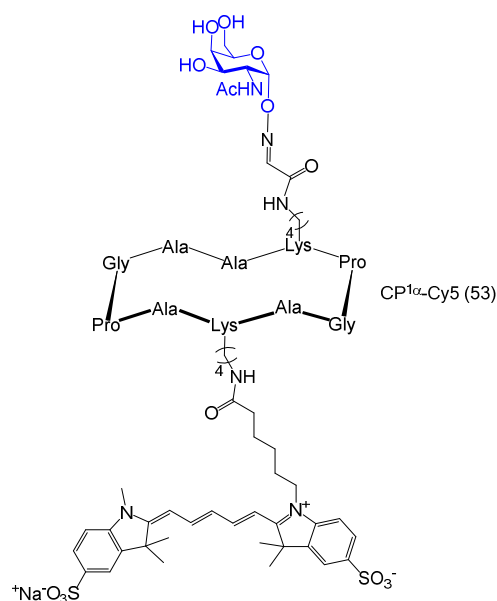
Chemical Formula: C₇₄H₁₂₀N₂₀O₃₁
MW: 1123.23 g.mol⁻¹

The peptide **37** and the GalNac oxyamine **10** were assembled to obtain the glycoconjugate **52** (0.006 g, 0.01 mmol, 61%) following procedure F.

ES-MS: calculated mass = 1122.57; found m/z: 1123.7 [M+H]⁺; 1275.6 [M+TFA+K]⁺; 562.5 [M+2H]²⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 100% ; Rt = 8 min (*nucleosil*, A/B, linear gradient 5 to 100 % B in 20).

Compound 53: CP^{1α}-Cy5



Chemical Formula: C₈₀H₁₁₃N₁₆O₂₄S₂⁻
MW: 1746.99 g.mol⁻¹

The labelled glycoconjugate **53** (0.51.10⁻³ g, 1.58.10⁻⁴ mmol, 21%) was obtained following procedure G.

ES-MS: calculated mass = 1745.76; found m/z: (ES+) 1748.01 [M+2H]⁺; 875.09 [M+3H]²⁺; (ES-) 1746.88 [M]⁻; 873.00 [M-H]²⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity = 97.4%; Rt = 13.1 min (Purosphère, A/B, 100/0 to 30/70 in 20 min, 30/70 for 10 min).

II - Synthèse des composés de la famille T

II.1) Généralités

II.1.a - Réactifs

Tous les réactifs de départ et les solvants sont commerciaux. Ils ont été commandés chez Aldrich, Flucka, Acros, Interchim, Bachem ou Invitrogen. Aucune purification n'a été mise en œuvre avant l'utilisation de ces produits. Les solvants anhydres ont été utilisés de la même façon, sans purification avant manipulation. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultrapure filtrée et purifiée par osmose inverse en utilisant le système d'osmose-inverse Millipore MilliQ cartridge (résistivité 18 MΩcm).

Les solvants ont été dégazés par bullage d'Argon pendant 3h minimum. Le tamis moléculaire a été activé pas chauffage à 200°C sous vide pendant 24h. Enfin, de l'argon a été utilisé pour les manipulations sous atmosphère inerte.

II.1.b - Equipements

- *Chromatographie*

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice 60 F254 (Merck). Pour révéler ces plaques, nous avons utilisé une lampe UV, une solution au KMnO₄, une solution de H₂SO₄ à 10% dans l'éthanol, ou de la ninhydrine.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec du gel silice, préparé à base de silice 60 F254 (Merck, 40-63 μm).

Les HPLC analytiques et préparatives ont été réalisées sur un système VWR, avec une colonne Purosphere RP18 (L = 250 mm, Ø = 4.6 mm et p = 5 μm pour la colonne analytique; L = 250 mm, Ø = 50 mm et p = 10 μm pour la colonne préparative) et Chromolith RP18 (L= 250 mm, Ø = 4.6 mm et p = 5 μm pour la colonne analytique ; L = 250 mm, Ø = 50 mm et p = 10 μm pour la colonne préparative). Des débits de 1 mL/min ont été utilisés pour l'HPLC analytique et 15 et 30 mL/min pour les colonnes purosphères et chromolith respectivement pour l'HPLC préparative. Une détection UV à 214 nm (et 600 nm en présence de fluorophore) permet d'acquérir le chromatogramme. Les solvants utilisés sont l'eau, l'acétonitrile ou les solvants A et B (A : H₂O / 0,01% TFA ; B : CH₃CN / 0,01% TFA / 10% H₂O). Les échantillons sont filtrés avant injection sur filtre 0.45 μm.

- *Caractérisations*

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance DMX 200, 400, et 500, et Mercury Varian 400. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm). Plusieurs abréviations sont utilisées pour décrire les spectres : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublets), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). La configuration anomérique est établie à partir des constantes de couplage J_{1,2} et des déplacements chimiques.

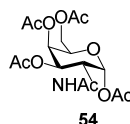
Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre Finigan LXQ à trappe d'ions en mode d'ionisation électrospray (THERMO Scientific, San Jose, USA).

II.2) Synthèse de sucres modifiés avec une chaîne Peg en bras espaceur

The whole procedure for Chel2 synthesis was optimized and described by Pujol *et al.*¹² and the L⁵ chelating unit by Jullien *et al.*⁷²

Compound 54: Tetra-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-D-galactopyrannose

*Adapted from the procedure described by Wu et al.*²⁵⁹



Chemical Formula: C₁₆H₂₃NO₁₀

MW: 389.36 g.mol⁻¹

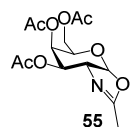
To a solution of commercial N-acetyl-D-Galactosamine (1.00 g, 4.52 mmol, 1 eq.) in acetic anhydride (4.1 mL, 42.9 mmol, 9.5 eq.) under inert atmosphere, pyridine (6.33 mL, 78.4 mmol, 17 eq.) was added. The reaction was stirred for 12 hours at room temperature and monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) (SiO₂, ethyl acetate). Then, the reaction mixture was poured into ice water (50 mL), and this mixture was extracted twice with CH₂Cl₂ (70 mL). The organic fraction was washed with brine (2 × 50 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude compound **54** (m = 1.70 g, 98%, R_f = 0.6) as an orange oil was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.22 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1); 5.43 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.37 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH); 5.23 (dd, J = 3.2 and 11.5 Hz, 1H, H-3); 4.74 (ddd, J = 3.6 Hz, 9.2 Hz and 11.5 Hz, 1H, H-2); 4.21-4.23 (m, 1H, H-5); 4.07, 4.12 (ABX, J_{BX} = 6.6 Hz, J_{AX} = 6.9 Hz, J_{AB} = 11.2 Hz, 2H, H-6); 2.18 (s, 6H, 2×COCH₃); 2.04 (s, 6H, 2×COCH₃); 1.95 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 171.53 (CO); 170.68 (CO); 170.522 (CO); 170.30 (CO); 169.07 (CO); 91.69 (C-1); 68.87 (C-5); 68.15 (C-3); 67.01 (C-4); 61.60 (C-6); 47.33 (C-2); 23.53 (CH₃); 21.28 (2×CH₃); 21.00 (2×CH₃).

Compound 55: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-oxazole-2-deoxy-D-galactopyrannosyl

*Adapted from the procedure described by Wu et al.*²⁵⁹ and by Westerlind *et al.*¹⁷⁵



Chemical Formula: C₁₄H₁₉NO₈

MW: 329.31 g.mol⁻¹

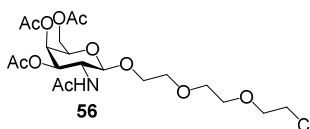
To a solution of compound **54** (1.72 g, 4.41 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) under argon, TMSOTf (2.7 mL, 15 mmol, 3.4 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was

stirred overnight at 45°C and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, v/v). Then at 0°C, Et₃N (2.15 mL, 15.4 mmol, 3.5 eq.) was slowly added. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 3 × 50 mL) and brine (2×50 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product **55** (1.90 g, Qtt) was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.99 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-1); 5.46 (t, J = 3.0 Hz, 1H, H-4); 4.91 (dd, J = 3.3 and 7.4 Hz, 1H, H-3); 4.23-4.27 (m, 1H, H-5); 4.11 and 4.20 (ABX, J_{AX} = 5.8 Hz, J_{BX} = 7.0 Hz, J_{AB} = 11.2 Hz, 2H, H-6); 3.98-4.02 (m, 1H, H-2); 2.12 (s, 3H, COCH₃); 2.07 (s, 6H, 2×COCH₃); 2.06 (s, 3H, COCH₃).

Compound 56: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Wu et al.²⁵⁹ and by Westerlind et al.¹⁷⁵



Chemical Formula: C₂₀H₃₂ClNO₁₁
MW: 497.92 g.mol⁻¹

To a solution of the crude product **55** (4.41 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL), molecular sieves 4 Å and 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (1.1 mL, 7.28 mmol, 1.65 eq.) were added under argon. The reaction mixture was stirred 30 minutes at room temperature. Then, TMSOTf (0.48 mL, 2.65 mmol, 0.6 eq.) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate/EtOH/AcOH, 8/0.2/0.2, v/v/v). Then, at 0°C, Et₃N (0.49 mL, 3.44 mmol, 0.79 eq.) was added. The mixture was filtered, diluted in CH₂Cl₂ (100 mL) and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 2×50 mL) and brine (3×50 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product (2.75 g) was purified by column chromatography on silica gel (110g, ethyl acetate/AcOH/EtOH: 8/0.2/0.2) to give the compound **56** (1.167 g, 55%).

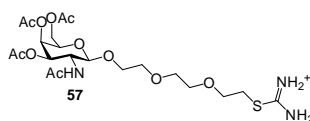
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.22 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NH); 5.30-5.33 (d broad, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.00 (dd, J = 3.4 and 11.2 Hz, 1H, H-3); 4.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-1); 4.24-4.34 (m, 1H, H-2); 4.12 and 4.19 (ABX, J_{AX} = 6.5 Hz, J_{BX} = 6.9 Hz, J_{AB} = 11.2 Hz, 2H, H-6); 3.63-3.91 (m, 13H, 6×CH₂ and H-5); 2.16 (s, 3H, COCH₃); 2.05 (s, 6H, 2×COCH₃); 1.99 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 171.01, 170.91, 170.85, 170.76 (4×CO); 102.80 (C1); 72.25, 71.69, 71.45, 70.04, 70.97, 70.66 (4×CH₂, C3 and C5); 68.00 (CH₂); 67.05 (C4); 61.96 (C6); 50.93 (CH, C2); 43.28 (CH₂Cl); 23.70 (3×COCH₃); 21.02 (NHCOCH₃).

ES-MS: calculated mass = 497.17; found m/z = 520.3 [M+Na]⁺

Compound 57: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamino-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-carbamimidoylthioethoxy)ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Woehrle et al.²⁹⁴



Chemical Formula: C₂₁H₃₅N₃O₁₁S

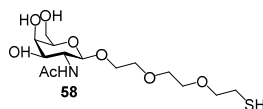
MW: 537.58 g.mol⁻¹

To a solution of **56** (0.299 g, 0.60 mmol) in degased water (5 mL), was added thiourea (0.101 g, 1.33 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred 24h at reflux (110°C) under argon and then directly engaged in the following step of the synthesis.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K, portion of reaction mixture): δ ppm = 5.35 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.05 (dd, J = 3.2 Hz, J = 11.1 Hz, 1H, H-3); 4.66 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-1); 3.98-4.28 (m, 4H, 2×CH₂, H-5, H-6, H-2); 3.92 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂-O); 3.72-3.82 (m, 8H 4×CH₂); 3.31 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂S); 2.17 (s, 3H, COCH₃); 2.05 (s, 3H, COCH₃); 1.97 (s, 3H, COCH₃); 1.94 (s, 3H, COCH₃).

Compound 58: 2-(acetlamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Woehrle et al.²⁹⁴ and Koeller et al.²⁹⁵



Chemical Formula: C₁₄H₂₇NO₈S

MW: 369.43 g.mol⁻¹

After dilution of the previous mixture (compound **57**) (0.60 mmol) in degased MeOH (10 mL), NaOH (1M) was added until pH 9.6 under argon. The reaction was stirred at 85°C for 7 hours. To maintain a pH at 9.6 during the reaction, an electrode was used (reference: Ag/AgCl in KCL 3 mol.L⁻¹). The pH was controlled every 2 hours at room temperature and NaOH (1M) was added if pH < 9.6. Then, the pH was adjusted at 7 by adding HCl (1M) and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product **58** (0.30 g, Qtt) was used without further purification.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K) : δ ppm = 4.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-1); 3.96-4.00 (m, 1H, H-5); 3.96 (d, J = 3.2, 1H, H-4); 3.68-3.87 (m, 14H, 5×CH₂, H-2, H-3, H-6,); 2.77 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-SH); 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃).

(Crude product **5**: 10% of dimerisation by-product: 2.9 (t, J = 8 Hz, 4H, 2×CH₂S dimer)).

Compound 59: 2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl 2-[2-[2-(2-pyridinyldithio)ethoxy]ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Jones et al.²⁹³



Chemical Formula: C₁₉H₃₀N₂O₈S₂

MW: 478.57 g.mol⁻¹

To a solution of product **58** (0.60 mmol) in degassed MeOH (15 mL), aldrithiol (0.396 g, 1.8 mmol, 3 eq.) was added. The reaction was stirred 4 hour at room temperature under argon and was monitored by analytical RP-HPLC (Purosphere star, 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50; Rt = 16.2 min). Then, the reaction mixture was concentrated and purified on RP-HPLC (water-acetonitrile). The product **59** was obtained as a white solid (0.096 g, 33% over 3 steps) after lyophilisation. This product is sensitive to oxygen.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.40-8.44 (m, 1H, CH, Hpyr); 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH, Hpyr); 7.86 (td, J = 1.8 Hz and 7.4 Hz, 1H, CH Hpyr); 7.25 (ddd, J = 0.8 Hz, 4.8 Hz and 7.2 Hz, 1H, CH, Hpyr); 4.46 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1); 3.90-3.97 (m, 1H, H-3); 3.81 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 3.70-3.76 (m, 5H, H-2, 2×CH₂); 3.72 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂O); 3.58-3.65 (m, 4H, 2×CH₂); 3.53- 3.57 (m, 2H, H-6); 3.48 (ddd, J = 1.2 Hz, 5.2Hz and 6.4 Hz, 1H, H-5); 3.02 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂S-S); 1.97 (s, 3H, NHCOCH₃).

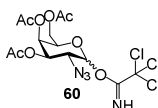
¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K) : δ ppm = 175.49 (CONH); 163.10 (Cpyr); 140.83, 123.74, 123.59, 122.56 (4×CHpyr); 104.50 (CH, C-1); 78.12, 74.94, 72.97, 72.78, 71.11, 71.02, 63.88 (C-3, C-4, C-5, C-6 5×OCH₂); 55.68 (C-2); 41.20 (CH₂S-S); 24.43 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 478.12; found m/z: 479.2 [M+H]⁺; 501.3 [M+Na]⁺; 517.3 [M+K]⁺; 276.2 [M-GalNAc+H]⁺ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Analytical RP-HPLC: purity = 99%, Rt = 16.2 min (gradient: 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50).

Compound 60: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate

Procedure adapted from Parry et al.²⁶⁷



Chemical Formula: C₁₄H₁₇Cl₃N₄O₈

MW: 475.66 g.mol⁻¹

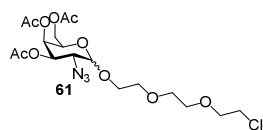
To a solution of Tri-O-Acetyl-2-Azido-2-Deoxygalactose **5** (2.45 g, 7.40 mmol) in anhydrous dichloromethane (30mL) cooled at 0°C were added K₂CO₃ (5.11 g, 37.0 mmol, 5 eq.) and trichloroacetonitrile (7.42 mL, 37.0 mmol, 5eq.). The reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature. The suspension was then filtered on a pad Celite and washed with CH₂Cl₂. The filtrate was concentrated in *vacuo*, and the dark brown residue was purified by column chromatography on silica gel (250 g, cyclohexane/ethyl acetate, 3/2, v/v) to afford compound **60** as a pale yellow oil (2.92 g, 83%) which was a mixture of α and β stereoisomers in a ratio 0.7:1 (as determined by ¹H NMR spectroscopy). The individual stereoisomers were not isolated.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.97 (s, 1H, NH); 6.52 (d, J _{α} = 3.4 Hz, 1H, H-1 _{α}); 5.70 (d, J _{β} = 8.9 Hz, 1H, H-1 _{β}); 5.54 (dd, J _{α} = 1.4 Hz, J _{α} = 3.2 Hz, 1H, H-4 _{α}); 5.41 (dd, J _{β} = 1.2 Hz and 3.3 Hz, 1H, H-4 _{β}); 5.38 (dd, J _{α} = 3.1 Hz and 11.0 Hz, 1H, H-3 _{α}); 4.91 (dd, J _{β} = 3.2 Hz and 10.8 Hz, 1H, H-3 _{β}); 4.42 (td, J _{α} = 1.2 Hz and 7.0 Hz, 1H, H-5 _{α}); 4.18-4.19 (m, 2H, H-6 _{α}); 4.07-4.17 (m, 3H, H-5 _{β} , H-6 _{β}); 4.05 (m, 1H, H-2 _{α}); 3.98-4.02 (m, 1H, H-2 _{β}); 2.19 (s, 6H, 2×COCH_{3 β}), 2.17 (s, 3H, COCH_{3 β}); 2.03 (s, 6H, 2×COCH_{3 α}); 2.01 (s, 3H, COCH_{3 α}).

ES-MS: calculated mass: 474.01; found m/z: 497.1.0 [M+Na]⁺ ; 501.0 [M+K]⁺.

Compound 61: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethyl

*Procedure adapted from Parry et al.*²⁶⁷



Chemical Formula: C₁₈H₂₈ClN₃O₁₁

MW: 481.88 g.mol⁻¹

To a solution of Tri-O-Acetyl-2-Azido-2-Deoxy-D-galactopyranosyl trichloroacetamidate **60** (2.42 g, 5.09 mmol) in Et₂O/CH₂Cl₂ (25mL, 2/1, v/v) at -20°C under argon with molecular sieves (3 Å), 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (1.11 mL, 7.63 mmol, 1.5 eq.) was added. Then TMSOTf (0.46 mL, 2.54 mmol, 0.5 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred 30 minutes at -20°C. Then the reaction was quenched by slow addition of Et₃N (0.37 mL, 2.65 mmol, 1.92 eq.) at -20 °C. The mixture was filtered and the resulting filtrate concentrated under reduced pressure. The crude product (a mixture of α / β anomers, 1:0.7 ratio determined by ¹H NMR) was purified by column chromatography on silica gel (220 g, cyclohexane/ethyl acetate, 55/45, v/v) to give compound **61** (2.24 g, 91%). The individual stereoisomers were not isolated.

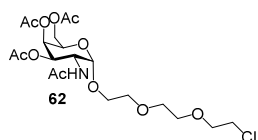
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.44 (dd, J _{α} = 1.4 Hz and 3.5 Hz, 1H, H-4 _{α}); 5.38 (dd, J _{α} = 3.1 Hz and 10.8 Hz, 1H, H-3 _{α}); 5.31 (dd, J _{β} = 0.8 Hz and 3.8 Hz, 1H, H-4 _{β}); 5.08 (d, J _{α} = 3.2 Hz, 1H, H-1 _{α}), 4.76 (dd, J _{β} = 3.3 Hz and 11.0 Hz, 1H, H-3 _{β}); 4.49 (d, J _{β} = 8.1 Hz, 1H, H-1 _{β}); 4.30 (td, J _{α} = 1.4 and 6.7 Hz, 1H, H-5 _{α}); 4.12-4.18 (m, 3H, H-5 _{α} , H-6 _{α}); 4.00-4.9 (m, 3H, H-5 _{β} , H-6 _{β}); 3.78 (m, 1H, H-2 _{α}); 3.76 (m, 1H, H-2 _{β}); 3.77-3.87 (m, 12H, 6×CH_{2 β}); 3.68-3.62

(m, 12H, 6×CH_{2α}); 2.13 (s, 6H, 2×COCH_{3β}); 2.14 (s, 3H, COCH_{3β}); 2.04 (s, 6H, 2×COCH_{3α}); 2.03 (s, 3H, COCH_{3α}).

ES-MS: calculated mass: 481.15; found m/z: 504.2 [M+Na]⁺; 499.2 [M+NH₄]⁺, 520.1 [M+K]⁺.

Compound 62: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamino-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethyl

*Procedure adapted from Renaudet et al.*²⁵³



Chemical Formula: C₂₀H₃₂ClNO₁₁
MW: 497.92 g.mol⁻¹

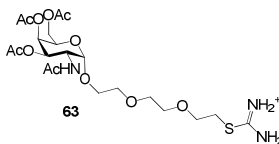
Compound **61** (2.15 g, 4.47 mmol) was dissolved in MeOH/Ac₂O (49mL, ratio 9/1, v/v) and Pd/C (10%, 0.48 g, 1eq.) was added. The reaction was stirred at room temperature under atmosphere of hydrogen (1.6.10⁵ Pa) during 4 hours. The catalyst was removed by filtration through a pad of celite and washed with methanol. The filtrate was concentrated in *vacuo*, and the dark residue (a mixture of α/β anomers, 1:0.7 ratio determined by ¹H NMR) was purified by refrigerated column chromatography on silica gel (200 g, cyclohexane/acetone, 50/50, v/v) to afford a pure α stereoisomer, compound **62** as a colorless oil (0.710 g, 33%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.81 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NH); 5.37 (d broad, J = 0.7 Hz and 2.5 Hz 1H, H-4); 5.17 (dd, J = 3.5 Hz and 11.3 Hz, 1H, H-3); 4.90 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H-1); 4.59 (ddd, J = 3.4 Hz, 4.0 Hz and 9.8 Hz, 1H, H-2); 4.24 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H-5); 4.04-4.14 (m, 2H, H-6); 3.64-3.86 (m, 12H, 6×CH₂); 2.17 (s, 6H, 2×COCH₃); 2.04 (s, 3H, COCH₃); 1.97 (s, 3H, COCH₃).

ES-MS: calculated mass: 497.92; found m/z: 498.0 [M+H]⁺, 520.3 [M+Na]⁺; 536.2 [M+K]⁺.

Compound 63: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamino-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-carbamimidoylthioethoxy)ethoxy]ethyl

*Adapted from the procedure described by Woehrle et al.*²⁹⁴



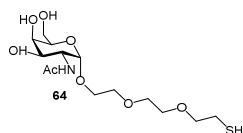
Chemical Formula: C₂₁H₃₅N₃O₁₁S
MW: 537.58 g.mol⁻¹

To a solution of **62** (0.350 g, 0.703 mmol) in degased water (5.6 mL), was added thiourea (0.118 g, 1.55 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred 24h at reflux 110°C under argon and then directly engaged in the following step of the synthesis.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K, portion of reaction mixture): δ ppm = 5.37 (m, 1H, H-1); 5.10 (dd, J = 2.7 Hz and 11.1 Hz, 1H, H-3); 3.71-4.42 (m, 15 H, H-2, H-4, H-5, H-6, $5\times\text{CH}_2$); 3.35 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2S); 2.18 (s, 3H, COCH_3); 2.14 (s, 3H, COCH_3); 2.09 (s, 3H, COCH_3); 2.06 (s, 3H, COCH_3).

Compound 64: 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl 2-[2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Woehrle et al.²⁹⁴ and Koeller et al.²⁹⁵



Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}$

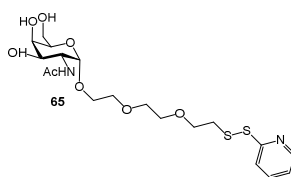
MW: $369.43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

After dilution of the previous mixture (compound **63**) (0.703 mmol) in degased MeOH (11 mL), NaOH (1M) was added until pH 9.6 under argon. The reaction was stirred at 85°C for 5 hours. To maintain a pH at 9.6 during the reaction, an electrode was used (reference: Ag/AgCl in KCl 3 mol.L⁻¹). The pH was controlled every 2 hours at room temperature and NaOH (1M) was added if pH < 9.6. Then, the pH was adjusted at 7 by adding HCl (1M) and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product **64** (0.300 g, Qtt) was used without further purification.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.15 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-1); 3.65-4.27 (m, 16H, $5\times\text{CH}_2$ and H-2, H-3, H-4, H-5, H-6); 2.76 (t, J = 6.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-SH}$); 2.04 (s, 3H, NHCOCH_3).

Compound 65: 2-(acetamino)-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl 2-[2-[2-(2-pyridinyldithio)ethoxy]ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Jones et al.²⁹³



Chemical Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$

MW: $478.57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of product **64** (0.703 mmol) in degased MeOH (17 mL), aldrithiol (0.462 g, 2.11 mmol, 3 eq.) was added. The reaction was stirred 3 hours at room temperature under argon and was monitored by analytical C18 RP-HPLC (Chromolith, 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50; Rt = 16.2 min). Then, the reaction mixture was concentrated and purified on RP-HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$: 100/0 for 6 min, 100/0 to 50/50 for 16 min and 50/50 for 5 min). The product **65** was obtained as a pale yellow solid (0.152 g, 46% over 3 steps) after lyophilisation. This product is sensitive to oxygen.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.41-8.42 (m, 1H, H_{pyr}); 7.85-7.92 (m, 2H, H_{pyr}); 7.30-3.34 (m, 1H, H_{pyr}); 4.91 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1); 4.19 (dd, J = 3.8 Hz and 10.9 Hz, 1H, H-3); 3.93-3.97 (m, 3H, H-5, H-6); 3.68-3.87 (m, 10H, 5 \times CH₂); 3.58-3.67 (m, 2H, H-2, H-4); 3.06 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂S); 2.04 (s, 3H, NHCOCH₃).

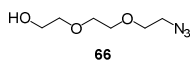
^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz, 298 K) : δ ppm = 174.49 (CONH); 148.98 (C_{pyr}); 138.66, 121.86, 121.15, 97.28 (4 \times CH_{pyr}); 70.98 (CH, C-1); 69.68, 69.47, 69.28, 68.52, 68.03, 67.85, 66.56, 61.25 (C-3, C-4, C-5, C-6, 5 \times OCH₂); 49.80 (C-2); 37.76 (CH₂S-S); 21.98 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 478.12; found m/z : 479.2 [M+H]⁺; 501.3 [M+Na]⁺; 517.3 [M+K]⁺; 276.2 [M-GalNAc+H]⁺ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Analytical RP-HPLC: purity = 99%, R_t = 14.8 min (gradient: 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50).

Compound 66: 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethanol

*Adapted from the procedure described by Legeay et al.*²⁹⁷



Chemical Formula: C₆H₁₃N₃O₃

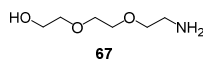
MW: 175.19 g.mol⁻¹

To a solution of 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (2.50 g, 14.8 mmol) in anhydrous DMF (24 mL), sodium azide (1.93 g, 29.6 mmol, 2 eq.) was added under argon. The reaction mixture was stirred 16 hours at 80°C and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (150 mL) and the organic layer was washed with brine (1 \times 100 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product **66** (2.30 g, 87%, yellow oil) was used without any purification.

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 3.72 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂); 3.66-3.68 (m, 6H, 3 \times CH₂); 3.60 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂); 3.38 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂N₃); 2.37 (s, 1H, OH).

Compound 67: 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethanol

*Adapted from the procedure described by Lebeau et al.*²⁹⁸



Chemical Formula: C₆H₁₅NO₃

MW: 149.19 g.mol⁻¹

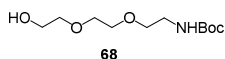
To a solution of 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethanol **66** (2.36 g, 13.1 mmol) in THF (35 mL), triphenylphosphine (3.79 g, 14.4 mmol, 1.1 eq.) and water (0.425 mL, 23.6 mmol, 1.8 eq.) were added. The reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/ethyl acetate 50/50, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in water (150 mL) and the aqueous layer was washed with toluene (2 \times 100 mL) and concentrated under reduced pressure (azeotrope

with ethanol). The crude product **67** (2.00 g, Qtt, yellow oil) was used without any purification.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 3.72 (t, J = 4.2 Hz, 2H, CH_2); 3.65 (d, J = 5.2 Hz, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 3.60 (q, J = 4.4 Hz, 2H, CH_2); 3.54 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH_2); 2.87 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH_2N_3); 2.07 (s broad, 3H, OH and NH_2)

Compound 68: 2-(2-(2-*tert*-butoxycarbonyl-aminoethoxy)ethoxy)ethanol

Adapted from the procedure described by Howarth et al.²⁹⁹ and Moreau et al.³⁰⁰

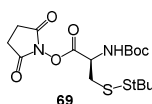


Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_5$
MW: $249.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of crude 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethanol **67** (13.1 mmol) in anhydrous ethanol (50 mL), Boc_2O (3.14 g, 14.4 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction mixture was stirred 5 hours under argon at room temperature and monitored by TLC (SiO_2 , ethyl acetate). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL) and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO_3 solution (1 \times 75 mL), brine (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was washed with ethyl acetate (3 \times 50 mL) and the gathered organic fractions were concentrated under reduced pressure. The crude product **68** (3.30 g, Qtt, yellow oil) was used without any purification.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.10 (s broad, 1H, NH); 4.10 (q, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2); 3.59-3.76 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$); 3.55 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2); 3.31 (d, J = 4.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH Boc}$); 2.48 (s broad, 1H, OH); 1.43 (s, 9H, $\text{NHCOOC}(\text{CH}_3)_3$).

Compound 69: Boc-*tert*-butyle mercapto L-cystein-*N*-oxysuccinimide



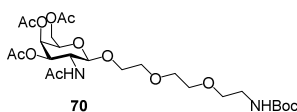
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$
MW: $406.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of commercial Boc-*tert*-butyle mercapto L-cystein (1.00 g, 3.23 mmol) in anhydrous acetonitrile (50 mL), *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 0.520 g, 4.51 mmol, 1.4 eq.) and EDCI.HCl (0.803 g, 4.20 mmol, 1.3 eq.) were successively added. The reaction mixture was stirred 24 hours under argon at room temperature and monitored by TLC (SiO_2 , ethyl acetate). The product obtained as a white precipitate was filtrated and washed with diethyl ether and acetonitrile. The crude compound **69** (1.00 g, 77%) was used without any purification.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.20-5.32 (m, 1H, NH); 4.85 (s broad, 1H, CH); 3.19-3.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$); 2.84 (s, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 1.47 (s, 9H, $\text{NHCOO}(\text{CH}_3)_3$); 1.35 (s, 9H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$).

Compound 70: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamino-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl 2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonyl-aminoethoxy)ethoxy]ethyl

Adapted from the procedure described by Wu et al.²⁵⁹ and by Westerlind et al.¹⁷⁵



Chemical Formula: C₂₅H₄₂N₂O₁₃

MW: 578.61 g.mol⁻¹

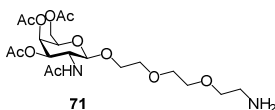
To a solution of the crude product **55** (3.85 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL), molecular sieves 4 Å was added and the solution was stirred 5 minutes at room temperature under argon. Then compound **68** (1.58 g, 6.36 mmol, 1.65 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred 30 minutes at room temperature under argon. Then, TMSOTf (0.42 ml, 2.31 mmol, 0.6 eq.) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate/EtOH, 95/5, v/v). Then, at 0°C, Et₃N (0.42 mL, 3.0 mmol, 0.78 eq.) was added. The mixture was filtered, diluted in CH₂Cl₂ (200 mL) and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 2 × 100 mL) and brine (1 × 150 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product (3.10 g) was purified by column chromatography on silica gel (300 g, ethyl acetate/EtOH, 98/2, v/v) to give the compound **70** (1.386 g, 62%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.38 (s broad, 1H, NH); 5.32 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.11 (s broad, 1H, NH); 4.81 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1), 4.13-4.16 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH); 3.90-3.93 (m, 3H, H-5, H-6); 3.80-8.84 (m, 1H, H-2); 3.59-3.69 (m, 10H, (CH₂-CH₂-O)₂, H-3); 3.32 (s large, 2H, CH₂-NH-Boc); 2.15 (s, 3H, COCH₃); 2.04 (s, 3H, COCH₃); 2.00 (s, 3H, COCH₃); 1.96 (s, 3H, COCH₃); 1.44 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 170.37, 170.45, 170.74 (3×CO); 156.15 (COO); 101.96 (C-1); 77.34 (C(CH₃)₃); 71.43 (C-3); 70.12, 70.29, 70.46, 70.67, 70.84 (CH₂O); 68.56 (C-5); 66.82 (C-4); 61.61 (CH₂); 50.91 (C-6); 40.14 (C-2); 28.41 (3×C(CH₃)₃); 23.16 (CH₃); 20.76 (CH₃); 20.70 (2×CH₃).

ES-MS: calculated mass: 578.27; found m/z: 578.9 [M+H]⁺; 601.3 [M+Na]⁺; 617.3 [M+K]⁺

Compound 71: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamino-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl



Chemical Formula: C₂₀H₃₄N₂O₁₁

MW: 478.50 g.mol⁻¹

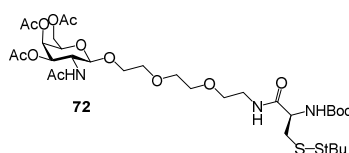
To a solution of compound **70** (0.300 g, 0.518 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL), TFA (1.985 mL, 25.9 mmol, 50 eq.) and Et₃SiH (0.250 mL, 1.55 mmol, 3 eq.) were added. The reaction mixture was stirred 5 hours at room temperature under argon. After evaporation

under reduced pressure, the crude compound **71**.TFA (0.300 g, 98%, orange oil) was used without any purification.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 9.08 (s broad, 3H, NH_3^+); 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH); 5.38 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4); 5.19 (dd, $J = 3.2$ Hz and 11.2 Hz, 1H, H-3); 4.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-1); 4.24-4.32 (m, 1H, H-2); 4.13-4.22 (m, 3H, H-5, H-6); 3.90-3.94 (m, 2H, O- CH_2 - CH_2 -NH); 3.63-4.08 (m, 8H, $(\text{CH}_2$ - CH_2 -O) $_2$); 3.28 (d large, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2 -NH $_2$); 2.16 (s, 3H, COCH_3); 2.07 (s, 3H, COCH_3); 2.04 (s, 3H, COCH_3); 2.00 (s, 3H, COCH_3).

ES-MS: calculated mass: 478.22; found m/z : 479.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Compound 72



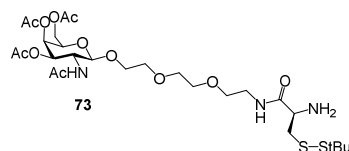
Chemical Formula: $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}$

MW: $769.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of compound **71** (20+TFA; 0.200 g, 0.337 mmol) in anhydrous acetonitrile (7 mL), compound **69** (0.151 g, 0.371 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (until pH7) were added under argon. The reaction mixture was stirred 20 hours at room temperature under argon. After evaporation under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography on silica gel (20 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, 98/2, v/v) to give compound **72** (0.183 g, 71%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.97 (m, 1H, NH-Boc); 6.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-1); 5.44 (m, 1H, H-4); 5.34 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H, NH); 5.17 (dd, $J = 3.6$ Hz and 10.8 Hz, 1H, H-5); 4.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-3); 4.37 (m, 1H, H-2); 4.08-4.18 (m, 2H, H-6); 3.94 (s, 3H, CH); 3.83 (m, 2H, CH_2); 3.57-3.65 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2\text{O}$); 3.47 (m, 2H, CH_2 -S-S); 3.07 (m, 2H, CH_2 -NH); 2.14 (s, 3H, COCH_3); 2.04 (s, 3H, $2\times\text{COCH}_3$); 1.98 (s, 3H, NHCOCH_3); 1.44 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$, $\text{NHCO}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$).

Compound 73



Chemical Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{S}_2$

MW: $669.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of compound **72** (0.180 g, 0.233 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (9 mL), TFA (0.895 mL, 11.7 mmol, 50 eq.) and Et_3SiH (0.112 mL, 0.701 mmol, 3 eq.) were added. The reaction mixture was stirred 3 hours at room temperature under argon and monitored by

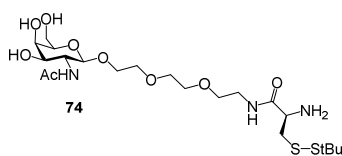
TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/EtOH, 90/10, v/v). After evaporation under reduced pressure, the crude compound **73**.TFA (0.180 g, 100%) was used without any purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.49 (m, 1H, NH); 6.73 (t, J = 10.6 Hz, 1H, NH); 5.32 (d, J=3.2 Hz, 1H, H-4); 5.02 (td, J = 3.6 and 11.2 Hz, 1H, H-3); 4.56 (td, J = 3.2 Hz and 10.4 Hz, 1H, H-2); 3.25-4.24 (m, 17H, 6×CH₂, CH, H-1, H-5, H-6); 3.12-3.25 (m, 2H, CH₂-S-S); 1.92-1.97 (m, 12H, 4×COCH₃); 1.36 (s, 3H, SC(CH₃)₃).

ES-MS: calculated mass: 669.26; found m/z: 670 [M+H]⁺, 692 [M+Na]⁺, 695 [M+K]⁺, 628 [M-1Ac+H]⁺, 650 [M-1Ac+Na]⁺, 586 [M-2Ac+H]⁺, 608 [M-2Ac+Na]⁺.

Compound 74

*Adapted from the procedure described by Sallas et al.*³²¹



Chemical Formula: C₂₁H₄₁N₃O₉S₂
MW: 543.69 g.mol⁻¹

To a solution of crude compound **73** (0.500 mmol) in anhydrous methanol (2 mL), sodium methoxide (0.5 N in MeOH, 0.344 mL, 0.170 mmol, 1.5 eq.) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under argon and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/EtOH, 70/30, v/v). Then, water (1mL) was added and the mixture was evaporated under reduced pressure. The obtained crude compound **74** (0.250 g, 92%) was used without any purification.

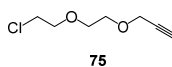
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1); 4.02-4.6 (m, 1H, H-5); 3.96 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-4); 3.67-3.93 (m, 14H, 5×CH₂-O, H-6, H-2, H-3); 3.40-3.52 (m, 2H, CH₂S-S); 3.04 (d, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-NH); 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃); 1.37 (s, 3H, SC(CH₃)₃).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 174.71, 175.54 (2×CO); 101.56 (C-1); 75.13 (C(CH₃)₃); 71.10 (C-3); 67.83, 68.77, 68.90, 69.48, 69.70 (5x O-CH₂-CH₂, C-5,); 60.98 (C-4); 54.26 (C-6); 52.40 (C-2); 44.11 (CH₂-NH); 39.04 (CH₂S-S); 28.98 (3×CH₃ tBu); 22.28 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 543.23; found m/z: 566.3 [M+Na]⁺, 341 [M-GalNAc+H]⁺, 363 [M-GalNAc+Na]⁺ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Compound 75: 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)prop-2-yne

*Adapted from the procedure described by Piron et al.*³⁰²



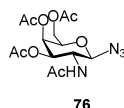
Chemical Formula: C₇H₁₁ClO₂
MW: 161.61 g.mol⁻¹

The 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (1.50 g, 12.04 mmol) was added dropwise to a solution of NaH (60%, 0.963 g, 24.08 mmol, 2 eq.) in anhydrous THF (30 mL) cooled at -78°C, under argon. The reaction mixture was stirred 15 minutes at -78°C. Then, a propargyl bromide solution (80% in toluene, 0.476 mL, 13.24 mmol, 1.1 eq.) was slowly added and the reaction mixture was allowed to slowly reach the room temperature. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, hexane/ether, 80/20, v/v). Then, water (20 mL) was slowly added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 40 mL). The gathered organic fractions were dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product (2.80 g, orange oil) was purified by column chromatography on silica gel (130 g, hexane/ether, 80/20, v/v) to give the compound **75** (1.75 g, 89%, yellow oil).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.21 (d, J = 2.4 Hz, 2H, CH₂O); 3.76 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂); 3.70 (s, 4H, 2×CH₂); 3.64 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂); 2.43 (s, 1H, CH).

Compound 76: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamino-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl azide

*Adapted from Szilagyi et al.*³⁰³



Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₄O₈

MW: 372.33 g.mol⁻¹

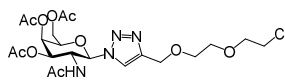
To a solution of compound **54** (0.800 g, 2.05 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) under argon, TMSN₃ (0.409 mL, 3.08 mmol, 1.5 eq.) and SnCl₄ (0.120 mL, 1.03 mmol, 0.5 eq.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate/cyclohexane, 75/25, v/v). Then the reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃ solution (30 mL), extracted with CH₂Cl₂ (2 × 50mL). The gathered organic fractions were washed with brine (1 × 30 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product **76** (0.720 g, 94%, white solid) was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.41 (s broad, 1H, NH-Ac); 5.38 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-4); 5.23 (dd, J = 3.2 and 11.6 Hz, 1H, H-3); 4.78 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1); 4.16 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-6); 3.99-4.04 (m, 2H, H-5, H-2); 2.17 (s, 3H, COCH₃); 2.06 (s, 3H, COCH₃); 2.01 (s, 3H, COCH₃); 1.99 (s, 3H, COCH₃).

ES-MS: calculated mass: 372.13; found m/z: 372.9 [M+H]⁺, 395.2 [M+Na]⁺, 411.2 [M+K]⁺.

Compound 77: 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamino-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]triazol

*Adapted from Li et al.*³⁰⁴



77

Chemical Formula: C₂₁H₃₁ClN₄O₁₀

MW: 534.95 g.mol⁻¹

To a solution of the crude product **76** (2.00 g, 5.37 mmol) in anhydrous acetonitrile (80 mL), compound **75** (0.962 g, 5.91 mmol, 1.1 eq.), CuSO₄ (0.516 g, 3.21 mmol, 0.6 eq.) and sodium ascorbate (1.278 g, 6.45 mmol, 1.2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred 3 days at room temperature under argon and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (200 mL) and washed with EDTA aqueous solution (0.1 N, 2 × 100 mL) and brine (1 × 150 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product (3.1 g) was purified by column chromatography on silica gel (150 g, ethyl acetate to ethyl acetate/EtOH, 98/2, v/v) to give the compound **77** (2.30 g, 80%).

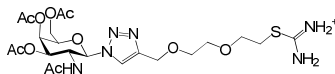
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.90 (s, 1H, CH); 5.98 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-1); 5.64 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH); 5.50 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-4); 5.43 (dd, J = 3.2 Hz, 10.8, 1H, H-3); 4.70 (s, 2H, CH₂); 4.63-4.69 (m, 1H, H-2); 4.10-4.24 (m, 3H, H-6, H-5); 3.76 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂); 3.70 (s, 4H, 2×CH₂); 3.64 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂); 2.22 (s, 3H, COCH₃); 2.05 (s, 3H, COCH₃); 2.04 (s, 3H, COCH₃); 1.78 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 170.41 (4×CO); 86.36 (C-1); 73.88 (C-3); 71.36 (CH₂); 70.58 (CH₂); 69.89 (2×CH₂); 69.72 (CH₂); 66.62 (C-4); 64.42 (C-5); 61.42 (C-6); 50.23 (C-2); 42.77 (CH₂-Cl); 23.00 (CH₃); 20.67 (3×CH₃).

ES-MS: calculated mass: 534.17; found m/z: 534.8 [M+H]⁺, 557.3 [M+Na]⁺, 573 [M+K]⁺

Compound 78: 2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl 2-[2-(2-carbamimidoylthioethoxy)ethoxy]triazol

*Adapted from the procedure described by Woehrle et al.*²⁹⁴



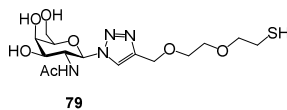
78

Chemical Formula: C₂₂H₃₄N₆O₁₀S

MW: 574.61 g.mol⁻¹

To a solution of **77** (0.180 g, 0.33 mmol) in degased water (3 mL), was added thiourea (0.055 g, 0.72 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred 24h at reflux 110°C under argon and then directly engaged in the following step of the synthesis.

Compound 79: 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl 2-[2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy]triazol



79
Chemical Formula: C₁₅H₂₆N₄O₇S
MW: 406.45 g.mol⁻¹

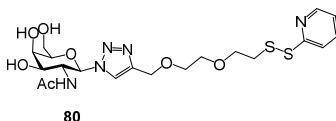
After dilution of the previous mixture (compound **79**) (0.33 mmol) in degased MeOH (8 mL), NaOH (1M) was added until pH 9.6 under argon. The reaction was stirred at 80°C for 4 hours. To maintain a pH at 9.6 during the reaction, an electrode was used (reference: Ag/AgCl in KCL 3 mol.L⁻¹). The pH was controlled every 2 hours at room temperature and NaOH (1M) was added if pH < 9.6. Then, the pH was adjusted at 7 by adding HCl (1M) and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product **79** (0.135g, Qtt) was used without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.271 (s, 1H, CH); 5.78 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-1); 4.70 (m, 1H, H-4); 4.43 (m, 1H, H-3); 4.5-3.5 (m, 8H, 4 \times CH₂, H-2, H-6, H-5); 2.63 (m, 2H, CH₂-SS); 1.88 (s, 3H, COCH₃).

ES-MS spectroscopy: calculated mass: 406.15; (ES+) found m/z: 429 [M+Na]⁺

Compound 80: 2-(acetylamino)-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl 2-[2-[2-(2-pyridinyldithio)ethoxy]ethoxy]triazol

Adapted from the procedure described by Jones et al.²⁹³



80
Chemical Formula: C₂₀H₂₉N₅O₇S₂
MW: 515.6 g.mol⁻¹

To a solution of product **79** (0.33 mmol) in degased MeOH (15 mL), aldrithiol (0.218 g, 0.99 mmol, 3 eq.) was added. The reaction was stirred 4 hour at room temperature under argon and was monitored by analytical RP-HPLC (Chromolith, 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50; Rt = 14.5 min) . Then, the reaction mixture was concentrated and purified on RP-HPLC (Chromolith, H₂O/CH₃CN). The product **80** was obtained as a white solid (0.055 g, 32% over 3 steps) after lyophilisation. This product is sensitive to oxygen so it is used as soon as it is purified.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.41 (d, J = 4.2, 1H, CH_{pyr}); 8.26 (s, 1H, CHtriazole); 7.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH_{pyr}); 7.85 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH_{pyr}); 7.26 (dd, J = 4.7 Hz and 8.4 Hz, 1H, CH_{pyr}); 5.75 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH); 4.67 (s, 2H, CH₂O); 4.53 (t, J = 9.6 Hz, 1H, H-2); 4.03 (d, J = 5.6, 1H, H-4); 3.91-3.56 (m, 10H, H-6, H-3, H-5, 3 \times CH₂); 3.07 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂SS); 1.80 (s, 3H, COCH₃).

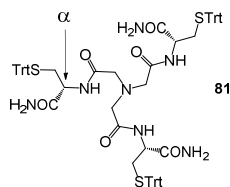
^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 137.84 (CO); 122.50 (CH-Pyr); 120.98 (CH-Pyr); 119.84 (CH-Pyr); 87.47 (C-1); 78.79 (C-5); 71.52 (C-3); 68.42, 69.30, 70.05 ($3\times\text{CH}_2\text{-O}$, C-4); 63.58 (CH-triazole); 61.16 (C-6); 52.16 (C-2); 38.64 ($\text{CH}_2\text{-S}$); 21.29 (CH_3).

ES-MS: calculated mass: 515.15; found m/z : 516 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 538.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 554.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$; 313 $[\text{M-GalNAc}+\text{H}]^+$ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Analytical RP-HPLC: purity = 99%, R_t = 14.5 min (Chromolith, gradient: 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50).

II.3) Synthesis of the tripodal pseudopeptide unit

Compound 81: *N,N*-bis[2-[[*(1R)*-2-amino-1-(mercaptomethyl)-2-oxoethyl]amino]-2-oxoethyl]glycyl-L-cystein(trityl)amide



Chemical Formula: $\text{C}_{72}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_3$

MW: $1224.57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

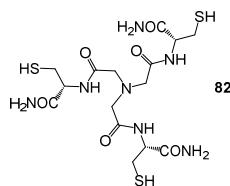
To a suspension of commercial nitrilotriacetic acid (NTA; 0.352 g, 1.84 mmol) in acetonitrile (51 mL), EDCI.HCl (1.09 g, 5.68 mmol, 3.09 eq.), HOBt (0.770 g, 5.70 mmol, 3.10 eq.) and commercial Cys(Trt)-NH₂ (2.00 g, 5.52 mmol, 3.00 eq.) were added. After stirring for 3 days at room temperature under argon at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in 300 mL of CH_2Cl_2 and washed with saturated aqueous NaHCO_3 solution (1 \times 150 mL) and brine (1 \times 150 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (250 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, 98/2, v/v) to afford the compound **81** as a white solid (0.910 g, 40%).

^1H NMR (CD_3CN , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.85 (d, J = 7.2 Hz, 3H, NH); 7.16-7.32 (m, 45H, $\text{SC}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$); 6.24 (s, 3H, NH_2); 5.70 (s, 3H, NH_2); 4.00-4.06 (m, 3H, $\text{CH}\alpha$); 3.14 and 3.19 (AB, J_{AB} = 16.4 Hz, 6H, CH_2CO); 2.37-2.44 (m, 6H, CH_2S).

^{13}C NMR (CD_3CN , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 176.15 and 178.074 ($6\times\text{CO}$); 150.03 ($3\times\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$); 132.37, 133.56, 134.89 ($3\times\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$); 63.18 ($3\times\text{CH}_2\text{CO}$); 57.78 ($3\times\text{CH}$); 38.89 ($3\times\text{CH}_2\text{SH}$).

ES-MS: calculated mass: 1223.45; found m/z : 1223.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Compound 82: L² ; N,N-bis[2-[[[(1R)-2-amino-1-(mercaptomethyl)-2-oxoethyl]amino]-2-oxoethyl]glycyl-L-cysteinamide



Chemical Formula: C₁₅H₂₇N₇O₆S₃
MW: 497.6 g.mol⁻¹

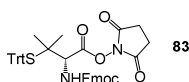
To a solution of **81** (0.910 g, 0.743 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL), TFA (2.8 mL, 37.2 mmol, 50 eq.) and triethylsilane (1.10 mL, 6.78 mmol, 9.1 eq.) were added. After stirring 1.5 hours at room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting crude product was purified by preparative C18 RP-HPLC (B/A 5/95 to 20/80 for 15 min, 20/80 to 5/95 for 5min) followed by lyophilisation to yield the compound **82** (0.320 g, 85 %) as a white solid.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.57 (dd, J = 5.2 Hz and 7.6 Hz, 3H, 3 × CH_α); 3.57 (s, 6H, 6×CH₂CO); 2.80-3.01 (ABX, J_{AX} = 5.0 Hz, J_{BX} = 7.6 Hz, J_{AB} = 14.3 Hz, 6H, 3×CH₂SH).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 175.98 and 177.04 (3×CO); 60.85 (3×CH₂CO); 57.93 (3×CH); 28.18 (3×CH₂SH).

ES-MS: calculated mass: 497.12; found m/z: 498.1 [M+H]⁺; 520.3 [M+Na]⁺

Compound 83: Fmoc-D-Pen(Trt)-N-oxsuccinimide



Chemical Formula: C₄₃H₃₈N₂O₆S
MW: 710.85 g.mol⁻¹

To a suspension of commercial Fmoc-D-Pen(Trt) (3.00 g, 4.88 mmol) in anhydrous acetonitrile (73 mL), NHS (0.816 g, 7.09 mmol, 1.45 eq.) was added under argon. The reaction mixture was cooled at 0°C and EDCl.HCl (1.22 g, 6.35 mmol, 1.3 eq.) were added. The reaction was stirred 16 hours at room temperature under argon and monitored by TLC (SiO₂, cyclohexane/ethyl acetate, 70/30, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (400 mL). The organic layer was washed with water (1 × 300 mL), saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 × 300 mL), brine (1 × 300 mL) and then dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (200 g, cyclohexane/ethyl acetate, 80/20 to 50/50, v/v) to afford the compound **83** as a white solid (3.20 g, 92%).

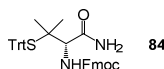
¹H NMR (CD₃CN, 200 MHz, 298 K): δ ppm = 7.82 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ar); 7.68 (d, J = 7.2 Hz, 2H, 2×HAr); 7.59 (dd, J = 1.6 and 7.2 Hz, 6H, 6×HAr); 7.40 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 2×HAr); 7.19-7.33

(m, 11H, 11×HAr); 6.28 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH); 4.36-4.38 (m, 2H, CH₂); 4.22-4.29 (m, 1H, CH); 3.67 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH_α); 2.70 (s, 4H, 2×CH₂); 1.24 (s, 3H, CH₃); 1.20 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 170.64 (CO); 167.03 (2×CO); 156.61 (NCO); 145.55 (4×C, Ar); 145.08 (C, Ar); 144.85 (C, Ar); 142.10 (C, Ar); 130.78 (7×CH, Ar); 128.80 (CH, Ar); 128.70 (6×C, Ar); 128.13 (CH, Ar); 128.08 (4×CH, Ar); 127.82 (CH, Ar); 126.16 (CH, Ar); 126.11 (CH, Ar); 120.96 (CH, Ar); 69.05 (CH₂); 67.80 (CH); 61.23 (2×CH₂); 60.92 (C); 53.06 (C); 47.84 (CH); 26.53 (CH₃); 26.35 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 710.25; found m/z = 733.2 [M+Na]⁺

Compound 84: Fmoc-D-Pen(Trt)amide



Chemical Formula: C₃₉H₃₆N₂O₃S

MW: 612.79 g.mol⁻¹

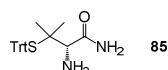
To a solution of compound **83** (3.20 g, 4.50 mmol) in anhydrous acetonitrile (67 mL), ammoniac (30%, 5.2 mL, 135 mmol, 30 eq.) was added slowly. The reaction was stirred 1 hour at room temperature under argon and monitored by TLC (SiO₂, cyclohexane/ethyl acetate, 50/50, v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (250 mL). The organic layer was washed with water (1 × 200 mL), and the resulting aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ (1 × 250 mL). The organic layers were gathered, extracted with saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 × 200 mL), brine (1 × 200 mL) and then dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude compound **84** (2.702 g, 98%) was used without purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.83 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 2×HAr); 7.69 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 2×HAr); 7.59 (d, J = 7.2 Hz, 6H, 6×HAr); 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 2H, 2×HAr); 7.19-7.33 (m, 11H, 11×HAr); 6.09 (s broad, 1H, NH₂); 5.95 (d, J = 5.2 Hz, 1H, NH); 5.77 (s broad, 1H, NH₂); 4.32-4.43 (m, 2H, CH₂); 4.26 (t, J = 6.8 Hz, 1H, CH); 3.54 (d, J = 6.8 Hz, 1H, CH_α); 1.00 (s, 3H, CH₃); 0.98 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 171.74 (CO); 156.61 (NCO); 146.00 (4×C, Ar); 145.15 (C, Ar); 145.06 (C, Ar); 142.12 (C, Ar); 130.86 (6×CH, Ar); 130.75 (CH, Ar);), 130.05 (6×CH, Ar); 128.83 (3×CH, Ar); 128.76 (CH, Ar); 128.7 (CH, Ar); 128.10 (CH, Ar); 127.92 (CH, Ar); 127.65 (CH, Ar); 126.15 (CH, Ar); 120.97 (CH, Ar); 68.75 (CH₂); 67.42 (CH); 62.57 (C); 53.94 (C); 48.03 (CH); 27.03 (CH₃); 26.31 (CH₃).

ES-MS: calculated mass = 612.24; found m/z = 635.2 [M+Na]⁺

Compound 85: D-Pen(Trt)amide



Chemical Formula: C₂₄H₂₆N₂OS

MW: 390.55 g.mol⁻¹

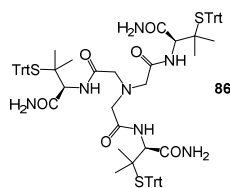
To a solution of compound **84** (2.70 g, 4.41 mmol) in anhydrous acetonitrile (22 mL), triethylamine (22 mL, 158 mmol, 36 eq.) was added. The reaction was stirred 8 hours at room temperature under argon and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate). After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (250 mL). The organic layer was washed with water (1 × 175 mL), and the resulting aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 × 200 mL). The organic layers were gathered, washed with brine (150 mL) and then dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude compound **85** (1.35 g, 78%) was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.65 (d, J = 7.2 Hz, 6H, 6×HAr); 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 2H, NH₂); 7.30 (t, J = 7.2 Hz, 6H, Ar); 7.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H, Ar); 6.32 (s broad, 1H, NH₂); 5.72 (s broad, 1H, NH₂); 2.12 (d, J = 7.6 Hz 1H, CHα); 1.11 (s, 3H, CH₃); 1.09 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 175.04 (CO); 146.28 (3×C, Ar); 130.86 (6×CH, Ar); 128.65 (6×CH, Ar); 127.57 (3×CH, Ar); 68.27 (CH); 62.41 (C); 56.45 (C); 27.41 (CH₃); 25.13 (CH₃).

ES-MS: calculated mass = 390.18; found m/z = 413.3 [M+Na]⁺

Compound 86: *N,N*-bis[2-[[[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-methyl-2-[(triphenylmethyl)thio]propyl]amino]-2-oxoethyl]glycyl-3-[(triphenylmethyl)thio]-D-valinamide



Chemical Formula: C₇₈H₈₁N₇O₆S₃

MW: 1308.73 g.mol⁻¹

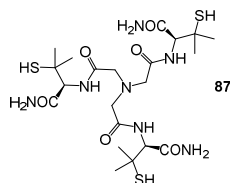
To a suspension of commercial NTA (0.163 g, 0.85 mmol) in acetonitrile (24 mL), compound **85** (1.00 g, 2.56 mmol, 3 eq.) was added. Then the reaction mixture was cooled at 0°C and EDCI.Cl (0.506 g, 2.64 mmol, 3.1 eq.) and HOBT (0.369 g, 2.64 mmol, 3.1 eq.) were added. After stirring for 16 hours at room temperature under argon at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 × 70 mL) and brine (1 × 70 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude compound **86** (1.10 g, 98%) was used without any purification.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.30 (d, J = 9.2 Hz, 3H, 3 \times NH); 7.50-7.52 (m, 18H, 3 \times 6H, Ar); 7.23-7.27 (m, 18H, 3 \times 6H, Ar); 7.12-7.16 (m, 9H, 3 \times 3H, Ar); 4.39 (d, J = 10.0 Hz, 3H, 3 \times CH); 3.44 and 3.53 (AB, J_{AB} = 13.6 Hz, 6H, 3 \times CH $_2$); 0.81 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 0.71 (s, 9H, 3 \times CH $_3$)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 170.32 (3 \times CO); 170.22 (3 \times CO); 144.92 (9 \times C, Ar); 129.73 (18 \times CH, Ar); 127.85 (18 \times CH, Ar); 126.42 (9 \times CH, Ar); 66.98 (3 \times CH); 60.64 (3 \times C); 57.01 (3 \times C); 53.17 (3 \times CH $_2$); 26.03 (3 \times CH $_3$); 25.80 (3 \times CH $_3$).

ES-MS: calculated mass: 1307.54; found m/z : 1330.3 [M+Na] $^+$; 1342.1 [M+Cl] $^-$

Compound 87: L 5 ; N,N-bis[2-[[[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-mercapto-2-methylpropyl]amino]-2-oxoethyl]glycyl-3-mercapto-D-valinamide



Chemical Formula: C $_{21}$ H $_{39}$ N $_7$ O $_6$ S $_3$
MW: 581.77 g.mol $^{-1}$

To a solution of **86** (0.550 g, 0.421 mmol) in anhydrous CH $_2$ Cl $_2$ (24 mL), TFA (1.49 mL, 21 mmol, 50 eq.) and triethylsilane (0.728 mL, 3.83 mmol, 9.1 eq.) were added. After stirring 1 hour at room temperature under argon, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting crude product was purified by preparative C18 RP-HPLC (A/B 80/20 for 5min, 80/20 to 0/100 for 7 min, 0/100 for 2 min) followed by lyophilisation to yield the compound **87** (85.7 mg, 35 %) as a white solid.

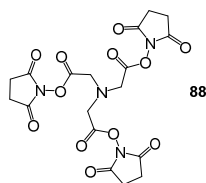
^1H NMR (CD $_3$ CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.54 (d, J = 9.2 Hz, 3H, 3 \times NH); 6.59 (s, 3H, 3 \times NH $_2$); 5.92 (s, 3H, 3 \times NH $_2$); 4.43 (d, J = 9.2 Hz, 3H, 3 \times CH); 3.48 and 3.55 (AB, J_{AB} = 13.6 Hz, 6H, 3 \times CH $_2$); 1.46 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 1.38 (s, 9H, 3 \times CH $_3$).

^{13}C NMR (CD $_3$ CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 172.12 (3 \times CO); 169.87 (3 \times CO); 62.18 (3 \times CH); 58.82 (3 \times CH $_2$); 46.29 (3 \times C); 30.63 (3 \times CH $_3$); 29.98 (3 \times CH $_3$).

ES-MS: calculated mass: 581.21; found m/z : 582.3 [M+H] $^+$, 604.3 [M+Na] $^+$

Analytical RP-HPLC: purity: 99.6%; R_t = 9.5 min; (Chromolith, A/B 80/20 for 5min, 80/20 to 0/100 for 7, 0/100 for 2 min).

Compound 88: Tris(*N*-oxysuccinimide)2,2',2'-nitriлотriacetate

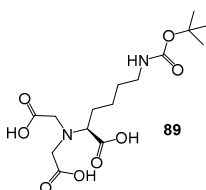


Chemical Formula: C₁₈H₁₈N₄O₁₂
MW: 482.36 g.mol⁻¹

To a solution of commercial NTA (1.00 g, 5.23 mmol) in acetonitrile (75 mL), EDCI.HCl (3.20 g, 16.7 mmol, 3.2 eq.) and NHS (2.10 g, 18.3 mmol, 3.5 eq.) were added. After stirring 20 hours at room temperature, the reaction mixture was filtrated and washed with acetonitrile to obtain the crude compound **88** (0.305 g, 48 %) as a white solid, used without purification.

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.12 (s, 6H, 3×CH₂); 2.82 (s, 12H, 3×CH₂-CH₂).

Compound 89: *N*²,*N*²-bis(carboxymethyl)-*N*-6-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-*L*-lysine



Chemical Formula: C₁₅H₂₆N₂O₈
MW: 362.38 g.mol⁻¹

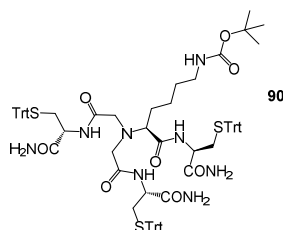
To a solution of Na₂N₂-Bis(Carboxymethyl)-*L*-Lysine Hydrate (0.500 g, 1.88 mmol) in acetonitrile/water (10 mL, 50/50, v/v) at 0°C, Di-*tert*-butyl dicarbonate (0.614 g, 2.82 mmol, 1.5 eq.) and NaHCO₃ (0.413 g, 4.92 mmol, 2.6 eq.) were added. The mixture was stirred 24 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/methanol/AcOH, 70/29/1, v/v/v). After evaporation under reduced pressure, the resulting product was dissolved in water (25 mL) and extracted with ethyl acetate (2 × 15 mL). Then the aqueous layer was acidified by aqueous 1N KHSO₄ solution until pH 2.0. The aqueous layer was extracted by ethyl acetate (3 × 25 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product **89** (0.556 g) was used without further purification.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.01 (s, 4H, CH₂CO); 3.97-4.01 (m, 1H, CHCO); 3.10 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂(Lys)); 1.83-2.02 (m, 2H, CH₂(Lys)); 1.47-1.58 (m, 4H, 2×CH₂(Lys)); 1.44 (s, 9H, 3×CH₃).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 174.98-173.07 (2×CO); 70.77 (CHCO); 58.23 (CH₂CO); 57.86 (C(CH₃)₃); 41.88 (NCH₂(Lys)); 31.50, 30.61, 29.40 (3×CH₂(Lys)); 25.88 (3×CH₃(Boc)).

ES-MS: Calculated mass: 362.17; found: 361.3 [M+H]⁺; 385 [M+Na]⁺; 401 [M+K]⁺

Compound 90



Chemical Formula: C₈₁H₈₆N₈O₈S₃

MW: 1395.81 g.mol⁻¹

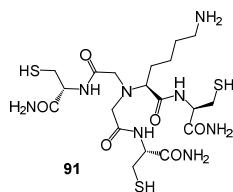
To a suspension of **89** (0.250 g, 0.69 mmol) in anhydrous Acetonitrile (19 mL), EDCI.HCl (0.410 g, 2.14 mmol, 3.1 eq.) and HOBT (0.29 g, 2.14 mmol, 3.1 eq.) were added (solubilisation). The mixture was stirred 5 min at room temperature and Cys(Trt)NH₂ (0.750 g, 2.07 mmol, 3 eq.) was added. The reaction mixture was stirred 24 hour at room temperature under argon. After evaporation under reduced pressure, H₂O (15 mL) was added and the mixture was stirred for 1 hour. The suspension mixture was filtrated and the obtained white solid was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL). The organic layer was washed with brine (2 × 25 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (1.2 g) as a yellow powder was purified by column chromatography on silica gel (90g, ethyl acetate/EtOH, 98/2, v/v) to give the compound **90** (0.710 g, 74%).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 298 K): δ ppm = 8.00 (m, 1H, NH); 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH); 7.19-7.41 (m, 46H, HTrt, NH); 5.66 (s, 2H, NH₂); 5.39 (s, 2H, NH₂); 5.15 (s, 2H, NH₂); 3.02-3.22 (m, 4H, 2×CH₂CO); 2.33-3.06 (m, 9 H, CHCO, CH₂(Lys), 3×CH₂S); 1.43 (s, 9 H, 3×CH₃(Boc)); 1.22-1.36 (m, 6H, 3×CH₂(Lys)).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 172.20, 172.74, 173.03 (7×CO); 145.54 (3×C(C₆H₅)); 127.85, 129.05, 130.41 (3×C(C₆H₅)); 67.47 (3×CH_α); 56.59 (CHCO); 53.16 (2×CH₂CO); 52.96 (CH₂(Lys)); 34.22 (3×CH₂S); 28.57 (3×CH₂(Lys)); 24.14, 24.44 (3×CH₃(Boc)).

ES-MS: Calculated mass: 1394.57; found: (ES-) 1393.2 [M-H]⁻; (ES+) 1394 [M+H]⁺, 1417 [M+Na]⁺; 1433 [M+K]⁺.

Compound 91: N^2,N^2 -bis[2-[[[(1R)-2-amino-1-(mercaptomethyl)-2-oxoethyl]amino]-2-oxoethyl]-L-lysyl-L-cysteinamide



Chemical Formula: $C_{19}H_{36}N_8O_6S_3$
MW: 568.73 g.mol⁻¹

To a solution of compound **90** (0.250 g, 0.179 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (7.5 mL), TFA (0.686 mL, 8.96 mmol, 50 eq.) and Et_3SiH (0.17 mL, 1.07 mmol, 6 eq.) were added. The reaction mixture was stirred one hour at room temperature under argon. After evaporation under reduced pressure, the resulting residue was purified on RP-HPLC (A/B) to give the compound **91** (0.089 g, 87%) as a white solid after lyophilisation.

¹H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ = 4.51 (dd, J = 5.0 and 7.3 Hz, 2H, 2 \times CH α); 4.47 (dd, J = 5.3 and 7.9 Hz, 1H, CH α); 3.53 and 3.66 (AB, J_{AB} = 17.2 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$ CO); 3.53 (dd, J = 6.8 and 8.1 Hz, 1H, CHCO); 2.83-3.99 (m, 8H, 3 \times CH $_2$ S and CH $_2$ (lys)); 1.64-1.77 (m, 4H, 2 \times CH $_2$ (lys)); 1.31-1.50 (m, 2H, CH $_2$ (lys))

¹³C NMR (D_2O , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 177.64, 177.21, 176.84 (CO); 68.06 (CHCO); 58.39 (CH α); 58.29 (2 \times CH α); 58.06 (2 \times CH $_2$ CO); 42.19 (NCH $_2$ (Lys)); 31.52 (CH $_2$); 29.56 CH $_2$) 28.51 (2 \times CH $_2$ S); 28.27 (CH $_2$ S); 25.67 (CH $_2$).

Analytical RP-HPLC: purity = 100%, R_t = 14.2 min (linear gradient: from 95/5 A/B to 80/20 A/B in 15 min and 5 min at 80/20).

ES-MS: Calculated mass: 568.19; found: 569.63 [M+H]⁺; 591.3 [M+Na]⁺

II.4) Assemblage des glycoconjugués

II.4.a - General procedures

Assembly of the modified sugar targeting part and the tripodal chelating unit by disulphide bridge: Procedure A

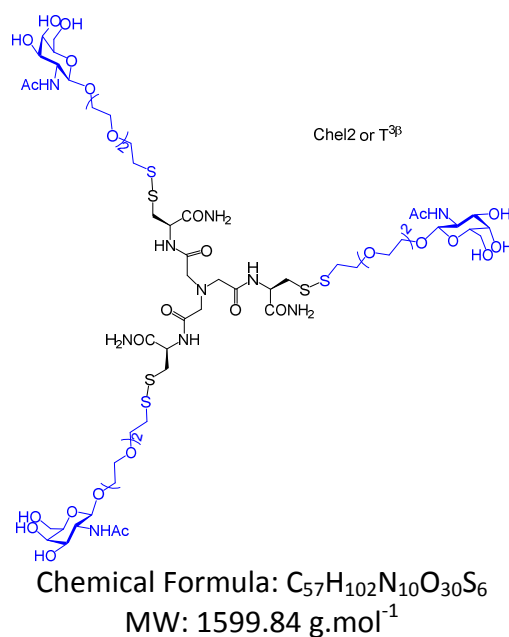
Adapted from the procedure described by Witt.³⁰⁶

A solution of the tripodal pseudopeptide in degassed H_2O (67 mL/mmol, pH 4) was added dropwise to a solution of the pegylated GalNAc (3.5 eq.) in degassed THF (100 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3-4 hours and monitored by analytical RP-HPLC. After concentration *in vacuo*, the resulting crude product was purified by preparative C18 RP-HPLC (H_2O/CH_3CN : from 100/0 to 50/50 for 16 min and 50/50 for 5 min) followed by lyophilisation to give the desired compound as a white solid.

Labelling with the sulfo-cyanine5: Procedure B

To a solution of glycoconjugate in anhydrous acetonitrile (1.5 mL/ μ mol) under inert atmosphere, were added DIPEA (until pH8-9) and sulfo-cyanine 5 (1.2 eq.). The reaction mixture was stirred 2 hours at room temperature without light and the reaction was monitored by analytical RP-HPLC (purosphere, eau/acetonitrile, 0 to 50% acetonitrile in 16 minutes and then 5 minutes at 50% acetonitrile). After evaporation under reduced pressure, the crude product was purified by RP-HPLC to obtain the fluorescent labelled glycoconjugate as a dark blue powder after lyophilisation.

Compound 92 and 93: Chel2/T³ β and T¹ β



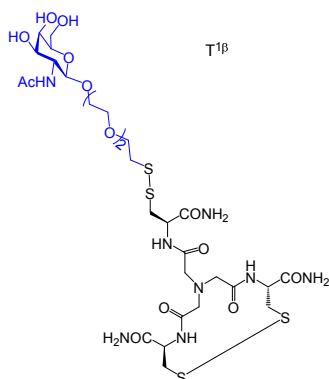
The tripodal chelating unit **82** (25 mg, 0.050 mmol) was functionalized with the modified GalNAc **59** (84 mg, 0.176 mmol, 3.5eq.) following procedure A to obtain the compound **92** (53 mg, 66%) which was purified by preparative C18 RP-HPLC (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.74 (dd, J = 4.0 Hz and 10.0 Hz, 3H, 3 \times CH α); 4.52 (d, J = 8.4 Hz, 3H, 3 \times H-1); 4.00-4.05 (m, 3H, 3 \times H-3); 3.94 (d, J = 3.2 Hz, 3H, 3 \times H-4); 3.89-3.92 (m, 3H, 3 \times H-2); 3.80-3.83 (m, 39H, 15 \times OCH₂, 3 \times H5, 6 \times H6); 3.57 (s, 6H, 3 \times CH₂CO); 3.04 and 3.30 (ABX, J_{AX} = 4.4, J_{BX} = 10.0 Hz, J_{AB} = 14.0 Hz, 6H, 3 \times CH₂); 2.99 (t, J = 6.0, 6H, 3 \times CH₂SS); 2.05 (s, 9H, 3 \times NHCOCH₃).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 178.57, 178.38, 177.45 (3 \times CO); 104.26 (3 \times C-1); 77.86, 73.86, 72.48, 72.21, 72.13, 71.58, 71.10 (3 \times C-3, 3 \times C-5, 15 \times CH₂O, 3 \times C-6); 70.56 (3 \times C-4); 63.70 (3 \times CH₂CO); 55.14 (3 \times C-2, 3 \times CH α); 41.74 (3 \times CH₂ β); 39.92 (3 \times CH₂S-S); 24.97 (3 \times CH₃).

ES-MS: calculated mass: 1598.51; found m/z: 1599.2 [M+H]⁺; 1621.5 [M+Na]⁺; 1396.2 [M-GalNAc+H]⁺ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 96.2%, Rt = 6.3 min (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).



Chemical Formula: C₂₉H₅₀N₈O₁₄S₄
MW: 863.00 g.mol⁻¹

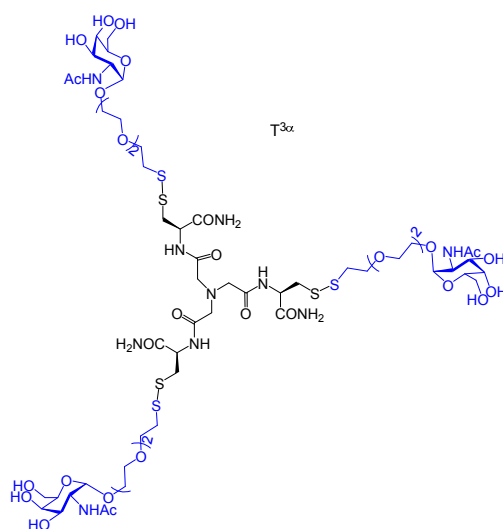
The monovalent glycoconjugate **93** (2.7 mg, 6%) was formed as a by-product of the coupling reaction.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.75 (m, 3H, CH_α); 4.54 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1); 3.8-3.95 (m, 1H, H-3); 3.7-3.9 (m, 2H, H-4, H-2); 3.77-3.83 (m, 2H, H-6); 3.73-3.38 (m, 19H, 6×CH₂, H-5, 3×CH₂CO); 2.96 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂SS); 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃).

ES-MS: calculated mass: 862.23; found m/z: 885.3 [M+Na]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 97.5%, Rt = 7.4 min (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

Compound 94: T^{3α}



Chemical Formula: C₅₇H₁₀₂N₁₀O₃₀S₆
MW: 1599.84 g.mol⁻¹

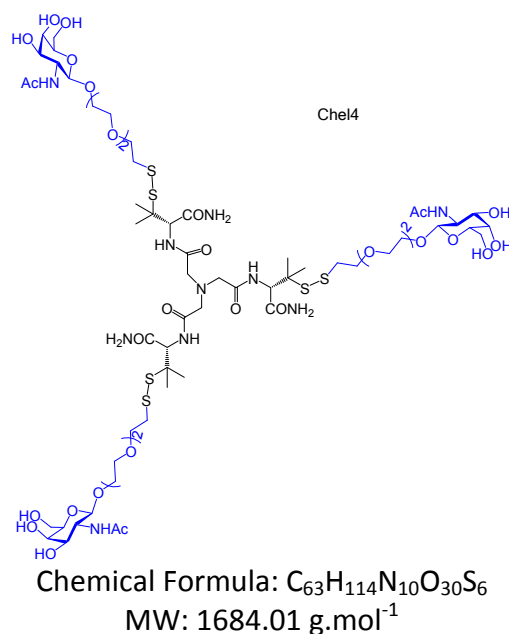
The tripodal chelating unit **82** (35.6 mg, 0.072 mmol) was functionalized with the modified GalNAc **65** (120 mg, 0.250 mmol, 3.5eq.) following procedure A to obtain the compound **94** (55.8 mg, 49 %) which was purified by preparative C18 RP-HPLC (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.94 (d, J = 4.0 Hz, 3H, 3×H-1); 4.72-4.75 (m, 6H, 3×CH_α); 4.21 (dd, J = 3.8 Hz and 11.2 Hz, 3H, 3×H-3); 3.98-4.02 (m, 3H, 3×H-4); 3.95 (m, 3H, 3×H-2); 3.75-3.88 (m, 36H, 15×CH₂O, 6×H-6); 3.65-3.70 (m, 3H, 3×H-5); 3.58 (s, 6H, 3×CH₂CO); 3.31 (m, 6H, 3×CH₂); 2.97-3.07 (m, 6H, 3×CH₂SS); 2.05 (s, 9H, 3×NHCOCH₃).

ES-MS: calculated mass: 1599.0; found m/z: 1600.2 [M+H]⁺, 1622.3 [M+Na]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 98%, Rt = 9.8 min (chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 30/70 in 15 min, 30/70 for 5 min)

Compound 95: Chel4



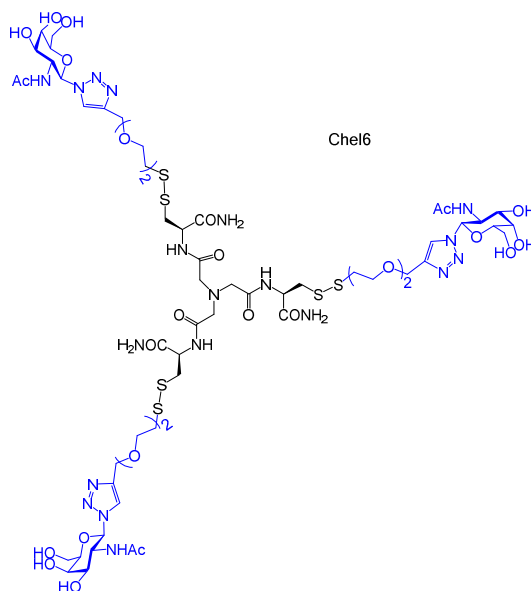
The tripodal chelating unit **87** (85 mg, 0.146 mmol) was functionalized with the modified GalNAc **59** (245 mg, 0.512 mmol, 3.5eq.) following procedure A to obtain the compound **95** (92 mg, 37%) which was purified by preparative C18 reversed-phase HPLC (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.60 (s, 3H, 3×CH_α); 4.53 (d, J = 8.4 Hz, 3H, 3×H-1); 4.00-4.05 (m, 3H, 3×H-3); 3.90-3.96 (m, 6H, 3×H-4, 3×H-2); 3.68-3.86 (m, 39H, 15×OCH₂, 3×H5, 6×H-6); 3.54 (d, J = 5.6 Hz, 6H 3×CH₂CO); 2.98 (td, J = 2.8 and 6.0 Hz, 6H, 3×CH₂SS); 2.07 (s, 9H, 3×CH₃); 1.53 (s, 9H, 3×CH₃); 1.43 (s, 9H, 3×NHCOCH₃).

ES-MS: calculated mass: 1682.60; found m/z: : 1683.3 [M+H]⁺; 1705.7 [M+Na]⁺; 864 [M+2Na]⁺

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 100%, Rt = 14.5 min (chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 30/70 in 15 min, 30/70 for 5 min)

Compound 96: Chel6



Chemical Formula: C₆₀H₉₉N₁₉O₂₇S₆
MW: 1710.92 g.mol⁻¹

The tripodal chelating unit **82** (13.8 mg, 0.028 mmol) was functionalized with the modified GalNAc **80** (50 mg, 0.097 mmol, 3.5eq.) following procedure A to obtain the compound **96** (22 mg, 46 %) which was purified by preparative C18 reversed-phase HPLC (Chromolith, CH₃CN/eau, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

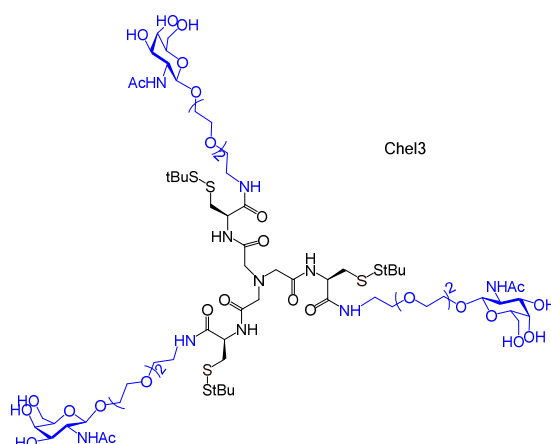
¹H NMR (D₂O, 500 MHz, 298 K): δ ppm = 8.29 (s, 3H, 3×CH triazole); 5.78 (d, J = 9.5 Hz, 3H, 3×H-1); 4.67-4.73 (m, 9H, CH_α, CH₂-triazole); 4.43 (t, J = 10.2 Hz, 3H, H-2); 4.10 (d, J = 3.5 Hz, 3H, H-4); 3.98-4.02 (m, 6H, H-3, H-5); 3.82-3.87 (m, 6H, H-6); 3.77 (t, J = 6.0 Hz, 6H, 3×CH₂O); 3.68 (s, 12H, 6×CH₂O); 3.63 (s broad, 3H, 3×CH); 3.54 (d, 6H, 3×CH₂CO); 2.88-3.01 (m, 9H, 3×CH₂SS, 3×CH₂-CH); 1.81 (s, 9H, 3×COCH₃).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 174.25 (2×CO); 144.11 (CH-Pyr); 123.65 (C-triazole); 86.92(CH, C-1); 78.34 (C-4); 70.62 (C-5); 69.23 (C-6); 68.69 (CH₂); 68.25 (CH₂); 67.64 (C-3); 62.84 (CH₂O); 60.86 (CH₂O); 52.01 (C-2); 37.23 (CH₂-S); 21.65 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 1709.53; found m/z: 1709.8 [M+H]⁺; 1732.3 [M+Na]⁺; 1748.3 [M+K]⁺; 885 [M+Na+K]²⁺; 878 [M+2Na]²⁺.

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 98.2%, Rt = 9.4 min (Chromolith, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min)

Compound 97: Chel3



Chemical Formula: $C_{69}H_{126}N_{10}O_{30}S_6$
MW: $1768.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of the tripodal unit **88** (48 mg, 0.10 mmol) in acetonitrile (1 mL) and DMF (0.2 mL), a solution of the modified GalNAc **74** (157 mg, 0.35 mmol, 3.5eq.) in acetonitrile (2 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 6 hours at room temperature and monitored by analytical C18 RP-HPLC (Chromolith, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{eau}$, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min). After evaporation under reduced pressure, the crude residue was purified by preparative C18 RP-HPLC (Chromolith, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min) to obtain the compound **97** (23 mg, 16 %).

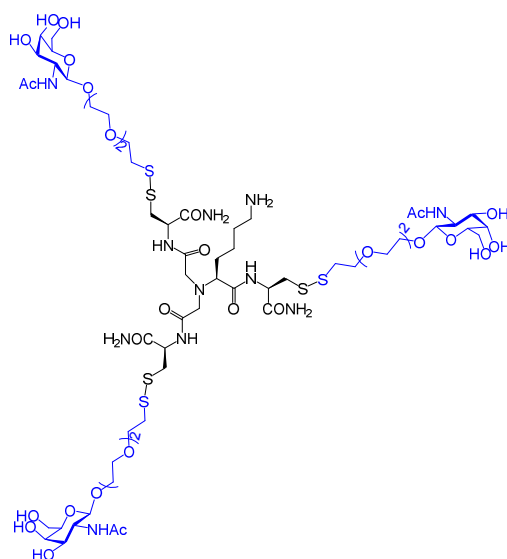
^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.72-4.74 (m, 3H, $3\times\text{CH}\alpha$); 4.52 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 3H, $3\times\text{H-1}$); 4.02-4.07 (m, 3H, $3\times\text{H-3}$); 3.96 (d, $J = 3.2 \text{ Hz}$, 3H, $3\times\text{H-4}$); 3.65-3.87 (m, 42H, $15\times\text{OCH}_2$, $3\times\text{H-5}$, $6\times\text{H-6}$, $3\times\text{H-2}$); 3.57 (s, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{CO}$); 3.44-3.50 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.11-3.27 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{-S}$); 2.07 (s, 9H, $3\times\text{NHCOCH}_3$); 1.38 (s, 9H, $3\times\text{SC}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz, 298 K) : δ ppm = 174.7 (CO-NH), 172.9, 171.7 (CO); 101.6 (C-1); 75.1 (C-5); 71.1 (C-3); 69.8, 69.8, 69.6, 68.9, 68.8 (CH_2CO); 67.8 (C-4); 61.0 (C-6); 58.0 (CH_2CO); 52.4 (C-2); 48.4 ($\text{CH}\alpha$); 41.0 ($\text{CH}\beta$); 39.2 (CNH); 29.1 ($\text{CH}_3\text{-tBu}$); 22.3 (NHCOCH_3).

ES-MS: calculated mass: 1766.70; found m/z : 1768.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 1789.5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 100%, $R_t = 14.5 \text{ min}$ (Chromolith, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

Compound 98



Chemical Formula: $C_{61}H_{111}N_{11}O_{30}S_6$
MW: $1670.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The tripodal chelating unit **91** (18.5 mg, 0.033 mmol) was functionalized with the modified GalNAc **59** (55 mg, 0.115 mmol, 3.5eq.) to obtain the compound **98** (23.5 mg, 43%) which was purified by preparative C18 RP-HPLC (Purosphère, CH₃CN/eau, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

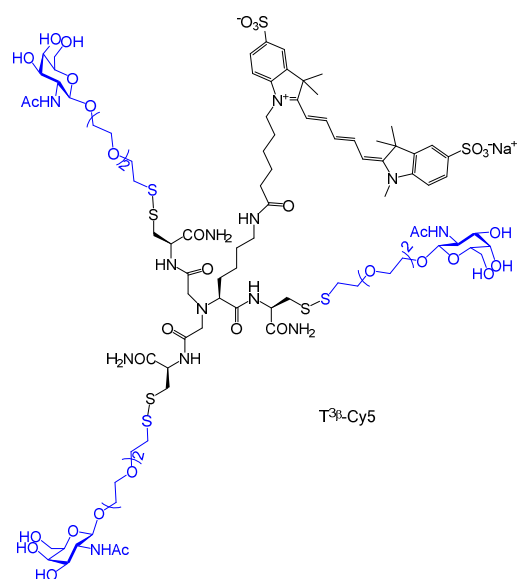
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.65-4.77 (s, 3H, 3×CH α); 4.53 (d, J = 8.5 Hz, 3H, 3×H-1); 3.92-3.95 (m, 3H, 3×H-3); 3.81-3.86 (m, 6H, 3×H-4, 3×H-2); 3.59-3.77 (m, 43H, 15×CH₂, 6×H-6, 3×H-5, 2×CH₂CO); 2.91-3.49 (m, 9H, CH₂(Lys), 3×CH₂S, CHCO); 2.88 (t, J = 6.0 Hz, 6H, 3×CH₂-S); 1.95 (s, 9H, 3×NHCOCH₃); 1.56-1.76 (m, 4H, 2×CH₂(Lys)); 1.32-1.47 (m, 2H, CH₂(Lys)).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 178 (CO); 104.46 (C1); 78.09, 74.17, 71.95, 71.52, 70.80 (C-3, C-4, C-5, C6, OCH₂); 67.31 (CHCO); 64.04 (CH₂CO); 55.43 (C-2, CH α); 42.48 (CH₂); 42.26 (NCH₂(Lys)); 40.20 (CH₂SS); 30.48 (CH₂); 25.31 (CH₂, CH₃).

ES-MS: calculated mass: 1669.58 ; found m/z: 1692.3 [M+Na]⁺; 1670.3 [M+H]⁺, 1467.2 [M-GalNAc+H]⁺; 1264.3 [M-2GalNAc+H]⁺; 1061.3 [M-3GalNAc+H]⁺; 857.8 [M+2Na]⁺; 846.8 [M+Na+H]²⁺; 835.7 [M+2H]²⁺ (sugar fragmentation -203 not seen in NMR and RP-HPLC).

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 99.6%, Rt = 8 min (Purosphère, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

Compound 99: T^{3β}-Cy5



Chemical Formula: C₉₃H₁₄₆N₁₃O₃₇S₈

MW: 2294.73 g.mol⁻¹

The glycoconjugate **98** (3 mg, 1.7 μmol) was labelled with the sulfo-cyanine5 (1.3 mg, 2.04 μmol, 1.2 eq) to obtain the product **99** (1.1 mg, 28%)

ES-MS: calculated mass: 2292.77; found m/z: (ES-) 2293.4 [M]⁻; 1146.3 [M-H]²⁻

Analytical C18 RP-HPLC: purity= 100%, Rt = 9.5 min (Purosphère, CH₃CN/H₂O, 0/100 to 50/50 in 16 min, 50/50 for 5 min).

III - Cytométrie en flux

III.1) Généralités

Cell cultured equipment (cell culture medium, buffers, enzymes, serum and antibiotics) were purchase at Life Technologies and Eurobio. Cell lines were purchase from ATCC: HepG2/C3A (ATCC® CRL-10741™) and HeLa (ATCC® CCL-2™). Supplies were purchase from Greiner Bio One, Dominique Dutscher and Becton Dickinson. Reagents and solvents were purchase from Sigma Aldrich and Roche. Cell culture was performed in sterile conditions under laminar flow.

HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing L-glutamine supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and amphotericin B 0.25 µg/mL. HeLa cells were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and amphotericin B 0.25 µg/mL. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. They were plated at 3 to 4 × 10⁴ cells/cm² on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm). Cells were counted and their viability was evaluated after their exposition to Trypan Blue dye using a TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad).

Cells were suspended in Gibco® cell dissociation buffer (enzyme-free solution of salts, chelating agents (EDTA)), and cell-conditioning agents in calcium-free and magnesium-free phosphate-buffered saline (PBS)) for flow cytometry measurements.

III.2) Culture cellulaire

The cell line HepG2 was preserved in liquid nitrogen (-80°C) in DMEM supplemented HepG2 culture medium (FBS and antibiotics) containing 10% DMSO as cryoprotectant to prevent formation of crystals which otherwise lyse the cells. Frozen cells were directly incubated in a 37°C bath. After complete defrosting (1 mL), cells were centrifuged (2 min, 1000 rpm) to pellet the cells, and washed twice with cell culture medium (2 mL). Then, cells were plated at 5 × 10⁴ cells /cm² (on round plastic tissue culture dishes 60 × 15 mm) and incubated at 37°C, 5% CO₂. This incubation at high concentration is performed during 4 days in order to let them go back to a dynamic growth. Then cells were cultured on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm).

HepG2 cells were passaged every 2-3 days at 80-90% confluency using a 0.25% Trypsin-EDTA solution. Cells were washed with phosphate buffer saline 1× (PBS: 3 × 10 mL) and then treated with a 0.25% Trypsin-EDTA (2 mM) solution (2 mL, 3-4 minutes) to detach them from the support. The trypsin was inactivated by adding HepG2 culture medium (1 mL) and the detached cells were collected in a 15 mL centrifugation tube. Cells were centrifuged (3 minutes, 1000 rpm) and washed with culture medium (2 × 2 mL). Eventually, cells were plated at 3 to 4 × 10⁴ cells/cm² on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm).

Some cells were frozen after 4-5 passages to conserve a pool of young cells. They were treated with 0.25% Trypsin-EDTA solution as explained above and diluted at 2-4.10⁶ cells/mL in a HepG2 culture medium supplemented with 10% DMSO. This suspension was aliquoted in 1 mL cryotubes and frozen at -80°C.

Cells used for Flow Cytometry experiments were between the 3rd and the 12th passage.

The HeLa cells were cultured as described for HepG2 cells, except for the use of 0.25% Trypsin solution without EDTA for passages.

III.3) Incubation des cellules et expériences de cytométrie en flux

HepG2 or HeLa cells were seeded in 12-well plates with the same methodology explained above, at seeding density of 1.5×10^5 cells/well ($3.5 \text{ cm}^2/\text{well}$; $4.3 \text{ cells}/\text{cm}^2$) 24 hours before addition of the glycoconjugates.

The culture medium was sucked up and cells were washed twice with cold PBS before incubation in cold HepG2 cell culture medium (total incubation volume/well = 500 μL), supplemented with different concentrations of glycoconjugates (and potentially their competitors) for 1 hour at regular culture conditions. For competitive uptake experiments, labelled glycoconjugates and their unlabeled competitor were co-incubated and introduced in the well at the same time: after the filling of the wells with cold culture medium, GalNac or unlabeled glycoconjugates (50 to 150 μL diluted in PBS) were added in the wells to the cell medium, immediately followed by the addition of the labelled glycoconjugate (50 μL in PBS).

After one hour, HepG2 cells were washed with PBS ($3 \times 10 \text{ mL}$) and treated with 0.25% Trypsin-EDTA solution as before. This allows both to detach the cells and strip them from the surface-bound compounds. Each well was separately transferred in microtubes (polypropylene to avoid adhesion) and centrifuged (3 min, 5000 rpm) to pellet the cells that were then washed with PBS (200 μL) before suspending in fresh cell dissociation buffer (100 μL). The cell suspensions were put on ice and analyzed using a Beckman Coulter FACsCalibur flow cytometer with 488 and 635 nm laser excitation wavelengths. Each batch of cells was filtrated and diluted with cell dissociation buffer (100 μL) before measurement in order to avoid aggregation of these highly adhesive cells. Cell suspensions in 200 μL of cell dissociation buffer, an average of 5×10^5 cells/mL, were analyzed at 60 $\mu\text{L}/\text{min}$. This low concentration and high speed rate of analysis help to prevent aggregation in the cytometer. Fluorescence was collected with a FL4-H detector (661 nm). Gating during flow analysis was based on normalized fluorescence of untreated cells. An average of 20,000 healthy cells (gated events) was analyzed for each experimental condition, and the mean fluorescence of this population was taken as the background. The uptake of a compound into cells was evaluated by comparing the shift in Mean Fluorescence Intensity (MFI) between untreated cells (background fluorescence) and treated cells to evaluate cellular internalization of the compound. This was repeated for each treatment as a function of glycoconjugate's chemical composition, concentration, and co-incubated competitor's chemical composition and concentration. The interpretation of the collected data is performed thanks to the Cell Quest Pro software. Further analysis, EC_{50} and IC_{50} calculations were done with Origin[®] 9 software. Each EC_{50} and IC_{50} was evaluated in at least two independent experiments.

Example for the analysis of HepG2: The forward and side scatter gate R1 was set to count at least 20,000 intact cells of each sample. The histogram below depicts an overlay of the log of fluorescence intensity at 661 nm of untreated (violet) and treated HepG2 cells

(green). The uptake of a compound into cells was evaluated by comparing the shift in mean fluorescence intensity (MFI) between untreated cells (background fluorescence) and treated cells (figure 128).

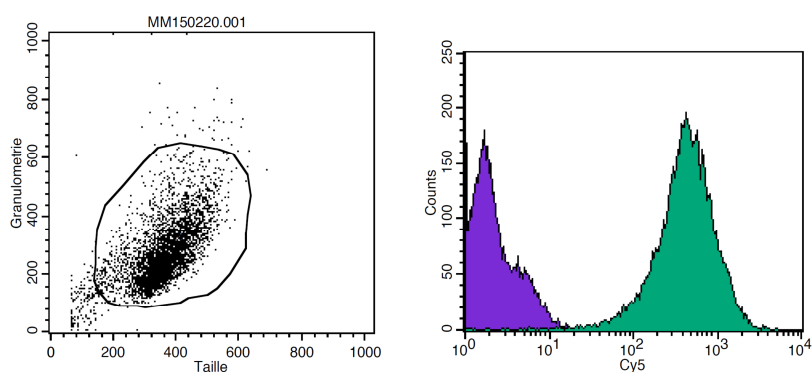


Figure 128 : Uptake of compound CP^{3B}-Cy5 into HepG2 cells analysed by flow cytometry. All experiments were analysed in the same way. The dot plot (left) shows the granulometry as a function of the size of cells; healthy cells are selected in the gate. The histogram (right) shows the shift in log fluorescence intensity between untreated (purple) and treated cells (green) after incubation with CP^{3B}-Cy5 (15 μ M).

Références bibliographiques

- (1) Wang, Y.; Du, H.; Zhai, G.: Recent advances in active hepatic targeting drug delivery system. *Current Drug Targets* **2014**, *15*, 573-599.
- (2) Poelstra, K.; Prakash, J.; Beljaars, L.: Drug targeting to the diseased liver. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 188-197.
- (3) Ashwell, G.; Morell, A. G.: Membrane glycoproteins and recognition phenomena. *Trends in Biochemical Sciences* **1977**, *2*, 76-78.
- (4) Spiess, M.; Lodish, H. F.: Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 6465-6469.
- (5) D'Souza, A. A.; Devarajan, P. V.: Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — Strategies and applications. *Journal of Controlled Release* **2015**, *203*, 126-139.
- (6) Lepenies, B.; Lee, J.; Sonkaria, S.: Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 1271-1281.
- (7) Lepenies, B.; Yin, J.; Seeberger, P. H.: Applications of synthetic carbohydrates to chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 404-411.
- (8) Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S.: Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 525-561.
- (9) Wittmann, V.; Pieters, R. J.: Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4492-4503.
- (10) Renaudet, O.; Roy, R.: Multivalent scaffolds in glycoscience: an overview. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4515-4517.
- (11) Patil, M.; Sheth, K. A.; Krishnamurthy, A. C.; Devarbhavi, H.: A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, *3*, 321-336.
- (12) Pujol, A. M.; Cuillel, M.; Jullien, A.-S.; Lebrun, C.; Cassio, D.; Mintz, E.; Gateau, C.; Delangle, P.: A Sulfur Tripod Glycoconjugate that Releases a High-Affinity Copper Chelator in Hepatocytes. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 7445-7448.
- (13) Pujol, A. M.; Cuillel, M.; Renaudet, O.; Lebrun, C.; Charbonnier, P.; Cassio, D.; Gateau, C.; Dumy, P.; Mintz, E.; Delangle, P.: Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 286-296.
- (14) Pujol, A.: Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre (I) pour les maladies de type Wilson. Université de Grenoble, 2010.
- (15) Tanzi, R. E.; Petrukhin, K.; Chernov, I.; Pellequer, J. L.; Wasco, W.; Ross, B.; Romano, D. M.; Parano, E.; Pavone, L.; Brzustowicz, L. M.; Devoto, M.; Peppercorn, J.; Bush, A. I.; Sternlieb, I.; Pirastu, M.; Gusella, J. F.; Evgrafov, O.; Penchaszadeh, G. K.; Honig, B.; Edelman, I. S.; Soares, M. B.; Scheinberg, I. H.; Gilliam, T. C.: The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genetics* **1993**, *5*, 344-350.
- (16) Abdel Ghaffar, T.; Elsayed, S.; Elnaghy, S.; Shadeed, A.; Elsobky, E.; Schmidt, H.: Phenotypic and Genetic Characterization of a Cohort of Pediatric Wilson Disease Patients. *BMC Pediatrics* **2011**, *11*, 56.
- (17) Wilson, S. A. K.: Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* **1912**, *34*, 295-507.
- (18) Walshe, J. M.: History of Wilson's disease: 1912 to 2000. *Movement Disorders* **2006**, *21*, 142-147.
- (19) Bull, P. C.; Thomas, G. R.; Rommens, J. M.; Forbes, J. R.; Cox, D. W.: The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics* **1993**, *5*, 327-337.

- (20) Yamaguchi, Y.; Heiny, M. E.; Gitlin, J. D.: Isolation and Characterization of a Human Liver cDNA as a Candidate Gene for Wilson Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, *197*, 271-277.
- (21) Duclos-Vallée, J.-C.; Ichaï, P.; Chapuis, P.; Misrahi, M.; Woimant, F.: La maladie de Wilson. *La revue du praticien*, 2006.
- (22) Delangle, P.; Mintz, E.: Chelation therapy in Wilson's disease: from d-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(i) chelators. *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 6359-6370.
- (23) Tegoni, M.; Valensin, D.; Toso, L.; Remelli, M.: Copper Chelators: Chemical Properties and Bio-medical Applications. *Current Medicinal Chemistry* **2014**, *21*, 3785-3818.
- (24) Barnard, P.; Beck, M.; Beraldo, H.; Berners-Price, S.; Biot, C.; Bonnet, C.; Boros, E.; Cohen, S.; Coogan, M.; deBoer-Maggard, T.; Delangle, P.; DeToma, A.; Duncan, D.; Ferreira, C.; Gateau, C.; Gottschaldt, M.; Hambley, T.; Ijotun, O.; Jones, M.; Klein, A.; Korshavn, K.; Lapi, S.; Lim, M. H.; Marquez, B.; Martin, D.; Mascharak, P.; Mikata, Y.; Mintz, E.; Mu, C.; Navarro, M.; New, E.; O'Neill, E.; Pithadia, A.; Puerta, D.; Storr, T.; Toth, e.; Pinto Viera, R.; Walsby, C.: Ligand design in medicinal inorganic chemistry. John Wiley & Sons, **2014**.
- (25) Mufti, A. R.; Burstein, E.; Duckett, C. S.: XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *463*, 168-174.
- (26) Gaggelli, E.; Kozłowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G.: Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 1995-2044.
- (27) Collins, J. F.; Prohaska, J. R.; Knutson, M. D.: Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* **2010**, *68*, 133-147.
- (28) Gourdon, P.; Liu, X.-Y.; Skjorringe, T.; Morth, J. P.; Moller, L. B.; Pedersen, B. P.; Nissen, P.: Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* **2011**, *475*, 59-64.
- (29) Liver, E. A. f. t. S. o. t.: EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology* **2012**, *56*, 671-685.
- (30) Ferenci, P.: Diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2004**, *19*, 157-165.
- (31) Roberts, E. A.; Schilsky, M. L.: Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* **2008**, *47*, 2089-2111.
- (32) Schilsky, M. L.: Long-term Outcome for Wilson Disease: 85% Good. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2014**, *12*, 690-691.
- (33) Roberts, E. A.; Schilsky, M. L.: A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology* **2003**, *37*, 1475-1492.
- (34) Ala, A.; Walker, A. P.; Ashkan, K.; Dooley, J. S.; Schilsky, M. L.: Wilson's disease. *The Lancet*, *369*, 397-408.
- (35) Ferenci, P.; Członkowska, A.; Merle, U.; Ferenc, S.; Gromadzka, G.; Yurdaydin, C.; Vogel, W.; Bruha, R.; Schmidt, H. T.; Stremmel, W.: Late-Onset Wilson's Disease. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1294-1298.
- (36) Ferenci, P.: Pathophysiology and Clinical Features of Wilson Disease. *Metabolic Brain Disease* **2004**, *19*, 229-239.
- (37) Bugbee, D.; Davies, L.; Kenney, S.; Cox, D. W.: Wilson Disease Mutation Database.
- (38) Ferenci, P.; Caca, K.; Loudianos, G.; Mieli-Vergani, G.; Tanner, S.; Sternlieb, I.; Schilsky, M.; Cox, D.; Berr, F.: Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease 1. *Liver International* **2003**, *23*, 139-142.
- (39) Wiggelinkhuizen, M.; Tilanus, M. E. C.; Bollen, C. W.; Houwen, R. H. J.: Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *29*, 947-958.
- (40) Sarkar, B.: Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2535-2544.
- (41) Hoogenraad, T. U.: Paradigm shift in treatment of Wilson's disease: Zinc therapy now treatment of choice. *Brain and Development*, *28*, 141-146.

- (42) Weiss, K. H.; Gotthardt, D. N.; Klemm, D.; Merle, U.; Ferenci-Foerster, D.; Schaefer, M.; Ferenci, P.; Stremmel, W.: Zinc Monotherapy Is Not as Effective as Chelating Agents in Treatment of Wilson Disease. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1189-1198.e1.
- (43) Terada, K.; Sugiyama, T.: The Long-Evans Cinnamon rat: An animal model for Wilson's disease. *Pediatrics International* **1999**, *41*, 414-418.
- (44) Malhi, H.; Irani, A. N.; Volenberg, I.; Schilsky, M. L.; Gupta, S.: Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology*, *122*, 438-447.
- (45) Meng, Y.; Miyoshi, I.; Hirabayashi, M.; Su, M.; Mototani, Y.; Okamura, T.; Terada, K.; Ueda, M.; Enomoto, K.; Sugiyama, T.; Kasai, N.: Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2004**, *1690*, 208-219.
- (46) Terada, K.; Nakako, T.; Yang, X.-L.; Iida, M.; Aiba, N.; Minamiya, Y.; Nakai, M.; Sakaki, T.; Miura, N.; Sugiyama, T.: Restoration of Holoceruloplasmin Synthesis in LEC Rat after Infusion of Recombinant Adenovirus Bearing WND cDNA. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 1815-1820.
- (47) Roybal, J. L.; Endo, M.; Radu, A.; Gray, L.; Todorow, C. A.; Zoltick, P. W.; Lutsenko, S.; Flake, A. W.: Early gestational gene transfer with targeted ATP7B expression in the liver improves phenotype in a murine model of Wilson's disease. *Gene Therapy* **2012**, *19*, 1085-1094.
- (48) Pearson, R. G.: Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 3533-3539.
- (49) Rubino, J. T.; Chenkin, M. P.; Keller, M.; Riggs-Gelasco, P.; Franz, K. J.: A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(i)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics* **2011**, *3*, 61-73.
- (50) Rubino, J. T.; Franz, K. J.: Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *107*, 129-143.
- (51) Capdevila, M.; Bofill, R.; Palacios, Ò.; Atrian, S.: State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 46-62.
- (52) Rosenzweig, A. C.: Copper Delivery by Metallochaperone Proteins. *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34*, 119-128.
- (53) Pufahl, R. A.; Singer, C. P.; Peariso, K. L.; Lin, S. J.; Schmidt, P. J.; Fahrni, C. J.; Culotta, V. C.; Penner-Hahn, J. E.; O'Halloran, T. V.: Metal Ion Chaperone Function of the Soluble Cu(I) Receptor Atx1. *Science* **1997**, *278*, 853-856.
- (54) Hung, I. H.; Casareno, R. L. B.; Labesse, G.; Mathews, F. S.; Gitlin, J. D.: HAH1 Is a Copper-binding Protein with Distinct Amino Acid Residues Mediating Copper Homeostasis and Antioxidant Defense. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 1749-1754.
- (55) Wernimont, A. K.; Huffman, D. L.; Lamb, A. L.; O'Halloran, T. V.; Rosenzweig, A. C.: Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nature Structural Molecular Biology* **2000**, *7*, 766-771.
- (56) Rosenzweig, A. C.; Huffman, D. L.; Hou, M. Y.; Wernimont, A. K.; Pufahl, R. A.; O'Halloran, T. V.: Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **1999**, *7*, 605-617.
- (57) Xiao, Z.; Loughlin, F.; George, G. N.; Howlett, G. J.; Wedd, A. G.: C-Terminal Domain of the Membrane Copper Transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerevisiae* Binds Four Cu(I) Ions as a Cuprous-Thiolate Polynuclear Cluster: Sub-femtomolar Cu(I) Affinity of Three Proteins Involved in Copper Trafficking. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 3081-3090.
- (58) Steele, R. A.; Opella, S. J.: Structures of the Reduced and Mercury-Bound Forms of MerP, the Periplasmic Protein from the Bacterial Mercury Detoxification System. *Biochemistry* **1997**, *36*, 6885-6895.
- (59) Seneque, O.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P.: Novel model peptide for Atx1-like metallochaperones. *Chemical Communications* **2004**, 770-771.
- (60) Rousselot-Pailley, P.; Sénèque, O.; Lebrun, C.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P.: Model Peptides Based on the Binding Loop of the Copper Metallochaperone Atx1:

Selectivity of the Consensus Sequence MxCxC for Metal Ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II). *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*, 5510-5520.

(61) Miras, R.; Morin, I.; Jacquin, O.; Cuillel, M.; Guillain, F.; Mintz, E.: Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, 195-205.

(62) Hunziker, P. E.; Sternlieb, I.: Copper metallothionein in patients with hepatic copper overload. *European Journal of Clinical Investigation* **1991**, *21*, 466-471.

(63) Chan, J.; Huang, Z.; Merrifield, M. E.; Salgado, M. T.; Stillman, M. J.: Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *233–234*, 319-339.

(64) Stillman, M. J.: Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews* **1995**, *144*, 461-511.

(65) Presta, A.; A. Fowle, D.; J. Stillman, M.: Structural model of rabbit liver copper metallothionein. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, 977-984.

(66) Faller, P.: Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): reactivity and structure of metal–thiolate clusters*. *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2921-2930.

(67) Gelinsky, M.; Vogler, R.; Vahrenkamp, H.: Tripodal Pseudopeptides with Three Histidine or Cysteine Donors: Synthesis and Zinc Complexation†. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41*, 2560-2564.

(68) Pujol, A. M.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Delangle, P.: A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I). *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6928-6929.

(69) Pujol, A. M.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Delangle, P.: A Series of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Soluble Chelators that are Highly Selective for Copper(I). *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 4418-4428.

(70) Jeunesse, C.; Armspach, D.; Matt, D.: Playing with podands based on cone-shaped cavities. How can a cavity influence the properties of an appended metal centre? *Chemical Communications* **2005**, 5603-5614.

(71) Jullien, A.-S.; Gateau, C.; Kieffer, I.; Testemale, D.; Delangle, P.: X-ray Absorption Spectroscopy Proves the Trigonal-Planar Sulfur-Only Coordination of Copper(I) with High-Affinity Tripodal Pseudopeptides. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 9954-9961.

(72) Jullien, A.-S.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Kieffer, I.; Testemale, D.; Delangle, P.: d-Penicillamine Tripodal Derivatives as Efficient Copper(I) Chelators. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*, 5229-5239.

(73) Vyas, S. P.; Singh, A.; Sihorkar, V.: Ligand-Receptor-Mediated Drug Delivery: An Emerging Paradigm in Cellular Drug Targeting. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2001**, *18*, 76.

(74) Maeda, H.; Sawa, T.; Konno, T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of Controlled Release* **2001**, *74*, 47-61.

(75) Chan, T. M.; Ho, S. K. N.; Tang, C. S. O.; Tse, K. C.; Lam, M. F.; Lai, K. N.; Yung, S.: Pilot study of pegylated interferon-alpha 2a in dialysis patients with chronic hepatitis C virus infection. *Nephrology* **2007**, *12*, 11-17.

(76) Alter, H.: Viral hepatitis. *Hepatology* **2006**, *43*, S230-S234.

(77) Maeda, H.: SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 169-185.

(78) Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P.: Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology* **2014**, *5*.

(79) Di Bisceglie, A. M.; Ghalib, R. H.; Hamzeh, F. M.; Rustgi, V. K.: Early virologic response after peginterferon alpha-2a plus ribavirin or peginterferon alpha-2b plus ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C*. *Journal of Viral Hepatitis* **2007**, *14*, 721-729.

(80) Conner, S. D.; Schmid, S. L.: Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, *422*, 37-44.

(81) Feener, E. P.; King, G. L.: The biochemical and physiological characteristics of receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *29*, 197-213.

- (82) Fallon, R. J.; Schwartz, A. L.: Receptor-mediated delivery of drugs to hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1989**, *4*, 49-63.
- (83) Taylor, M. E.; Drickamer, K.: *Introduction to glycobiology*; Third edition ed., 2011.
- (84) Bareford, L. M.; Swaan, P. W.: Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 748-758.
- (85) van Rossenberg, S. M. W.; Sliedregt-Bol, K. M.; Meeuwenoord, N. J.; van Berkel, T. J. C.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A.; Biessen, E. A. L.: Targeted Lysosome Disruptive Elements for Improvement of Parenchymal Liver Cell-specific Gene Delivery. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 45803-45810.
- (86) Schwartz, A. L.; Fridovich, S. E.; Lodish, H. F.: Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 4230-4237.
- (87) Akinc, A.; Querbes, W.; De, S.; Qin, J.; Frank-Kamenetsky, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Cantley, W. L.; Dorkin, J. R.; Butler, J. S.; Qin, L.; Racie, T.; Sprague, A.; Fava, E.; Zeigerer, A.; Hope, M. J.; Zerial, M.; Sah, D. W. Y.; Fitzgerald, K.; Tracy, M. A.; Manoharan, M.; Koteliansky, V.; Fougere, A. d.; Maier, M. A.: Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Molecular Therapy* **2010**, *18*, 1357-1364.
- (88) Casciola-Rosen, L. A.; Renfrew, C. A.; Hubbard, A. L.: Luminal labeling of rat hepatocyte endocytic compartments. Distribution of several acid hydrolases and membrane receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 11856-11864.
- (89) Clarke, B. L.; Oka, J. A.; Weigel, P. H.: Degradation of asialoglycoproteins mediated by the galactosyl receptor system in isolated hepatocytes. Evidence for two parallel pathways. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 17384-17392.
- (90) Simmons, C. F.; Schwartz, A. L.: Cellular pathways of galactose-terminal ligand movement in a cloned human hepatoma cell line. *Molecular Pharmacology* **1984**, *26*, 509-519.
- (91) Schwartz, A. L.; Marshak-Rothstein, A.; Rup, D.; Lodish, H. F.: Identification and quantification of the rat hepatocyte asialoglycoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78*, 3348-3352.
- (92) Schwartz, A. L.; Rup, D.; Lodish, H. F.: Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 9033-9036.
- (93) Warren, R.; Doyle, D.: Turnover of the surface proteins and the receptor for serum asialoglycoproteins in primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 1346-1355.
- (94) Tanabe, T.; Pricer, W. E.; Ashwell, G.: Subcellular membrane topology and turnover of a rat hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 1038-1043.
- (95) Hubbard, A. L.; Stukenbrok, H.: An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. II. Intracellular fates of the ¹²⁵I-ligands. *The Journal of Cell Biology* **1979**, *83*, 65-81.
- (96) Weigel, P. H.; Yik, J. H. N.: Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1572*, 341-363.
- (97) Schwartz, A. L.; Ashwell, G.: The Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1984**, *16*, 207-233.
- (98) Symens, N.; Méndez-Ardoy, A.; Díaz-MoscOSO, A.; Sánchez-Fernández, E.; Remaut, K.; Demeester, J.; Fernández, J. M. G.; De Smedt, S. C.; Rejman, J.: Efficient Transfection of Hepatocytes Mediated by mRNA Complexed to Galactosylated Cyclodextrins. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1276-1289.
- (99) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J.; for the Cancer Research Campaign Phase I. I. I. C. T. C.: Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin. *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20*, 1668-1676.

- (100) McAbee, D. D.; Jiang, X.: Copper and Zinc Ions Differentially Block Asialoglycoprotein Receptor-mediated Endocytosis in Isolated Rat Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 14750-14758.
- (101) Sharon, N.; Lis, H.: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **2004**, *14*, 53R-62R.
- (102) Sharon, N.; Lis, H.: Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science* **1972**, *177*, 949-959.
- (103) Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N.: What should be called a lectin? *Nature* **1980**, *285*, 66-66.
- (104) Gabius, H.-J.; Kayser, K.: Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. *Diagnostic Pathology* **2014**, *9*, 4.
- (105) Ashwell, G.; Harford, J.: Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. *Annual Review of Biochemistry* **1982**, *51*, 531-554.
- (106) Spiess, M.: The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10009-10018.
- (107) Hudgin, R. L.; Pricer, W. E.; Ashwell, G.; Stockert, R. J.; Morell, A. G.: The Isolation and Properties of a Rabbit Liver Binding Protein Specific for Asialoglycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249*, 5536-5543.
- (108) Stockert, R. J.; Morell, A. G.; Scheinberg, I. H.: Mammalian Hepatic Lectin. *Science* **1974**, *186*, 365-366.
- (109) Lis, H.; Sharon, N.: Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition†. *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 637-674.
- (110) Kawasaki, T.; Ashwell, G.: Isolation and characterization of an avian hepatic binding protein specific for N-acetylglucosamine-terminated glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 6536-6543.
- (111) Drickamer, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 9557-9560.
- (112) Drickamer, K.: Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **1993**, *3*, 393-400.
- (113) Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **2001**, *294*, 2163-2166.
- (114) Feinberg, H.; Guo, Y.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Extended Neck Regions Stabilize Tetramers of the Receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 1327-1335.
- (115) Coombs, P. J.; Graham, S. A.; Drickamer, K.; Taylor, M. E.: Selective Binding of the Scavenger Receptor C-type Lectin to Lewis^x Trisaccharide and Related Glycan Ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 22993-22999.
- (116) Iobst, S. T.; Drickamer, K.: Binding of sugar ligands to Ca²⁺-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 15512-15519.
- (117) Kolatkar, A. R.; Weis, W. I.: Structural Basis of Galactose Recognition by C-type Animal Lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6679-6685.
- (118) Baenziger, J. U.; Maynard, Y.: Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 4607-4613.
- (119) Drickamer, K.; Mamon, J. F.; Binns, G.; Leung, J. O.: Primary structure of the rat liver asialoglycoprotein receptor. Structural evidence for multiple polypeptide species. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 770-778.
- (120) Halberg, D. F.; Wager, R. E.; Farrell, D. C.; Hildreth, J.; Quesenberry, M. S.; Loeb, J. A.; Holland, E. C.; Drickamer, K.: Major and minor forms of the rat liver asialoglycoprotein receptor are independent galactose-binding proteins. Primary structure and glycosylation heterogeneity of minor receptor forms. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 9828-9838.

- (121) Schwartz, A. L.; Rup, D.: Biosynthesis of the human asialoglycoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 11249-11255.
- (122) Bischoff, J.; Lodish, H. F.: Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 11825-11832.
- (123) Bischoff, J.; Libresco, S.; Shia, M. A.; Lodish, H. F.: The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *106*, 1067-1074.
- (124) Shia, M. A.; Lodish, H. F.: The two subunits of the human asialoglycoprotein receptor have different fates when expressed alone in fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 1158-1162.
- (125) Bider, M. D.; Wahlberg, J. M.; Kammerer, R. A.; Spiess, M.: The Oligomerization Domain of the Asialoglycoprotein Receptor Preferentially Forms 2:2 Heterotetramers in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 31996-32001.
- (126) Khorev, O.; Stokmaier, D.; Schwardt, O.; Cutting, B.; Ernst, B.: Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 5216-5231.
- (127) Meier, M.; Bider, M. D.; Malashkevich, V. N.; Spiess, M.; Burkhard, P.: Crystal Structure of the Carbohydrate Recognition Domain of the H1 Subunit of the Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *300*, 857-865.
- (128) Liu, J.; Zheng, Q.; Deng, Y.; Cheng, C.-S.; Kallenbach, N. R.; Lu, M.: A seven-helix coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 15457-15462.
- (129) Lee, R. T.; Lee, Y. C.: Preparation of a high-affinity photolabeling reagent for the Gal/GalNAc lectin of mammalian liver: demonstration of galactose-combining sites on each subunit of rabbit hepatic lectin. *Biochemistry* **1986**, *25*, 6835-6841.
- (130) Lee, R. T.; Lee, Y. C.: Affinity labeling of the galactose/N-acetylgalactosamine-specific receptor of rat hepatocytes: preferential labeling of one of the subunits. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6320-6329.
- (131) Hardy, M. R.; Townsend, R. R.; Parkhurst, S. M.; Lee, Y. C.: Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry* **1985**, *24*, 22-28.
- (132) Weis, W. I.; Kahn, R.; Fourme, R.; Drickamer, K.; Hendrickson, W. A.: Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* **1991**, *254*, 1608-1615.
- (133) Weis, W. I.; Drickamer, K.; Hendrickson, W. A.: Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **1992**, *360*, 127-134.
- (134) Ng, K. K. S.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Structural Analysis of Monosaccharide Recognition by Rat Liver Mannose-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 663-674.
- (135) Fournier, T.; Medjoubi-N, N.; Porquet, D.: Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2000**, *1482*, 157-171.
- (136) Baenziger, J. U.; Fiete, D.: Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 789-795.
- (137) Endo, M.; Suzuki, K.; Schmid, K.; Fournet, B.; Karamanos, Y.; Montreuil, J.; Dorland, L.; van Halbeek, H.; Vliegthart, J. F.: The structures and microheterogeneity of the carbohydrate chains of human plasma ceruloplasmin. A study employing 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 8755-8760.
- (138) Kresge, N.; Simoni, R. D.; Hill, R. L.: Hepatic Carbohydrate Binding Proteins and Glycoprotein Catabolism: the Work of Gilbert G. Ashwell. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, e34-e34.
- (139) Morell, A. G.; Irvine, R. A.; Sternlieb, I.; Scheinberg, I. H.; Ashwell, G.: Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin: V. Metabolic Studies on Sialic Acid-Free Ceruloplasmin In Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **1968**, *243*, 155-159.

- (140) van den Hamer, C. J. A.; Morell, A. G.; Scheinberg, I. H.; Hickman, J.; Ashwell, G.: Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin: IX. The Role of Galactosyl Residues in Clearance of Ceruloplasmin From the Circulation. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245*, 4397-4402.
- (141) Rigopoulou, E. I.; Roggenbuck, D.; Smyk, D. S.; Liaskos, C.; Mytilinaiou, M. G.; Feist, E.; Conrad, K.; Bogdanos, D. P.: Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: Lost and found. *Autoimmunity Reviews* **2012**, *12*, 260-269.
- (142) Pricer, W. E.; Ashwell, G.: The Binding of Desialylated Glycoproteins by Plasma Membranes of Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 4825-4833.
- (143) Stockert, R. J.; Morell, A. G.; Scheinberg, I. H.: Hepatic binding protein: the protective role of its sialic acid residues. *Science* **1977**, *197*, 667-668.
- (144) Morell, A. G.; Gregoriadis, G.; Scheinberg, I. H.; Hickman, J.; Ashwell, G.: The Role of Sialic Acid in Determining the Survival of Glycoproteins in the Circulation. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 1461-1467.
- (145) Van Lenten, L.; Ashwell, G.: The Binding of Desialylated Glycoproteins by Plasma Membranes of Rat Liver: Development of a Quantitative Inhibition Assay. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247*, 4633-4640.
- (146) Connolly, D. T.; Townsend, R. R.; Kawaguchi, K.; Bell, W. R.; Lee, Y. C.: Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 939-945.
- (147) Iobst, S. T.; Drickamer, K.: Selective Sugar Binding to the Carbohydrate Recognition Domains of the Rat Hepatic and Macrophage Asialoglycoprotein Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6686-6693.
- (148) Feinberg, H.; Torgersen, D.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Mechanism of pH-dependent N-Acetylgalactosamine Binding by a Functional Mimic of the Hepatocyte Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 35176-35184.
- (149) Iobst, S. T.; Wormald, M. R.; Weis, W. I.; Dwek, R. A.; Drickamer, K.: Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 15505-15511.
- (150) Drickamer, K.: Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* **1992**, *360*, 183-186.
- (151) Kolatkar, A. R.; Leung, A. K.; Isecke, R.; Brossmer, R.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Mechanism of N-Acetylgalactosamine Binding to a C-type Animal Lectin Carbohydrate-recognition Domain. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 19502-19508.
- (152) Wragg, S.; Drickamer, K.: Identification of Amino Acid Residues That Determine pH Dependence of Ligand Binding to the Asialoglycoprotein Receptor during Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 35400-35406.
- (153) Sarkar, M.; Liao, J.; Kabat, E. A.; Tanabe, T.; Ashwell, G.: The binding site of rabbit hepatic lectin. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 3170-3174.
- (154) Lee, R. T.: Binding site of the rabbit liver lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1045-1050.
- (155) Lee, R. T.; Myers, R. W.; Lee, Y. C.: Further studies on the binding characteristics of rabbit liver galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6292-6298.
- (156) Stowell, C. P.; Lee, R. T.; Lee, Y. C.: Studies on the specificity of rabbit hepatic carbohydrate-binding protein using neoglycoproteins. *Biochemistry* **1980**, *19*, 4904-4908.
- (157) Park, E. I.; Manzella, S. M.; Baenziger, J. U.: Rapid Clearance of Sialylated Glycoproteins by the Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 4597-4602.
- (158) Park, E. I.; Mi, Y.; Unverzagt, C.; Gabius, H.-J.; Baenziger, J. U.: The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid α 2,6GalNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 17125-17129.
- (159) Lundquist, J. J.; Toone, E. J.: The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555-578.

- (160) Kichler, A.; Schuber, F.: Versatile synthesis of bi- and tri-antennary galactose ligands: interaction with the Gal/GalNAc receptor of human hepatoma cells. *Glycoconjugate Journal* **1995**, *12*, 275-281.
- (161) Weigel, P. H.; Schmell, E.; Lee, Y. C.; Roseman, S.: Specific adhesion of rat hepatocytes to beta-galactosides linked to polyacrylamide gels. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253*, 330-333.
- (162) Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Lönnngren, J.; Arnarp, J.; Haraldsson, M.; Lönn, H.: Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 199-202.
- (163) Connolly, D. T.; Hoppe, C. A.; Hobish, M. K.; Lee, Y. C.: Steady state and kinetic analysis of the binding of asialoorosomucoid to the isolated rabbit hepatic lectin. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 12940-12948.
- (164) Lee, R.; Lee, Y.: Preparation of cluster glycosides of N-acetylgalactosamine that have subnanomolar binding constants towards the mammalian hepatic Gal/GalNAc-specific receptor. *Glycoconjugate Journal* **1987**, *4*, 317-328.
- (165) Rice, K. G.; Weisz, O. A.; Barthel, T.; Lee, R. T.; Lee, Y. C.: Defined geometry of binding between triantennary glycopeptide and the asialoglycoprotein receptor of rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 18429-18434.
- (166) Rice, K. G.; Wu, P.; Brand, L.; Lee, Y. C.: Interterminal distance and flexibility of a triantennary glycopeptide as measured by resonance energy transfer. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6646-6655.
- (167) Lee, R. T.; Lin, P.; Lee, Y. C.: New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin of mammalian liver. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4255-4261.
- (168) Bock, K.; Arnarp, J.; Lönnngren, J.: The Preferred Conformation of Oligosaccharides Derived from the Complex-Type Carbohydrate Portions of Glycoproteins. *European Journal of Biochemistry* **1982**, *129*, 171-178.
- (169) Lee, Y. C.; Lee, R. T.: Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 321-327.
- (170) Lee, Y. C.: Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. *The FASEB Journal* **1992**, *6*, 3193-3200.
- (171) Mamidyala, S. K.; Dutta, S.; Chrnyk, B. A.; Préville, C.; Wang, H.; Withka, J. M.; McColl, A.; Subashi, T. A.; Hawrylik, S. J.; Griffor, M. C.; Kim, S.; Pfefferkorn, J. A.; Price, D. A.; Menhaji-Klotz, E.; Mascitti, V.; Finn, M. G.: Glycomimetic Ligands for the Human Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 1978-1981.
- (172) Ramadugu, S. K.; Chung, Y.-H.; Fuentes, E. J.; Rice, K. G.; Margulis, C. J.: In Silico Prediction of the 3D Structure of Trimeric Asialoglycoprotein Receptor Bound to Triantennary Oligosaccharide. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 9087-9095.
- (173) Stokmaier, D.; Khorev, O.; Cutting, B.; Born, R.; Ricklin, D.; Ernst, T. O. G.; Böni, F.; Schwingruber, K.; Gentner, M.; Wittwer, M.; Spreafico, M.; Vedani, A.; Rabbani, S.; Schwardt, O.; Ernst, B.: Design, synthesis and evaluation of monovalent ligands for the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 7254-7264.
- (174) Wong, T. C.; Townsend, R. R.; Lee, Y. C.: Synthesis of D-galactosamine derivatives and binding studies using isolated rat hepatocytes. *Carbohydrate Research* **1987**, *170*, 27-46.
- (175) Westerlind, U.; Westman, J.; Törnquist, E.; Smith, C. I. E.; Oscarson, S.; Lahmann, M.; Norberg, T.: Ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted gene delivery, part 1: Synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine. *Glycoconjugate Journal* **2004**, *21*, 227-241.
- (176) Lee, R.; Lee, Y.: Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate Journal* **2000**, *17*, 543-551.
- (177) Jimenez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M.: Multivalency in heterogeneous glycoenvironments: hetero-glycoclusters, -glycopolymers and -glycoassemblies. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4518-4531.

- (178) Biessen, E. A. L.; Beuting, D. M.; Roelen, H. C. P. F.; van de Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Van Berkel, T. J. C.: Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1538-1546.
- (179) Biessen, E. A. L.; Broxterman, H.; Van Boom, J. H.; Van Berkel, T. J. C.: The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1846-1852.
- (180) Rensen, P. C. N.; Sliedregt, L. A. J. M.; Ferns, M.; Kieviet, E.; van Rossenberg, S. M. W.; van Leeuwen, S. H.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L.: Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 37577-37584.
- (181) Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G.: Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 966-979.
- (182) Nair, J. K.; Willoughby, J. L. S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; van der Sluis, R. J.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.: Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 16958-16961.
- (183) Coombs, P. J.; Taylor, M. E.; Drickamer, K.: Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. *Glycobiology* **2006**, *16*, 1C-7C.
- (184) Fadden, A. J.; Holt, O. J.; Drickamer, K.: Molecular characterization of the rat Kupffer cell glycoprotein receptor. *Glycobiology* **2003**, *13*, 529-537.
- (185) Sliedregt, L. A. J. M.; Rensen, P. C. N.; Rump, E. T.; van Santbrink, P. J.; Bijsterbosch, M. K.; Valentijn, A. R. P. M.; van de Marel, G. A.; van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L.: Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 609-618.
- (186) Rensen, P. C. N.; van Leeuwen, S. H.; Sliedregt, L. A. J. M.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L.: Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 5798-5808.
- (187) van Vliet, S. J.; Saeland, E.; van Kooyk, Y.: Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends in Immunology*, *29*, 83-90.
- (188) Jégouzo, S. A. F.; Quintero-Martínez, A.; Ouyang, X.; dos Santos, Á.; Taylor, M. E.; Drickamer, K.: Organization of the extracellular portion of the macrophage galactose receptor: A trimeric cluster of simple binding sites for N-acetylgalactosamine. *Glycobiology* **2013**, *23*, 853-864.
- (189) Ozaki, K.; Lee, R.; Lee, Y.; Kawasaki, T.: The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages. *Glycoconjugate Journal* **1995**, *12*, 268-274.
- (190) Marcelo, F.; Garcia-Martin, F.; Matsushita, T.; Sardinha, J.; Coelho, H.; Oude-Vrielink, A.; Koller, C.; André, S.; Cabrita, E. J.; Gabius, H.-J.; Nishimura, S.-I.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F. J.: Delineating Binding Modes of Gal/GalNAc and Structural Elements of the Molecular Recognition of Tumor-Associated Mucin Glycopeptides by the Human Macrophage Galactose-Type Lectin. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 16147-16155.
- (191) Feinberg, H.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.: Scavenger Receptor C-type Lectin Binds to the Leukocyte Cell Surface Glycan Lewisx by a Novel Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 17250-17258.
- (192) Ahmed, H.; Allen, H. J.; Sharma, A.; Matta, K. L.: Human splenic galaptin: carbohydrate-binding specificity and characterization of the combining site. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5315-5319.
- (193) Lee, R. T.; Ichikawa, Y.; Allen, H. J.; Lee, Y. C.: Binding characteristics of galactoside-binding lectin (galaptin) from human spleen. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 7864-7871.

- (194) André, S.; Frisch, B.; Kaltner, H.; Desouza, D.; Schuber, F.; Gabius, H.-J.: Lectin-Mediated Drug Targeting: Selection of Valency, Sugar Type (Gal/Lac), and Spacer Length for Cluster Glycosides as Parameters to Distinguish Ligand Binding to C-Type Asialoglycoprotein Receptors and Galectins. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 985-990.
- (195) Rensen, P. C. N.; Sliedregt, L. A. J. M.; van Santbrink, P. J.; Ferns, M.; Schifferstein, H. N. J.; van Leeuwen, S. H.; Souverijn, J. H. M.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L.: Stimulation of Liver-Directed Cholesterol Flux in Mice by Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids With High Affinity for the Asialoglycoprotein Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2006**, *26*, 169-175.
- (196) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L.: *Biochemistry*; seventh edition ed., 2012.
- (197) Nguyen, T. H.; Ferry, N.: Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Therapy* **0000**, *11*, S76-S84.
- (198) Rajeev, K. G.; Nair, J. K.; Jayaraman, M.; Charisse, K.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Willoughby, J. L. S.; Yucius, K.; Nguyen, T.; Shulga-Morskaya, S.; Milstein, S.; Liebow, A.; Querbes, W.; Borodovsky, A.; Fitzgerald, K.; Maier, M. A.; Manoharan, M.: Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent N-Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 903-908.
- (199) Jiang, H. L.; Kwon, J. T.; Kim, Y. K.; Kim, E. M.; Arote, R.; Jeong, H. J.; Nah, J. W.; Choi, Y. J.; Akaike, T.; Cho, M. H.; Cho, C. S.: Galactosylated chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier for hepatocyte targeting. *Gene Therapy* **2007**, *14*, 1389-1398.
- (200) Peng, D. J.; Sun, J.; Wang, Y. Z.; Tian, J.; Zhang, Y. H.; Noteborn, M. H. M.; Qu, S.: Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Cancer Gene Therapy* **2006**, *14*, 66-73.
- (201) Seymour, L. W.; Ulbrich, K.; Wedge, S. R.; Hume, I. C.; Strohmalm, J.; Duncan, R.: N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymers targeted to the hepatocyte galactose-receptor: pharmacokinetics in DBA2 mice. *British Journal of Cancer* **1991**, *63*, 859-866.
- (202) David, A.; Kopečková, P.; Minko, T.; Rubinstein, A.; Kopeček, J.: Design of a multivalent galactoside ligand for selective targeting of HPMA copolymer-doxorubicin conjugates to human colon cancer cells. *European Journal of Cancer*, *40*, 148-157.
- (203) Cerenzia, M. T.; Fiume, L.; De Bernardi Venon, W.; Lavezzo, B.; Brunetto, M. R.; Ponzetto, A.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Gervasi, G. B.; Bonino, F.; Verme, G.: Adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human albumin administered for 4 weeks in patients with chronic type B hepatitis decreased viremia without producing significant side effects. *Hepatology* **1996**, *23*, 657-661.
- (204) Fiume, L.; Baglioni, M.; Bolondi, L.; Farina, C.; Di Stefano, G.: Doxorubicin coupled to lactosaminated human albumin: a hepatocellular carcinoma targeted drug. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 1002-1009.
- (205) Ise, H.; Sugihara, N.; Negishi, N.; Nikaido, T.; Akaike, T.: Low Asialoglycoprotein Receptor Expression as Markers for Highly Proliferative Potential Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *285*, 172-182.
- (206) Sugahara, K.; Togashi, H.; Takahashi, K.; Onodera, Y.; Sanjo, M.; Misawa, K.; Suzuki, A.; Adachi, T.; Ito, J.; Okumoto, K.; Hattori, E.; Takeda, T.; Watanabe, H.; Saito, K.; Saito, T.; Sugai, Y.; Kawata, S.: Separate analysis of asialoglycoprotein receptors in the right and left hepatic lobes using ^{99m}Tc-GSA SPECT. *Hepatology* **2003**, *38*, 1401-1409.
- (207) Iimuro, Y.; Kashiwagi, T.; Yamanaka, J.; Hirano, T.; Saito, S.; Sugimoto, T.; Watanabe, S.; Kuroda, N.; Okada, T.; Asano, Y.; Uyama, N.; Fujimoto, J.: Preoperative estimation of asialoglycoprotein receptor expression in the remnant liver from CT/^{99m}Tc-GSA SPECT fusion images correlates well with postoperative liver function parameters. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* **2010**, *17*, 673-681.
- (208) Kaibori, M.; Ha-Kawa, S.; Uchida, Y.; Ishizaki, M.; Saito, T.; Matsui, K.; Hirohara, J.; Tanaka, K.; Kamiyama, Y.: Liver Regeneration in Donors Evaluated by Tc-^{99m}-GSA Scintigraphy after Living Donor Liver Transplantation. *Dig Dis Sci* **2008**, *53*, 850-855.

- (209) Huang, G.; Diakur, J.; Xu, Z.; Wiebe, L. I.: Asialoglycoprotein receptor-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *360*, 197-203.
- (210) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M.: A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1255-1258.
- (211) Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P.: RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14*, 224-240.
- (212) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M.: Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: An NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.
- (213) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M.: Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432-437.
- (214) Mutter, M.; Vuilleumier, S.: A Chemical Approach to Protein Design—Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, *28*, 535-554.
- (215) Mutter, M.; Altmann, E.; Altmann, K.-H.; Hersperger, R.; Koziej, P.; Nebel, K.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S.; Gremlich, H.-U.; Müller, K.: The Construction of New Proteins. Part III. Artificial folding units by assembly of amphiphilic secondary structures on a template. *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71*, 835-847.
- (216) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G.: Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 1482-1485.
- (217) Earnest, I.; Kalvoda, J.; Francotte, E.; Rihs, G.; Fritz, H.; Blommers, M. J. J.; Raschdorf, F.; Sigel, C.; Mutter, M.: Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). Cyclic Templates with Incorporated Turn-Inducing Mimics. *Helvetica Chimica Acta* **1993**, *76*, 1539-1563.
- (218) Tuchscherer, G.; Servis, C.; Corradin, G.; Blum, U.; Rivier, J.; Mutter, M.: Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Science* **1992**, *1*, 1377-1386.
- (219) Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.: Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5730-5739.
- (220) Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.: Multivalent RGD synthetic peptides as potent [small alpha]V[small beta]3 integrin ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 1958-1965.
- (221) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Sogawa, C.; Claron, M.; Aung, W.; Tsuji, A. B.; Wakizaka, H.; Zhang, M.-R.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fujibayashi, Y.; Saga, T.: PET imaging and biodistribution analysis of the effects of succinylated gelatin combined with l-lysine on renal uptake and retention of ⁶⁴Cu-cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4 in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *86*, 478-486.
- (222) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Galibert, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Saga, T.; Dumy, P.; Fujibayashi, Y.: Noninvasive visualization and quantification of tumor $\alpha V\beta 3$ integrin expression using a novel positron emission tomography probe, ⁶⁴Cu-cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4. *Nuclear Medicine and Biology* **2011**, *38*, 529-540.
- (223) Thakar, D.; Coche-Guérente, L.; Claron, M.; Wenk, C. H. F.; Dejeu, J.; Dumy, P.; Labbé, P.; Boturyn, D.: Redox-Driven Host–Guest Interactions Allow the Controlled Release of Captured Cells on RGD-Functionalized Surfaces. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 377-381.
- (224) Wenk, C. H. F.; Ponce, F.; Guillermet, S.; Tenaud, C.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Watrelot-Virieux, D.; Carozzo, C.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.: Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha V\beta 3$ integrin molecular probe. *Cancer Letters*, *334*, 188-195.
- (225) Galan, M. C.; Dumy, P.; Renaudet, O.: Multivalent glyco(cyclo)peptides. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4599-4612.

- (226) Wilczewski, M.; Van der Heyden, A.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P.: Promotion of sugar-lectin recognition through the multiple sugar presentation offered by regioselectively addressable functionalized templates (RAFT): a QCM-D and SPR study. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 1114-1122.
- (227) Fiore, M.; Berthet, N.; Marra, A.; Gillon, E.; Dumy, P.; Dondoni, A.; Imberty, A.; Renaudet, O.: Tetravalent glycocyclopeptide with nanomolar affinity to wheat germ agglutinin. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 7113-7122.
- (228) Lee, M. H.; Yang, Z.; Lim, C. W.; Lee, Y. H.; Dongbang, S.; Kang, C.; Kim, J. S.: Disulfide-Cleavage-Triggered Chemosensors and Their Biological Applications. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 5071-5109.
- (229) Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-h.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I.: Activatable Fluorescent Probes for Tumour-Targeting Imaging in Live Mice. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
- (230) Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P.-S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S.: Hepatocyte-Targeting Single Galactose-Appended Naphthalimide: A Tool for Intracellular Thiol Imaging in Vivo. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 1316-1322.
- (231) Zalipsky, S.: Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, *16*, 157-182.
- (232) Ronot, X.; Grunwald, D.; Mayol, J.-F.; Boutonnat, J.: *La cytométrie en flux*; tec-et-doc, 2006.
- (233) Reference manual Becton Dickinson
- (234) Coupland, P. G.; Fisher, K. A.; Jones, D. R. E.; Aylott, J. W.: Internalisation of polymeric nanosensors in mesenchymal stem cells: Analysis by flow cytometry and confocal microscopy. *Journal of Controlled Release* **2008**, *130*, 115-120.
- (235) Terra, R.: La cytométrie en flux : un rôle majeur dans le diagnostic des néoplasies hématologiques. *Le Labexpert* **2012**, *2*, 7-20.
- (236) David, A.; Kopečková, P.; Rubinstein, A.; Kopeček, J.: Enhanced Biorecognition and Internalization of HPMA Copolymers Containing Multiple or Multivalent Carbohydrate Side-Chains by Human Hepatocarcinoma Cells. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 890-899.
- (237) Medina, S. H.; Tekumalla, V.; Chevliakov, M. V.; Shewach, D. S.; Ensminger, W. D.; El-Sayed, M. E. H.: N-acetylgalactosamine-functionalized dendrimers as hepatic cancer cell-targeted carriers. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4118-4129.
- (238) Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P. H.: In Vitro Imaging and in Vivo Liver Targeting with Carbohydrate Capped Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 2110-2112.
- (239) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 105-111.
- (240) Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P.: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **1980**, *209*, 497-499.
- (241) Schwartz, A. L.; Fridovich, S. E.; Knowles, B. B.; Lodish, H. F.: Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 8878-8881.
- (242) Li, Y.; Huang, G.; Diakur, J.; Wiebe, L. I.: Targeted Delivery of Macromolecular Drugs: Asialoglycoprotein Receptor (ASGPR) Expression by Selected Hepatoma Cell Lines used in Antiviral Drug Development. *Current drug delivery* **2008**, *5*, 299-302.
- (243) Steer, C. J.; Ashwell, G.: Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 3008-3013.
- (244) Gey, G. O.; Coffman, W. D.; Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **1952**, *12*, 264-265.
- (245) O'Brien, S. J.: Cell culture forensics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 7656-7658.

- (246) Weigel, P. H.: Characterization of the asialoglycoprotein receptor on isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 6111-6120.
- (247) Barcroft, J.; Hill, A. V.: The nature of oxyhæmoglobin, with a note on its molecular weight. *The Journal of Physiology* **1910**, *39*, 411-428.
- (248) Prinz, H.: Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *J Chem Biol* **2010**, *3*, 37-44.
- (249) Borgna, J.-L.: Requirements for reliable determination of binding affinity constants by saturation analysis approach. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, *92*, 419-433.
- (250) Grotjan, H. E., Jr.; Steinberger, E.: Radioimmunoassay and bioassay data processing using a logistic curve fitting routine adapted to a desk top computer. *Computers in Biology and Medicine*, *7*, 159-163.
- (251) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099-3108.
- (252) Renaudet, O.; Dumy, P.: Expedient synthesis of aminooxylated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 7575-7578.
- (253) Renaudet, O.; Dumy, P.: On-bead synthesis and binding assay of chemoselectively template-assembled multivalent neoglycopeptides. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 2628-2636.
- (254) Lemieux, R. U.: Effet of uncharged paires of electron and their solvation on conformational equilibria. *Pure and Applied Chemistry* **1971**, *25*, 527-548.
- (255) Kozikowski, A. P.; Lee, J.: A synthetic approach to the cis-fused marine pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-dactomelyne. X-ray structure of a rare organomercurial. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 863-870.
- (256) *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods*; CRC Press, 2014; Vol. 2.
- (257) Marcaurelle, L. A.; Rodriguez, E. C.; Bertozzi, C. R.: Synthesis of an oxime-linked neoglycopeptide with glycosylation-dependent activity similar to its native counterpart. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 8417-8420.
- (258) Marcaurelle, L. A.; Shin, Y.; Goon, S.; Bertozzi, C. R.: Synthesis of Oxime-Linked Mucin Mimics Containing the Tumor-Related TN and Sialyl TN Antigens. *Organic Letters* **2001**, *3*, 3691-3694.
- (259) Wu, J.; Guo, Z.: Improving the Antigenicity of sTn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 1537-1544.
- (260) Chaplin, D.; Crout, D. H. G.; Bornemann, S.; Hutchinson, D. W.; Khan, R.: Conversion of 2-acetamido-2-deoxy-[small beta]-D-glucopyranose (N-acetylglucosamine) into 2-acetamido-2-deoxy-[small beta]-D-galactopyranose (N-acetylgalactosamine) using a biotransformation to generate a selectively deprotected substrate for SN2 inversion. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1992**, 235-237.
- (261) Tipson, R. S.; Cohen, A.: Action of zinc dust and sodium iodide in N,N-dimethylformamide on contiguous, secondary sulfonyloxy groups: a simple method for introducing nonterminal unsaturation. *Carbohydrate Research* **1965**, *1*, 338-340.
- (262) Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M.: The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. *Canadian Journal of Chemistry* **1979**, *57*, 1244-1251.
- (263) Tachibana, Y.; Matsubara, N.; Nakajima, F.; Tsuda, T.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S.-I.: Efficient and versatile synthesis of mucin-like glycoprotein mimics. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10213-10224.
- (264) Posner, G. H.; Haines, S. R.: A convenient, one-step, high-yield replacement of an anomeric hydroxyl group by a fluorine atom using dast. Preparation of glycosyl fluorides. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 5-8.
- (265) Rosenbrook Jr, W.; Riley, D. A.; Lartey, P. A.: A new method for the synthesis of glycosyl fluorides. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 3-4.

- (266) Allen, J. R.; Harris, C. R.; Danishefsky, S. J.: Pursuit of Optimal Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines: Preparation of a Multiantigenic Unimolecular Glycopeptide Containing the Tn, MBr1, and Lewisy Antigens. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1890-1897.
- (267) Parry, A. L.; Clemson, N. A.; Ellis, J.; Bernhard, S. S. R.; Davis, B. G.; Cameron, N. R.: 'Multicopy Multivalent' Glycopolymer-Stabilized Gold Nanoparticles as Potential Synthetic Cancer Vaccines. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9362-9365.
- (268) Staudinger, H.; Meyer, J.: Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- (269) Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R.: Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2686-2695.
- (270) Thomas, B.: Conception et synthèse d'hétéroglycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse. Université de Grenoble, 2014.
- (271) Rodriguez, E. C.; Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R.: Aminoxy-, Hydrazide-, and Thiosemicarbazide-Functionalized Saccharides: Versatile Reagents for Glycoconjugate Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 7134-7135.
- (272) Cao, S.; Tropper, F. D.; Roy, R.: Stereoselective phase transfer catalyzed syntheses of glycosyloxysuccinimides and their transformations into glycoprobes. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6679-6686.
- (273) Renaudet, O.; Dumy, P.: Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates. *Organic Letters* **2003**, *5*, 243-246.
- (274) Renaudet, O.; BenMohamed, L.; Dasgupta, G.; Bettahi, I.; Dumy, P.: Towards a Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitope Containing Synthetic Glycolipopeptide Cancer Vaccine. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741.
- (275) Merrifield, R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (276) Sheppard, R.: The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis. *Journal of Peptide Science* **2003**, *9*, 545-552.
- (277) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.: Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595-598.
- (278) Hancock, W. S.; Battersby, J. E.: A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid. *Analytical Biochemistry* **1976**, *71*, 260-264.
- (279) Gude, M.; Ryf, J.; White, P.: An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Letters in Peptide Science* **2002**, *9*, 203-206.
- (280) Renaudet, O.; Dumy, P.: Synthesis of multitopic neoglycopeptides displaying recognition and detection motifs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 3619-3622.
- (281) Renaudet, O.; Boturnyn, D.; Dumy, P.: Biomolecular assembly by iterative oxime ligations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 3880-3883.
- (282) Rose, K.; Chen, J.; Dragovic, M.; Zeng, W.; Jeannerat, D.; Kamalaprija, P.; Burger, U.: New Cyclization Reaction at the Amino Terminus of Peptides and Proteins. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 1038-1043.
- (283) Carulla, N.; Woodward, C.; Barany, G.: Toward New Designed Proteins Derived from Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI): Covalent Cross-Linking of Two 'Core Modules' by Oxime-Forming Ligation. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 726-741.
- (284) Buré, C.; Marceau, P.; Meudal, H.; Delmas, A. F.: Synthesis and analytical investigation of C-terminally modified peptide aldehydes and ketone: application to oxime ligation. *Journal of Peptide Science* **2012**, *18*, 147-154.
- (285) Ulrich, S.; Boturnyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P.: Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 34-41.

- (286) Rose, K.: Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 30-33.
- (287) Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R.: Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 506-513.
- (288) El-Mahdi, O.; Melnyk, O.: α -Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 735-765.
- (289) Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Coll, J.-L.: New Multifunctional Molecular Conjugate Vector for Targeting, Imaging, and Therapy of Tumors. *Molecular Therapy* **2005**, *12*, 1168-1175.
- (290) Khorev, O.: Design and Synthesis of high Affinity Ligands for the Asialoglycoprotein Receptor (ASGP-R). Universität Basel, 2007.
- (291) Grassin, A.: Conception, synthèse et caractérisation de vecteurs pour la nanomédecine : applications en thérapie anticancéreuse. Université de Grenoble, 2015.
- (292) Park, S.; Yousaf, M. N.: An Interfacial Oxime Reaction To Immobilize Ligands and Cells in Patterns and Gradients to Photoactive Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24*, 6201-6207.
- (293) Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A.: Releasable Luciferin-Transporter Conjugates: Tools for the Real-Time Analysis of Cellular Uptake and Release. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6526-6527.
- (294) Woehle, G. H.; Warner, M. G.; Hutchison, J. E.: Molecular-Level Control of Feature Separation in One-Dimensional Nanostructure Assemblies Formed by Biomolecular Nanolithography. *Langmuir* **2004**, *20*, 5982-5988.
- (295) Koeller, K. M.; Smith, M. E. B.; Wong, C.-H.: Tyrosine Sulfation on a PSGL-1 Glycopeptide Influences the Reactivity of Glycosyltransferases Responsible for Synthesis of the Attached O-Glycan. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 742-743.
- (296) Laurent, N.; Lafont, D.; Boullanger, P.: Syntheses of α -d-galactosamine neoglycolipids. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 823-835.
- (297) Legeay, J. C.; Vanden Eynde, J. J.; Bazureau, J. P.: Sequential synthesis of a new analogue of amlodipine bearing a short amino polyethyleneglycol chain. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12081-12086.
- (298) Lebeau, L.; Oudet, P.; Mioskowski, C.: Synthesis of New Phospholipids Linked to Steroid-Hormone Derivatives Designed for Two-Dimensional Crystallization of Proteins. *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74*, 1697-1706.
- (299) Howarth, N. M.; Ricci, J.: Synthesis of N-propynyl analogues of peptide nucleic acid (PNA) monomers and their use in the click reaction to prepare N-functionalized PNAs. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9588-9594.
- (300) Moreau, J.; Marchand-Brynaert, J.: Modular Synthesis of Bifunctional Linkers for Materials Science. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011*, 1641-1644.
- (301) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.: A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (302) Piron, F.; Oprea, C.; Cismaş, C.; Terec, A.; Roncali, J.; Ion, G.; Babes-Bolyai: Synthesis of Podands with Cyanurate or Isocyanurate Cores and Terminal Triple Bonds. *Synthesis* **2010**, 1639-1644.
- (303) Szilágyi, L.; Györgydeák, Z.: A ^{13}C -N.M.R. investigation of glycosyl azides and other azido sugars: Stereochemical influences on the one-bond ^{13}C - ^1H coupling constants. *Carbohydrate Research* **1985**, *143*, 21-41.
- (304) Li, T.; Guo, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, Z.; Lin, L.; Zhang, Z.; Li, L.; Lin, J.; Zhao, W.; Li, J.; Wang, P. G.: Design and synthesis of O-GlcNAcase inhibitors via 'click chemistry' and biological evaluations. *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 1083-1092.
- (305) Jullien, A.-S.: Synthèse et étude de nouveaux chélateurs pour la détoxification d'ions métalliques d(10) dans l'organisme PhD, Université de Grenoble, 2013.
- (306) Witt, D.: Recent developments in disulfide bond formation. *Synthesis* **2008**, 2491-2509.

- (307) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235-242.
- (308) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S.: Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 1739-1749.
- (309) Khier, S.; Tolchinsky, S.; Lederkremer, G. Z.; Shaanan, B.: Modeling the Combining Site of the Human Asialoglycoprotein Receptor. *Israel Journal of Chemistry* **1994**, *34*, 177-184.
- (310) Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W.: Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 69-82.
- (311) Wichapong, K.; Rohe, A.; Platzer, C.; Slynko, I.; Erdmann, F.; Schmidt, M.; Sippl, W.: Application of Docking and QM/MM-GBSA Rescoring to Screen for Novel Myt1 Kinase Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, *54*, 881-893.
- (312) Weis, W. I.; Drickamer, K.: Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* **1994**, *2*, 1227-1240.
- (313) Ng, K. K. S.; Kolatkar, A. R.; Park-Snyder, S.; Feinberg, H.; Clark, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.: Orientation of Bound Ligands in Mannose-binding Proteins: IMPLICATIONS FOR MULTIVALENT LIGAND RECOGNITION. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 16088-16095.
- (314) Sheriff, S.; Chang, C. Y.; Ezekowitz, R. A. B.: Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple [alpha]-helical coiled-coil. *Nature Structural Molecular Biology* **1994**, *1*, 789-794.
- (315) Feinberg, H.; Powlesland, A. S.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.: Trimeric Structure of Langerin. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 13285-13293.
- (316) Thépaut, M.; Valladeau, J.; Nurisso, A.; Kahn, R.; Arnou, B.; Vivès, C.; Saeland, S.; Ebel, C.; Monnier, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; Imberty, A.; Fieschi, F.: Structural Studies of Langerin and Birbeck Granule: A Macromolecular Organization Model†‡. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2684-2698.
- (317) Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K.: A Novel Mechanism of Carbohydrate Recognition by the C-type Lectins DC-SIGN and DC-SIGNR: Subunit organisation and binding to multivalent ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 28939-28945.
- (318) Sutkeviciute, I.; Thépaut, M.; Sattin, S.; Berzi, A.; McGeagh, J.; Grudinin, S.; Weiser, J.; Le Roy, A.; Reina, J. J.; Rojo, J.; Clerici, M.; Bernardi, A.; Ebel, C.; Fieschi, F.: Unique DC-SIGN Clustering Activity of a Small Glycomimetic: A Lesson for Ligand Design. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 1377-1385.
- (319) Nielsen, B. B.; Kastrup, J. S.; Rasmussen, H.; Holtet, T. L.; Graversen, J. H.; Etzerodt, M.; Thøgersen, H. C.; Larsen, I. K.: Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an α -helical coiled coil. *FEBS Letters* **1997**, *412*, 388-396.
- (320) Shiao, T. C.; Rodrigue, J.; Renaudet, O.; Roy, R.: Synthesis of 3,4,6-tri-O-acetyl-D-galactal. In *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods*, 2014; Vol. 2; pp 253-256.
- (321) Sallas, F.; Nishimura, S.-I.: Chemo-enzymatic synthesis of glycopolymers and sequential glycopeptides bearing lactosamine and sialyl Lewis x unit pendant chains. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 2091-2103.

- Résumé -

Glycoconjugués ciblés vers le foie : reconnaissance par des lectines pour la vectorisation de chélateurs de cuivre.

L'incidence des maladies hépatiques est en augmentation, ce qui rend urgente la recherche de systèmes de vectorisation d'agents thérapeutiques vers le foie. La maladie sur laquelle porte notre étude est la maladie orpheline de Wilson. Elle induit une accumulation de cuivre (Cu) principalement dans les hépatocytes et les chélateurs de Cu systémiques utilisés à ce jour pour la traiter présentent de nombreux effets secondaires. C'est dans ce contexte que nous proposons une stratégie innovante qui consiste à piéger sélectivement le cuivre en excès dans les cellules hépatiques. Des chélateurs sélectifs du Cu(I), degré d'oxydation du Cu disponible intracellulaire, ont été conçus. Afin de cibler ces derniers vers les cellules hépatiques, nous avons focalisé notre intérêt sur le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R), une lectine abondamment et presque exclusivement exprimée à la membrane des hépatocytes.

Deux familles de glycoconjugués contenant une unité de ciblage associée à une unité de vectorisation des hépatocytes ont été développées : l'une possède une plateforme cyclodécapeptidique et l'autre une plateforme pseudopeptidique d'architecture tripodale. Les unités de ciblage sont composées de *N*-acétylgalactosamines présentés de manière multivalente, permettant une reconnaissance et une endocytose sélective des glycoconjugués dans les hépatocytes par l'intermédiaire de la lectine ASGP-R. Les deux familles de composés ont montré leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques et à faire diminuer le taux de Cu intracellulaire disponible.

L'objectif de ce travail de thèse est l'étude et l'optimisation du système de ciblage. Les efficacités d'internalisation des deux familles de glycoconjugués dans les hépatocytes sont pour cela comparées. En outre, l'influence de la structure moléculaire des glycoconjugués sur l'efficacité de ciblage est étudiée. Plusieurs glycoconjugués appartenant à chacune des deux familles de composés ont donc été synthétisés, et leurs propriétés d'internalisation dans les hépatocytes humains analysées par cytométrie en flux.

- Abstract -

Glycoconjugates targeted to the liver: lectin's recognition for copper chelators delivery.

Regarding the increasing incidence of liver diseases in the past decades, the discovery of drug delivery systems is becoming a major research area. In particular, the Wilson disease is a liver dysfunction, which needs more specific treatments than those available nowadays. This genetic disorder induces a toxic copper overload in the hepatocytes. Because current copper chelating therapies present many side effects due to their lack of specificity, we propose an innovative strategy that would selectively detoxify copper in liver cells. Since excess intracellular Cu is in the +I oxidation state, we figured that a chelator that would enter the hepatocytes and be specific for Cu(I) could represent an efficient strategy. To selectively target the hepatic cells, we focus our interest on a lectin, which is highly and exclusively expressed in the membrane of the hepatocytes: the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R).

Two different kinds of glycoconjugates that contain a Cu(I) chelating unit associated to liver targeting systems have been obtained : one has a cyclodecapeptide scaffold and the other a tripodal pseudopeptide core. The targeting units are composed of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues multivalently presented, allowing the selective recognition and endocytosis of the glycoconjugates thanks to ASGP-R. These two families of molecules were demonstrated to enter hepatocytes and to chelate intracellular copper.

The aim of the present work is to study and optimise the targeting system. We have compared the efficiency of the targeting systems of the two families of molecules. Moreover the influence of several structural parameters on the internalisation efficiency was determined. Several compounds belonging to cyclodecapeptide and tripod families have been synthesised, and their ability to enter in human hepatocytes has been analysed by flow cytometry.