



**HAL**  
open science

# Galactosides et peptides de fusion pour l'amélioration de l'activité anti-VHC d'un C-nucléoside

Simon Gonzalez

► **To cite this version:**

Simon Gonzalez. Galactosides et peptides de fusion pour l'amélioration de l'activité anti-VHC d'un C-nucléoside. Chimie organique. Université de Cergy Pontoise, 2017. Français. NNT : 2017CERG0900 . tel-01778113

**HAL Id: tel-01778113**

**<https://theses.hal.science/tel-01778113>**

Submitted on 25 Apr 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 de Doctorat De Chimie Organique**

De l'Université de Cergy-Pontoise

Présentée par Simon Gonzalez

Laboratoire de Chimie Biologique (LCB EA 4505)

## **Galactosides et peptides de fusion du VHC pour l'amélioration de l'activité anti-VHC d'un C-nucléoside**

Soutenue le 24 Novembre 2017 devant le jury composé de :

Dr Isabel ALVES	Université de Bordeaux	Rapporteur
Dr Gérard CHASSAING	UPMC	Examineur
Dr Florian GALLIER	Université de Cergy-Pontoise	Encadrant de thèse
Pr Nadège LUBIN-GERMAIN	Université de Cergy-Pontoise	Directeur de thèse
Pr Anna-Maria PAPINI	Université de Cergy-Pontoise	Examineur
Dr Suzanne PEYROTTE	Université de Montpellier	Rapporteur
Pr Paolo ROVERO	Université de Florence	Examineur
Dr Jacques UZIEL	Université de Cergy-Pontoise	Co-directeur de thèse



*A mes parents,*

*Qui m'ont transmis la passion de la science,*

*Et donné l'envie de commencer cette aventure.*



## Remerciements

*En premier lieu, j'aimerais remercier ma Directrice de thèse, Pr Nadège Lubin-Germain, pour sa confiance et sa bienveillance à mon égard. Durant ces trois ans, j'ai ainsi beaucoup appris sur la conduite d'un projet de recherche grâce à l'implication qu'elle a exigé. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de mon respect.*

*Je remercie mon co-directeur de thèse, Dr Jacques Uziel, et mon encadrant de thèse, Dr Florian Gallier, pour leur bonne humeur, leur patience et leur gentillesse, et qui m'ont tant appris et soutenu dans les moments difficiles.*

*Je remercie également le Pr Paolo Rovero de l'Université de Florence, qui m'a accueilli durant trois mois au laboratoire PeptLab, et le Dr Gérard Chassaing qui m'a permis d'utiliser les appareils du Laboratoire des Biomolécules de l'Université de Pierre et Marie Curie. Les discussions que nous avons eues au fil de ces trois années ont façonné ce projet, et beaucoup de ces travaux de thèse ont été réalisés suite à leurs conseils. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mon profond respect.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail, tout d'abord les rapporteurs Dr Suzanne Peyrottes de l'Université de Montpellier et Dr Isabel Alves de l'Université de Bordeaux, ainsi que les examinateurs, Dr Gérard Chassaing de l'Université de Pierre et Marie Curie, Pr Paolo Rovero de l'Université de Florence et Pr Anna-Maria Papini de l'Université de Cergy-Pontoise.*

*Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude et ma considération au Directeur du laboratoire LCB, Pr Thierry Brigaud, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.*

*J'ai également une pensée particulière pour le Dr Olivier Monasson et le Dr Andrea Bordessa, ingénieurs de recherche au laboratoire, et les maîtres de conférences Dr Angélique Ferry, Dr Maud Larregola, Dr Elisa Perroni et Dr Evelyne Chelain, pour toute leur aide, nos discussions scientifiques et leurs précieux conseils.*

*Je n'oublie pas non plus l'ensemble des membres du Laboratoire de Chimie Biologique : Dr Julien Pytkowicz, Dr Nathalie Lensen, Dr Grégory Chaume, et Mme Jocelyne Gougerot, ainsi que les ATER Dr Charlène Gadais, Dr Mathieu Dutartre, Dr Delel Dridi et Dr Damien Afonso. Leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur m'ont permis d'aller au bout de ce travail.*

*J'ai également une pensée toute particulière pour mes collègues doctorants, Dr Cédric Rentier, Dr Matthaia Ieronimaki, Dr Nicolas Pasternak, Dr Anaïs Genty, et M. Keyvan Ragoshay. Devenus des amis, leur soutien et leur aide ont été d'une grande importance pour moi.*

*A l'Université de Florence, je souhaite remercier Dr Francesca Nuti, Dr Feliciano Real-Fernandez, Dr Mario Chelli, Dr Giuseppina Sabatino, Dr Chiara Testa, Dr Simona Pascarella et M. Raffaello Paolini pour leur accueil et les fructueux échanges qui m'ont tant apporté. Grazie mille a tutti !*

*Plusieurs étudiants ont participé à ce projet : M. Lorenzo Pacini à l'Université de Florence, M. Maxime Gemmrich et Mlle Megan Lambert. Qu'ils soient ici remerciés pour leur travail et leur implication. Je leur souhaite toute la réussite qu'ils méritent.*

*Ce projet, de par sa transversalité, a fait intervenir de nombreux collaborateurs que j'aimerais remercier ici. Tout d'abord Pr Pascal Griesmar et Dr Magalie Michiel du laboratoire SATIE, ainsi que Dr Cédric Vancaeyzeele du laboratoire LPPI, qui m'ont permis d'utiliser les appareils de leur laboratoire. Ensuite, Pr Alfonso Carotenuto de l'Université de Naples pour avoir réalisé l'étude structurale sur les peptides, Dr Rémy Agniel du laboratoire ERRMECe pour son aide et ses conseils en calorimétrie, ainsi que Pr Franck Carreiras et Dr Sabrina Kellouche du même laboratoire, pour leur temps, leur pédagogie et qui m'ont permis de réaliser les études par microscopies. Je suis conscient de la chance d'avoir pu travailler avec des personnes aussi passionnées et venant de domaines aussi variés.*

*Enfin, je remercie chaleureusement mes amis, mes parents et mes sœurs pour leur soutien et leur affection. Je remercie tout particulièrement ma compagne, Mélanie, pour son soutien indéfectible, sa patience et les sacrifices qu'elle a faits pour moi. Je lui témoigne ici toute ma gratitude, mon amour et l'importance qu'elle occupe dans ma vie.*

## Table des abréviations

5-FU	5-Fluorouracil	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane	DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
AAD	Agent antiviral direct	DCM	Dichlorométhane
ACN	Acétonitrile	ddA	2',3'-Didésoxyadénosine
ACV	Acyclovir	Dde	1-(4,4-Diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle
ADEPT	<i>Antibody directed enzyme prodrug therapy</i>	DEN	Virus de la dengue
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et élimination	DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
ADN	Acide désoxyribonucléique	DIPEA	Diisopropyléthylamine
ADP	Adénosine diphosphate	DLS	Diffusion dynamique de la lumière
AMP	Peptide antimicrobien	DMAP	Diméthylaminopyridine
AP-2	<i>Adaptator protein 2</i>	DMF	Diméthylformamide
ara-AMP	Adénine arabinose monophosphate	DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
ARN	Acide ribonucléique	DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycérol
ASGPR	Récepteur aux asialoglycoprotéines	DMTST	Trifluorométhanesulfonate de diméthyl(méthylthio)sulfonium
asON	Oligonucléotide antisens	DMSO	Diméthylsulfoxyde
ASOR	Asialoorosomucoïde	DMTSF	Tétrafluoroborate de diméthyl(méthylthio)sulfonium
ATP	Adénosine triphosphate	DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
AZT	Azidothymidine	DOPG	Dioléoylphosphatidylglycérol
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphate	DOTAP	1,2-Dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle	DPC	Dodécylphosphocholine
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium	DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
CCM	Chromatographie sur couche mince	DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
CDV	Virus de la maladie de Carré	DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarian cells</i>	DSPC	Distéaroylphosphatidylcholine
Chol	Cholestérol	DSPG	Distéaroylphosphatidylglycérol
CL	Cardiolipine	DT	Dithionite de sodium
CPP	<i>Cell-penetrating peptide</i>	EC <sub>50</sub>	Concentration efficace médiane
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>	EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
CYP450	Cytochrome P <sub>450</sub>	EDT	Ethanedithiol
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindoldihydrochloride		

EPT	<i>Enzyme prodrug therapy</i>	mi-RNA	Micro-ARN
ERG	Ergostérol	MLVs	<i>Multilamellar vesicle</i>
FA-TP	Fludarabine 5'-triphosphate	Mtt	Méthyltrityle
FDA	<i>Food and drug administration</i>	MVE	Virus de l'encéphalite de la Murray valley
FdUMP	2'-Désoxy-5-fluorouridine 5'-monophosphate	MVVs	<i>Multivesicular vesicle</i>
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone	NBD	7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
FP	Protéine de fusion	NDV	Virus de la maladie de Newcastle
FRET	Transfert d'énergie de résonance de type Förster	NFE2L2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
GAG	Glycosaminoglycane	NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
GDEPT	<i>Gene directed enzyme prodrug therapy</i>	NMM	<i>N</i> -Méthylmorpholine
GSH	Glutathion	NPL	Nanoparticule lipidique
GTP	Guanosine triphosphate	OMP	Orotidine monophosphate
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>	OMS	Organisation mondiale de la santé
HBTU	Hexafluorophosphate d' <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium	ON	Oligonucléotide
HPIV	Virus parainfluenza humain	PACA	Poly(alkylcyanoacrylates)
HPLC-MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée spectrométrie de masse	PAMAM	Poly(amidoamine)
HS	Sulfate d'héparane	Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofur an-5-sulfonyle
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane	PC	Phosphatidylcholine
IFN	Interféron	PE	Phosphatidyléthanolamine
IMPDH	Inosine-5'-monophosphate deshydrogénase	PEG	Polyéthène glycol
IP	Inhibiteur de protéase	PEI	Polyéthylèneimine
ITC	Titration calorimétrique isotherme	PG	Phosphatidylglycérol
JE	Virus de l'encéphalite japonaise	PHCA	Poly(hexylcyanoacrylate)
KUN	Virus de Kunjin	PI	Phosphatidylinositol
LB	Ligand bivalent	PL	Phospholipide
LEAPT	<i>Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy</i>	PLA	Poly(lactic acid)
LT	Ligand trivalent	PLA	Poly(lactic acid)
L-to-P	<i>Lipid-to-peptide</i>	PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>	PMB	<i>p</i> -Méthoxybenzyle
mAb	Anticorps monoclonal	PMEA	9-[2-(Phosphonométhoxy)éthoxy]adénine
Mag-2	Magainine 2	PNA	<i>Peptide-nucleic acid</i>
		POC	Isopropylxyméthylcarbonate

POM	Pivaloyloxyméthyle	SV	Virus simien
POPC	Palmitoyloléoylphosphatidylcholine	TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
POPE	Palmitoyloléoylphosphatidyléthanolamine	TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
POPS	Palmitoyloléoylphosphatidylsérine	TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphénylsilyle
ProTide	Prodrogue de nucléotide	TBEV	Virus de la méningo-encéphalite à tiques
PS	Phosphatidylsérine	TEG	Triéthylène glycol
PSMA	<i>Prostate-specific membrane antigen</i>	TBTU	Tétrafluoroborate d' <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium
PTD	<i>Protein-transduction domain</i>	TFA	Acide trifluoroacétique
P-to-L	<i>Peptide-to-lipid</i>	THF	Tétrahydrofurane
Py	Pyridine	TIS	Triisopropylsilane
RBV	Ribavirine	TPG	Tripopylène glycol
Rho	Rhodamine B	Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
RMN	Résonance magnétique nucléaire	Trt	Trityle
RMP	Ribavirine monophosphate	TTDS	1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridécane succinamique
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance semi-préparative en phase inverse	TTR	Transthyréline
RTP	Ribavirine triphosphate	ULV	<i>Unilamellar vesicle</i>
RVS	Réponse virale soutenue	UMP	Uridine monophosphate
SATE	<i>S</i> -Acétylthioester	UPLC-MS	Chromatographie liquide à ultraperformance couplée à la spectrométrie de masse
SAW	Ondes acoustiques de surface	VHB	Virus de l'hépatite B
SDS	Dodécylsulfate de sodium	VHC	Virus de l'hépatite C
SFV	Virus de la forêt de Semliki	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
siRNA	Petit ARN interférent	VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
SLE	Virus de l'encéphalite de St. Louis	WNE	Virus du Nil occidental
SM	Sphingomyéline	YF	Fièvre jaune
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i>	$\beta$ -Gluc	$\beta$ -Glucuronidase
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>		



## Table des matières

<b>Introduction : Virus de l'Hépatite C</b> .....	1
1. <i>Présentation générale</i> .....	3
2. <i>Historique des traitements</i> .....	4
2.1. Interféron pegylé et ribavirine .....	4
2.2. Modes d'action de la ribavirine .....	5
2.3. Les agents antiviraux directs (AADs) et la multithérapie .....	6
3. <i>Inconvénient des traitements actuels</i> .....	9
<b>Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale</b> .....	11
1. <i>C-nucléoside et stabilité</i> .....	13
1.1. Synthèse des C-nucléosides.....	14
1.2. Activité biologique des C-nucléosides .....	20
1.3. Travaux antérieurs : SRO91 .....	22
2. <i>Modifications structurales</i> .....	25
2.1. Modification en position 1' du ribose .....	26
2.2. Modification en position 2' du ribose .....	26
2.3. Modification sur l'hétérocycle .....	28
3. <i>Stratégie prodrogue</i> .....	30
3.1. Généralités.....	30
3.2. Prodrogues de type esters .....	30
3.3. Prodrogues phosphate.....	32
3.4. Prodrogues de groupements phosphate et phosphonate .....	33
3.5. Prodrogues à enzymes ciblées .....	40
4. <i>Stratégie de vectorisation</i> .....	41
4.1. Vecteurs d'oligonucléotides .....	41
4.2. Vecteurs de nucléosides .....	45
4.3. Vectorisation et adressage par conjugaison.....	48
4.4. Stratégie envisagée .....	51
<b>Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes</b> .....	55
1. <i>ASGPR : structure, localisation, expression et ligands naturels</i> .....	57
2. <i>Ligands synthétiques : galactoside, valence et espaceur</i> .....	59
2.1. Conjugués monovalents.....	59
2.2. Conjugués multivalents .....	61
3. <i>Design et synthèse du conjugué Gal/SRO91</i> .....	65
3.1. Alcynylation médiée à l'indium .....	66

3.2.	Synthèse du building-block SRO91 .....	68
3.3.	Synthèse de l'adresseur .....	70
4.	<i>Conclusion sur la synthèse du conjugué Gal/SRO91</i> .....	81
<b>Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire</b> .....		83
1.	<i>La membrane biologique</i> .....	85
1.1.	Composition générale .....	85
1.2.	Les différentes membranes biologiques .....	88
1.3.	La pénétration membranaire .....	90
2.	<i>Les peptides membranotropes</i> .....	94
2.1.	Peptides de pénétration cellulaire (CPPs).....	96
2.2.	Peptides antimicrobiens (AMPs).....	99
2.3.	Peptides pH-sensibles .....	102
3.	<i>Les peptides de fusion du VHC</i> .....	103
3.1.	Les protéines de fusion E1 et E2 .....	103
3.2.	Sélection des séquences étudiées.....	106
4.	<i>Synthèse des peptides d'intérêt et leurs conjugués</i> .....	112
4.1.	Synthèse des Séries 0 et 1.....	114
4.2.	Synthèse de la Série 2.....	116
4.3.	Synthèse de la Série 3.....	118
4.4.	Synthèse des Séries 1' et 1'' .....	119
5.	<i>Conclusion sur la synthèse des peptides de fusion du VHC</i> .....	121
<b>Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane</b> .....		123
1.	<i>Liposomes comme modèles de membrane cellulaire</i> .....	125
2.	<i>Analyse par calorimétrie</i> .....	129
2.1.	Principe de la calorimétrie différentielle à balayage .....	129
2.2.	Résultats des analyses DSC.....	131
2.3.	Principe de la titration calorimétrique isotherme .....	134
2.4.	Résultats des analyses ITC .....	135
3.	<i>Etude du comportement membranaire des peptides de fusion</i> .....	140
3.1.	Suivi de l'internalisation par spectrofluorescence .....	140
3.2.	Etude de l'activité fusogénique .....	148
4.	<i>Analyse par microscopie à épifluorescence</i> .....	157
4.1.	Visualisation de l'action des peptides sur des liposomes .....	157
4.2.	Visualisation de l'action des peptides sur des cellules .....	159
5.	<i>Conclusion sur la caractérisation de l'interaction peptide/membrane</i> .....	160
<b>Conclusion et perspectives</b> .....		163

<b>Experimental part</b> .....	169
1. <i>Materials and methods</i> .....	171
2. <i>Organic Synthesis</i> .....	172
3. <i>Peptide Synthesis</i> .....	188
3.1. General procedures.....	188
3.2. Synthesis.....	191
4. <i>Interaction Analysis</i> .....	197
4.1. General procedure for LUVs suspensions preparation.....	197
4.2. General procedure for peptide solution preparation .....	199
4.3. General procedure for DSC analysis .....	199
4.4. General procedure for ITC analysis.....	199
4.5. General procedure for fluorescence assays .....	200
4.6. General procedure for fusion/hemifusion assays by FRET .....	201
4.7. General procedure for fusion/hemifusion assays by DLS .....	201
4.8. General procedure for epifluorescence microscopy experiments.....	202
<b>Bibliographie</b> .....	203



# **Introduction : Virus de l'Hépatite C**



# Introduction : Virus de l'Hépatite C

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

### 1. Présentation générale

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus enveloppé de la famille des *Flaviviridae*. Son génome, identifié en 1980 par Choo *et al.*,<sup>1</sup> est composé d'un ARN simple-brin à polarité positive encodant une unique polyprotéine qui, lors de l'infection, sera décomposée en protéines structurales (C, E1, E2 et p7) et protéines non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) par les protéases virales et celles de la cellule hôte.<sup>2</sup>

Le VHC est un virus infectant uniquement l'homme et le chimpanzé dont l'organe cible est le foie et la cellule cible l'hépatocyte. Le virus ne détruit pas les cellules infectées mais entraîne une réponse immunitaire et inflammatoire qui va soit enrayer l'infection, soit détruire lentement le foie. Cette inflammation ou hépatite peut être aiguë ou devenir chronique, mais reste en général asymptomatique pendant une longue période (jusqu'à 30 ans).<sup>3</sup>

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 71 millions de personnes étaient porteuses du virus en 2015.<sup>4</sup> Chez 15 à 45 % des personnes infectées, le virus est spontanément éliminé dans les 6 mois suivant l'infection sans l'utilisation de traitement. En revanche, pour 55 à 85 % des individus touchés, l'infection évoluera vers sa forme chronique entraînant, dans 15 à 30 % des cas, une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (Figure 1).

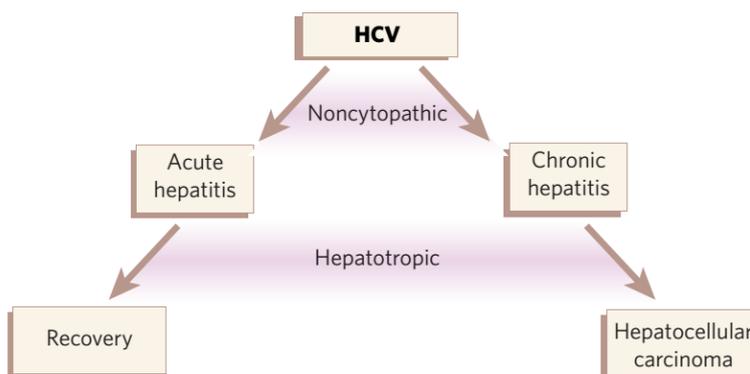


Figure 1: Les différentes infections par le VHC<sup>3</sup>

Le virus se transmet par le sang, principalement lors de consommation de drogues injectables, lors d'injection à risque ou de transfusion sanguine pour laquelle il n'y a pas eu de dépistage. D'autres modes de transmission, bien que moins répandus, existent : l'exposition professionnelle, la transmission par voie sexuelle, l'utilisation de cocaïne intra-nasale, l'application de tatouage ou de piercing et enfin la transmission *in-utero*. Sa répartition géographique n'est pas centrée sur une région, mais le virus se retrouve partout dans le monde (Figure 2) bien que certains génotypes (6 au total) soient plus présents dans certaines régions.

<sup>1</sup> Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. *Science* **1989**, 244 (4902), 359–362.

<sup>2</sup> Lindenbach, B. D. *Science* **2005**, 309, 623–626.

<sup>3</sup> Chisari, F. V. *Nature* **2005**, 436 (7053), 930–932.

<sup>4</sup> World Health Organization. *Global hepatitis report, 2017*; 2017.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

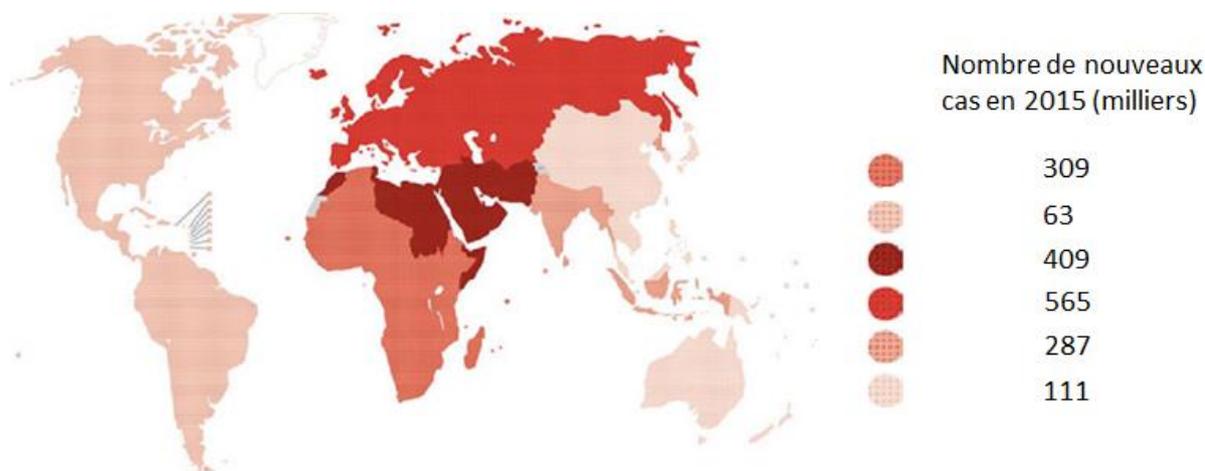


Figure 2: Répartition géographique des nouveaux cas d'infections par le VHC en 2015<sup>4</sup>

La répartition globale, le diagnostic difficile ainsi que le taux de mortalité (environ 400 000 personnes meurent chaque année d'une cirrhose ou d'un cancer hépatique entraînés par l'infection du VHC) en font indéniablement un problème de santé majeur.

## 2. Historique des traitements

### 2.1. Interféron pegylé et ribavirine

En 1986, Hoofnagle *et al.* ont rapporté l'utilisation de la protéine humaine recombinante interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) dans le cas de traitement de l'hépatite non-A et non-B.<sup>5</sup> Par la suite, des études ont apporté des preuves d'améliorations biochimiques, histologiques ainsi que la disparition du virus chez certains patients suivant ce traitement. L'interféron a finalement été accepté comme traitement standard de l'hépatite C chronique en 1991.

Antérieurement à ces découvertes, Sidwell et Witkowski ont réalisé la synthèse d'un nucléoside non naturel à base triazole (Figure 3), la ribavirine (RBV).<sup>6</sup> L'activité antivirale à spectre large de la ribavirine a été démontrée en 1972,<sup>7</sup> et son utilisation comme traitement a été acceptée dans le cas de différentes pathologies telles que le virus respiratoire syncytial chez les enfants en détresse respiratoire dans le milieu des années 1980. Son utilisation seule a un effet minimal sur la virémie du VHC mais la RBV a montré une activité contre l'hépatite B dans les années 90,<sup>8</sup> puis en 2010 contre l'hépatite E.<sup>9</sup>

Néanmoins, les premières réponses virales soutenues (RVS ; définie comme la proportion de patients présentant un niveau indétectable de l'ARN du virus de l'hépatite C) au traitement du VHC par l'IFN- $\alpha$  de l'ordre de 10-15% ont été sensiblement améliorées lors de son utilisation en bithérapie avec la RBV, permettant d'atteindre un taux d'éradication du virus de 40%.<sup>10</sup> Par la suite, l'utilisation de

<sup>5</sup> Hoofnagle, J.; Mullen, K.; Jones, D.; Rustgi, V.; Bisceglie, A.; Peters, M.; Waggoner, J.; Park, B.; Jones, E. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315* (25), 1575–1578.

<sup>6</sup> Witkowski, J. T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (11), 1150–1154.

<sup>7</sup> Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K. *Science* **1972**, *177*, 705–706.

<sup>8</sup> Fried, M. W.; Fong, T. L.; Swain, M. G.; Park, Y.; Beames, M. P.; Banks, S. M.; Hoofnagle, J. H.; Di Bisceglie, A. M. *J. Hepatol.* **1994**, *21* (2), 145–150.

<sup>9</sup> Kamar, N.; Rostaing, L.; Abravanel, F.; Garrouste, C.; Lhomme, S.; Esposito, L.; Basse, G.; Cointault, O.; Ribes, D.; Nogier, M. B.; Alric, L.; Peron, J. M.; Izopet, J. *Gastroenterology* **2010**, *139* (5), 1612–1618.

<sup>10</sup> Fried, M.; Shiffman, M. L.; Reddy, K. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347* (13), 975–982.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

l'IFN- $\alpha$  pegylé (PegIFN $\alpha$ , Figure 4), permettant d'augmenter sa demi-vie, a permis d'atteindre en bithérapie avec la RBV une RVS entre 50 et 80% selon les génotypes.<sup>11,12</sup>

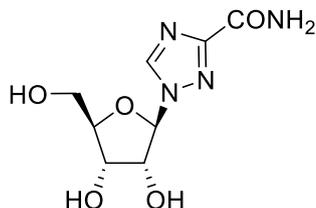


Figure 3: Structure de la ribavirine

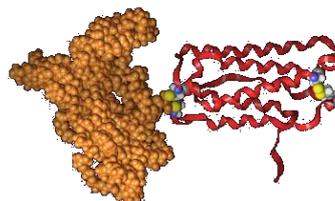


Figure 4: Structure de l'interféron-alpha pegylé

### 2.2. Modes d'action de la ribavirine

Bien que la ribavirine ait une activité antivirale contre beaucoup de pathologies et qu'elle joue clairement un rôle dans l'élimination du VHC, son mécanisme d'action reste controversé. En effet, il existe différents mécanismes d'action proposés dans le cas de l'action de la RBV contre le VHC dont voici les quatre principaux :

- L'inhibition de l'ARN-polymérase par l'intermédiaire du métabolite triphosphorylé, la ribavirine triphosphate (RTP). Ce dernier s'incorporerait dans l'ARN viral et entraînerait ainsi des terminaisons.<sup>13,14,15</sup>
- L'inhibition de l'inosine-5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH), responsable de la synthèse *de novo* de guanosine triphosphate (GTP), par l'intermédiaire du métabolite monophosphorylé, la ribavirine monophosphate (RMP). La RMP inhiberait l'enzyme en se liant au site de reconnaissance du substrat, entraînant une diminution du réservoir de GTP de l'hôte et bloquerait ainsi la réplication de l'ARN viral.<sup>16</sup>
- La RBV agirait comme un agent mutagène de l'ARN viral. Cette hypothèse a été soulevée en 2001 par Crotty *et al.*<sup>17</sup> avançant que les virus à ARN tels que le VHC ont des taux d'erreurs de réplication très élevés et l'incorporation de RTP permettrait d'augmenter encore ce taux jusqu'à mener au point d'erreurs-catastrophes, c'est-à-dire l'extinction du virus suite à des mutations excessives de son ARN.
- La RBV transformerait la réponse immunitaire en une réponse immunitaire plus bénéfique induite par les cellules T de type 1. En effet, il a été montré que la RBV favorise la production des cytokines de type 1 et diminue l'expression des cytokines de type 2 dans les cellules T humaines.<sup>18</sup>

Bien qu'il y ait des arguments permettant de supporter chacun de ces mécanismes, aucun n'a été clairement identifié comme étant le mécanisme principal impliqué dans la réponse anti-VHC

<sup>11</sup> Heathcote, E. J.; Shiffman, M. L.; Cooksley, W. G. E.; Dusheiko, G. M.; Lee, S. S.; Balart, L.; Reindollar, R.; Reddy, R. K.; Wright, T. L.; Lin, A.; Hoffman, J.; De Pamphilis, J. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (23), 1673–1680.

<sup>12</sup> Lindsay, K. L.; Trepo, C.; Heintges, T.; Shiffman, M. L.; Gordon, S. C.; Hoefs, J. C.; Schiff, E. R.; Goodman, Z. D.; Laughlin, M.; Yao, R.; Albrecht, J. K. *Hepatology* **2001**, *34* (2), 395–403.

<sup>13</sup> Vo, N. V.; Young, K.-C.; Lai, M. M. C. *Biochemistry* **2003**, *42* (35), 10462–10471.

<sup>14</sup> Maag, D.; Castro, C.; Hong, Z.; Cameron, C. E. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (49), 46094–46098.

<sup>15</sup> Bougie, I.; Bisailon, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (52), 52471–52478.

<sup>16</sup> Lowe, J. K.; Brox, L.; Henderson, J. F. *Cancer Res.* **1977**, *37* (3), 736–743.

<sup>17</sup> Crotty, S.; Cameron, C. E.; Andino, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (12), 6895–6900.

<sup>18</sup> Tam, R. C.; Lau, J. Y.; Hong, Z. *Antivir. Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 261–272.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

induite par la RBV. De plus, les multiples mécanismes plausibles pourraient également permettre d'expliquer l'activité antivirale à spectre large du nucléoside.

### 2.3. Les agents antiviraux directs (AADs) et la multithérapie

A partir des années 2000, de nouveaux types de composés, appelés agents antiviraux directs (AADs), ont été développés pour le traitement du VHC. Ces composés ont montré une réponse virale soutenue (RVS) plus importante que la simple association interféron-pegylé et ribavirine (Figure 5), et ce durant un traitement plus court (8 à 12 semaines contre 24 à 48 semaines).<sup>19</sup>

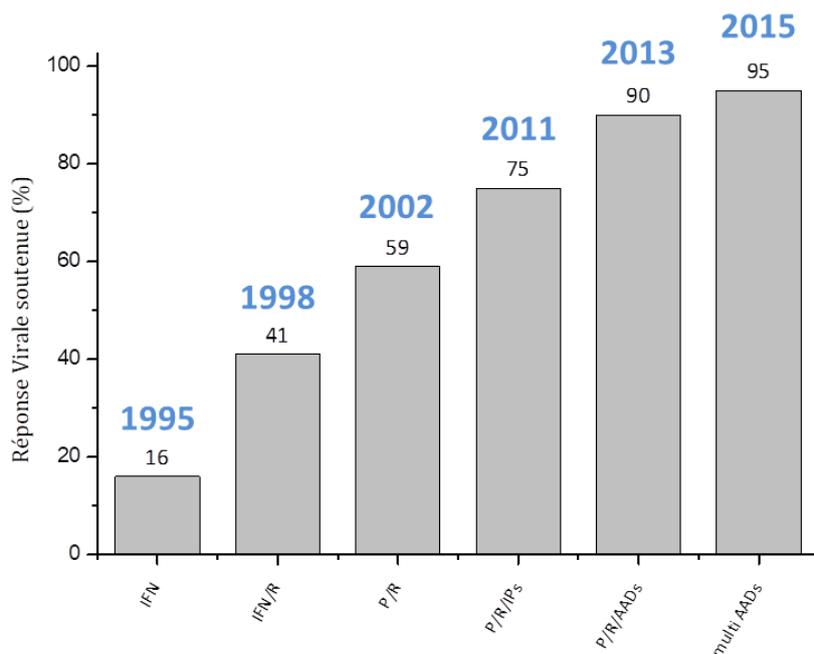


Figure 5: Evolution de la réponse virologique selon les traitements et années de mise sur le marché (bleu)<sup>19,20</sup>  
IFN: interféron ; R: ribavirine ; P : interféron pegylé ; IPs: inhibiteurs de protéases ; AADs: agents antiviraux directs

Les AADs sont des composés permettant l'élimination du VHC par l'inhibition des enzymes nécessaires à la réplication du virus. On retrouve ainsi les inhibiteurs de protéases (IPs) bloquant les enzymes NS3 et NS4A, les inhibiteurs de polymérase agissant sur l'enzyme NS5B, et les inhibiteurs de l'enzyme NS5A.<sup>19</sup>

Les AADs de première génération étaient des inhibiteurs de protéases (IPs), capables de bloquer les protéases virales NS3 et NS4A (Figure 6). Ces enzymes sont responsables du séquençage de la polyprotéine virale, libérant les différentes protéines non-structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) pour leur maturation. La découverte de deux AADs, le Boceprevir (bloquant l'hydroxysérine de la protéase NS3/4A)<sup>21</sup> et le Telaprevir, ainsi que leur mise sur le marché en trithérapie avec PegIFN $\alpha$ /RBV en 2011, a permis d'atteindre une RVS d'environ 60-75% en 24 semaines sur les patients atteints du VHC de génotype 1. Malgré leur relative efficacité, ces composés entraînaient des effets indésirables notamment des réactions cutanées telles que le syndrome de Stevens-Johnson dans le cas du Telaprevir. Suite à l'apparition des AADs de nouvelle génération, leur production a été arrêtée en 2014 pour le Telaprevir et en 2015 pour le Boceprevir. En 2013, la FDA a approuvé

<sup>19</sup> Li, G.; De Clercq, E. *Antiviral Res.* **2017**, *142*, 83–122.

<sup>20</sup> Manns, M. P.; Wedemeyer, H.; Cornberg, M. *Gut* **2006**, *55* (9), 1350–1359.

<sup>21</sup> Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Shih, N.-Y.; Piwinski, J. J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 50–59.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

l'utilisation d'un IP de deuxième génération, le Simeprevir. Lors des phases cliniques, son association avec le Sofosbuvir (inhibiteur de polymérase) a permis d'atteindre une RVS de 85-95 % pour les patients atteints du VHC de génotypes 1 et 4 en 12 semaines alors que son utilisation avec PegIFN $\alpha$ /RBV a montré une réponse de 70-80 % chez les patients atteints du génotype 1. De plus, un traitement par simeprevir/PegIFN $\alpha$ /RBV pendant 12 semaines, suivi de 36 semaines par PegIFN $\alpha$ /RBV a également été autorisé pour les patients co-infectés au VIH et VHC.

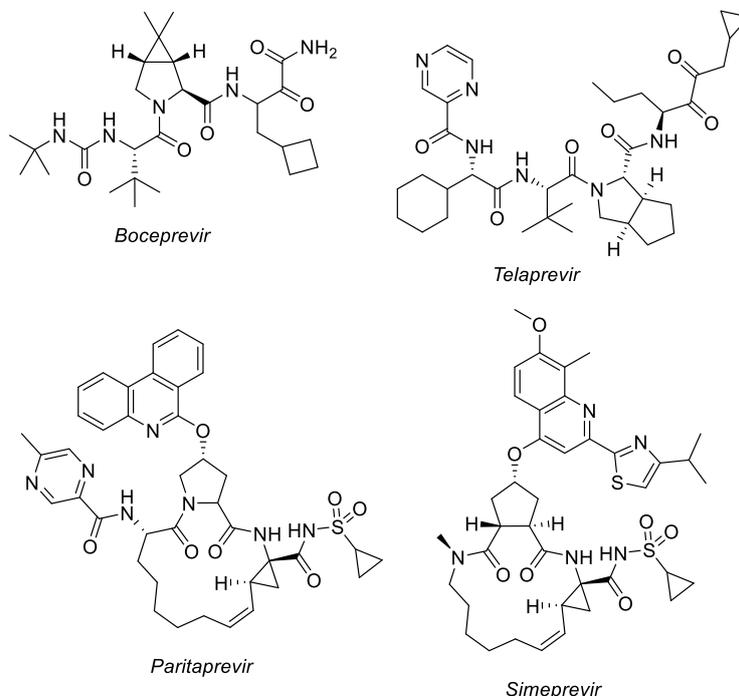


Figure 6: Principaux inhibiteurs de protéases NS3 et NS4A (IPs)

Les AADs inhibiteurs de polymérase NS5B existent sous deux formes (Figure 7) : les inhibiteurs nucléosidiques capables de se fixer dans le site catalytique de l'enzyme et d'entrer en compétition avec les nucléosides triphosphates afin d'entraîner une terminaison c'est-à-dire l'arrêt de la synthèse de l'ARN viral. Le Sofosbuvir est l'inhibiteur nucléosidique de polymérase le plus répandu. Cette prodrogue phosphoramidate de la  $\beta$ -D-2'-désoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-méthyluridine est le premier analogue de nucléoside inhibiteur de NS5B à avoir été accepté par la FDA en 2013. Ce composé présente une activité pan-génotypique et son association avec PegIFN $\alpha$ /RBV permet d'atteindre des RVS de l'ordre de 90-95 % sur 12 semaines.<sup>22</sup> De plus, son utilisation avec la RBV dans le cas de patients présentant des infections récurrentes au VHC après des transplantations hépatiques a montré une efficacité correcte, de l'ordre de 60 % pour 12 semaines. La deuxième forme d'inhibiteurs de polymérase NS5B correspond à des composés non-nucléosidiques capables d'interagir avec le site allostérique de l'enzyme et d'inhiber la synthèse d'ARN viral.<sup>23</sup> Un exemple de ce type d'inhibiteur est le Dasabuvir dont l'utilisation avec l'Ombitasvir (Figure 8, inhibiteur de NS5A) et le Paritaprevir (Figure 6, inhibiteur de protéase) a été accepté par la FDA en 2014. Cette première trithérapie a permis d'améliorer de manière significative le traitement des patients atteints du VHC de génotype 1 avec des RVS de l'ordre de 95 %.

<sup>22</sup> Lawitz, E.; Mangia, A.; Wyles, D.; Rodriguez-Torres, M.; Hassanein, T.; Gordon, S. C.; Schultz, M.; Davis, M. N.; Kayali, Z.; Reddy, K. R.; Jacobson, I. M.; Kowdley, K. V.; Nyberg, L.; Subramanian, G. M.; Hyland, R. H.; Arterburn, S.; Jiang, D.; McNally, J.; Brainard, D.; Symonds, W. T.; McHutchison, J. G.; Sheikh, A. M.; Younossi, Z.; Gane, E. J. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368* (20), 1878–1887.

<sup>23</sup> Götte, M.; Feld, J. J. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13* (6), 338–351.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

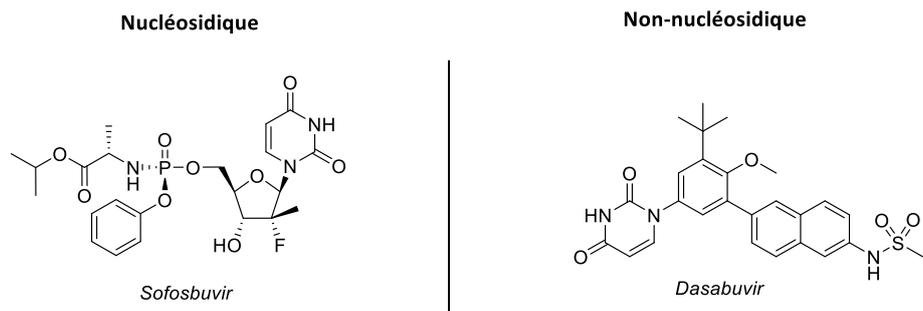


Figure 7: Principaux inhibiteurs de polymérase NS5B

Enfin, les inhibiteurs d'enzyme NS5A (Figure 8) ont un effet qui reste controversé. Leur utilisation pourrait inhiber la formation d'un complexe de réplication dans le réticulum endoplasmique<sup>24</sup> mais également bloquer la synthèse d'ARN viral et perturber l'assemblage des virions en inhibant l'arrivée du génome viral sur les sites d'assemblages<sup>25</sup>. Le Ledipasvir est un exemple d'inhibiteur de NS5A dont l'association avec le Sofosbuvir a été acceptée par la FDA en 2014 sous le nom Harvoni®. L'efficacité de l'association Ledipasvir/Sofosbuvir avec ou sans RBV a été démontrée dans de nombreuses études cliniques permettant d'atteindre d'excellentes RVS de 90-100 % en 12 semaines pour les génotypes 1, 4, 5 et 6. Par ailleurs, l'utilisation en trithérapie de Ledipasvir/Sofosbuvir/RBV a montré des réponses importantes (supérieures à 85 %) chez des patients atteints de cirrhose décompensée avant et après transplantation hépatique. Par la suite, le Daclatasvir a été identifié comme inhibiteur de l'enzyme NS5A mais a également montré un possible effet synergique dans le traitement du VHC.<sup>26</sup> Son association avec Sofosbuvir a été acceptée par la FDA en 2015, permettant d'atteindre des RVS supérieures à 90 % en 12 semaines quel que soit le génotype, l'avancée de la cirrhose, la possibilité de transplantation hépatique ou la co-infection VIH/VHC.<sup>27</sup>

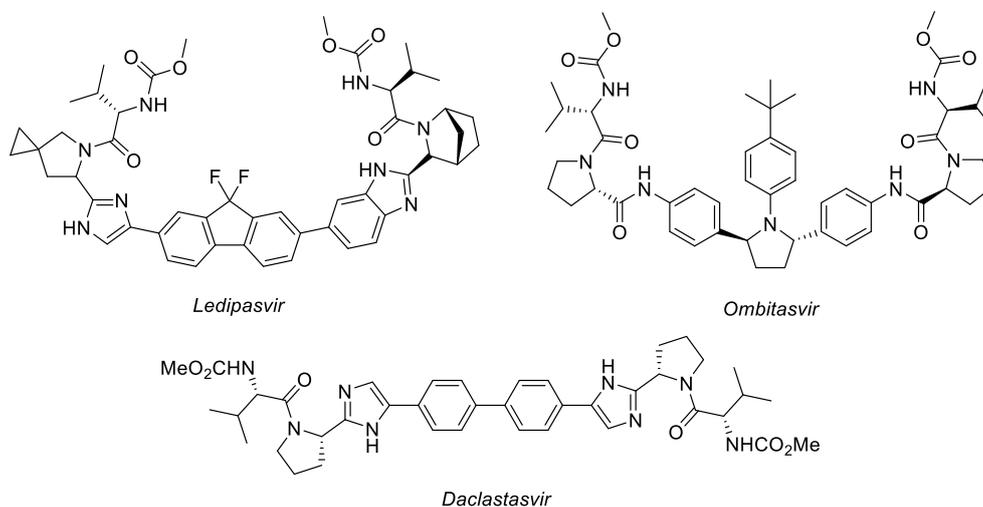


Figure 8: Principaux inhibiteurs de NS5A

<sup>24</sup> Nettles, J. H.; Stanton, R. A.; Broyde, J.; Amblard, F.; Zhang, H.; Zhou, L.; Shi, J.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Coats, S. J.; Kohler, J. J.; Schinazi, R. F. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (23), 10031–10043.

<sup>25</sup> Bosen, B.; Denolly, S.; Turlure, F.; Chamot, C.; Dreux, M.; Cosset, F. L. *Gastroenterology* **2017**, *152* (4), 895–907.

<sup>26</sup> Sun, J.-H.; O'Boyle II, D. R.; Fridell, R. A.; Langley, D. R.; Wang, C.; Roberts, S. B.; Nower, P.; Johnson, B. M.; Moulin, F.; Nophsker, M. J.; Wang, Y.-K.; Liu, M.; Rigat, K.; Tu, Y.; Hewawasam, P.; Kadow, J.; Meanwell, N. A.; Cockett, M.; Lemm, J. A.; Kramer, M.; Belema, M.; Gao, M. *Nature* **2015**, *527* (7577), 245–248.

<sup>27</sup> Fontana, R. J.; Hughes, E.; Bifano, M. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13* (6), 1601–1605.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

Ainsi, le traitement de référence PegIFN $\alpha$ /RBV utilisant un antiviral à spectre large a peu à peu laissé place à des traitements utilisant des AADs, permettant d'atteindre des RVS plus importantes sur un temps de traitement plus court. Néanmoins, même si l'IFN a totalement disparu des traitements préconisés, les AADs restent associés à la RBV dans certains cas.

### 3. Inconvénient des traitements actuels

Les traitements actuels utilisent donc la RBV et les AADs, souvent en multithérapie afin d'être efficaces sur plusieurs cibles mais également pour pouvoir agir sur des virus de génotypes différents. Malheureusement, cela entraîne des coûts de traitement très élevés (Tableau 1) qui freinent considérablement l'accès au soin. L'AAD le plus répandu est certainement le Sofosbuvir qui, en plus d'être efficace, présente l'avantage d'être actif sur la plupart des génotypes, et est administrable par voie orale. Commercialisé par Gilead Sciences sous le nom de Sovaldi®, le prix initial du Sofosbuvir était de \$84 000 pour 12 semaines de traitement.<sup>28</sup> La bithérapie Ledipasvir/Sofosbuvir également commercialisée par Gilead Science sous le nom Harvoni® était, quant à elle, à un prix estimé de \$94 500 pour 12 semaines de traitement.<sup>28</sup>

Le deuxième inconvénient majeur est la présence d'effets secondaires engendrés par la prise de ces traitements. Les premiers AADs entraînaient des effets secondaires majeurs comme le syndrome de Stevens-Johnson dans le cas du Telaprevir qui a été retiré par la suite. Les AADs de deuxième génération entraînent des effets secondaires moins graves telles des céphalées, de la fatigue, des insomnies et parfois des diarrhées (Tableau 1). Néanmoins, les AADs sont encore utilisés en association avec la RBV pour certaines populations, cette dernière présentant des effets secondaires tels que des anémies.<sup>20</sup>

Agent Antiviral Direct	Nom commercial	Fabricant	Prix Global (12 semaines) <sup>29</sup>	Effets indésirables <sup>19</sup>
Sofosbuvir	Sovaldi	Gilead Sciences	\$84 000	Fatigue, céphalées, nausées, insomnie et anémie
Ledipasvir/Sofosbuvir	Harvoni	Gilead Sciences	\$94 500	Céphalées, fatigue, asthénie
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir/Dasabuvir	Viekira Pak	AbbVie	\$83 000	Fatigue, nausée, éruption cutanée, prurit, insomnie, asthénie
Daclatasvir/Sofosbuvir	Daklinza/Sovaldi	Bristol-Myers Squibb et Gilead	\$147 000	Céphalées, fatigue
Grazoprevir/Elbasvir	Zepatier	Merck	\$54 600	Fatigue, douleurs abdominales, diarrhées, dépression

Tableau 1: Tableau récapitulatif des prix globaux (USA) et des effets indésirables des principaux traitements par AADs

<sup>28</sup> Iyengar, S.; Tay-Teo, K.; Vogler, S.; Beyer, P.; Wiktor, S.; de Joncheere, K.; Hill, S. *PLoS Med.* **2016**, *13* (5), 1–22.

<sup>29</sup> Rosenthal, E. S.; Graham, C. S. *Infect. Agent. Cancer* **2016**, *11* (1), 24.

## Introduction : Virus de l'Hépatite C

Enfin, même si l'augmentation de l'activité antivirale et les excellentes réponses virales soutenues apportées par ces traitements sont incontestables, leurs effets sur le long terme notamment dans le cas de co-infections ou de la prise de plusieurs traitements restent méconnus. Néanmoins, certaines études font état de divers événements pouvant être liés à l'utilisation combinée d'AADs avec d'autres traitements. Dyson *et al.*<sup>30</sup> ont ainsi observé l'apparition de dommages hépatiques lors de l'utilisation de l'association Sofosbuvir/RBV chez un patient suivant un traitement pour le VIH (Atripla®) et souffrant de cirrhose décompensée. En outre, en 2015 certains cas d'arythmies cardiaques ont été rapportés par l'Agence Européenne des Médicaments lors de l'utilisation de Daclatasvir/Sofosbuvir chez des patients traités par des médicaments bradycardisants tel l'Amiodarone.<sup>31</sup> D'autres cas d'arythmies ont également été observés lors de l'utilisation du Sofosbuvir seul et d'Amiodarone obligeant le fabricant à exprimer une mise en garde.

Pour toutes ces raisons et plus particulièrement à cause des effets secondaires et de possibles interactions médicamenteuses, l'amélioration du traitement du virus de l'hépatite C pourrait impliquer des pharmacomodulations améliorant la stabilité ou diminuant la toxicité des composés. Des stratégies de vectorisation peuvent également être envisagées afin d'améliorer l'activité antivirale tout en diminuant les effets indésirables.

Ce projet s'inscrit ainsi dans une optique d'amélioration de l'activité d'un C-nucléoside, le SRO91, présentant une activité anti-VHC et développé au laboratoire. La stratégie envisagée utilise la conjugaison avec des galactosides en tant qu'adresseurs, permettant de cibler spécifiquement des récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes, ainsi que l'utilisation de peptides membranotropes tels que les peptides de fusion du VHC (Figure 9). Ces deux axes développés parallèlement ont pour but d'apporter une preuve de concept sur l'utilisation de tels composés pour l'amélioration de l'activité, mais également d'essayer d'identifier le potentiel des peptides de fusion du VHC en tant qu'agents de pénétration cellulaire.

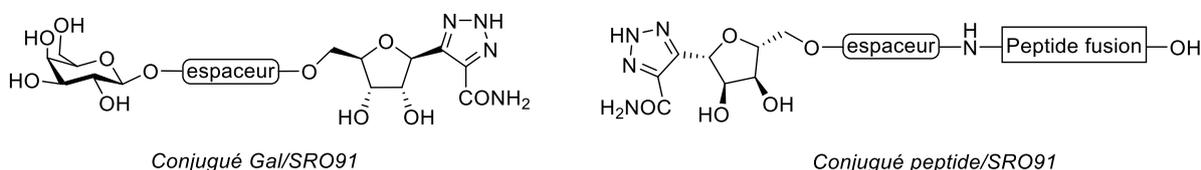


Figure 9: Schéma des conjugués envisagés

<sup>30</sup> Dyson, J. K.; Hutchinson, J.; Harrison, L.; Rotimi, O.; Tiniakos, D.; Foster, G. R.; Aldersley, M. A.; McPherson, S. J. *Hepatol.* **2016**, *64* (1), 234–238.

<sup>31</sup> ANSM.Finalisation de la réévaluation des médicaments contenant de l'ambroxol ou de la bromhexine, retour d'information sur le PRAC de janvier 2015 - Point d'information <http://ansm.sante.fr/S-informer/Travaux-de-l-Agence-Europeenne-des-Medicaments-EMA-Comite-pour-l-evaluation-des-risques-en-matiere-de-pharmacovigilance-PRAC/Finalisation-de-la-reevaluation-des-medicaments-contenant-de-l-ambroxol-ou-de-la-bromhexine-retour>(accessed Aug10,2017).

# **Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale**



### Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

L'amélioration de l'activité biologique d'un composé peut passer par des modifications structurales ponctuelles. Dans le cas des antiviraux nucléosidiques, cela peut concerner la modification du lien glycosidique (*C*-nucléosides), des modifications sur le sucre (en position 1' ou 2') ou encore des fonctionnalisations sur l'hétérocycle. Une autre voie pour l'amélioration de l'activité d'un nucléoside est sa délivrance *via* différents systèmes : des prodrogues, des nanovecteurs ou des conjugués avec des adresseurs.

#### 1. *C*-nucléoside et stabilité

Les *C*-nucléosides sont des analogues de nucléosides dont la fonction aminal (avec le lien C-N en position anomère entre le sucre et la base) a été remplacée par une fonction éther (Figure 10).

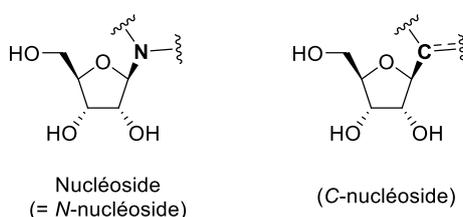


Figure 10: *N*- et *C*-nucléosides

Il existe quelques exemples de *C*-nucléosides naturels : la pseudouridine, isolée de l'ARN de transfert, ou encore les formycines A et B, ainsi que la showdomycine (Figure 11).<sup>32</sup>

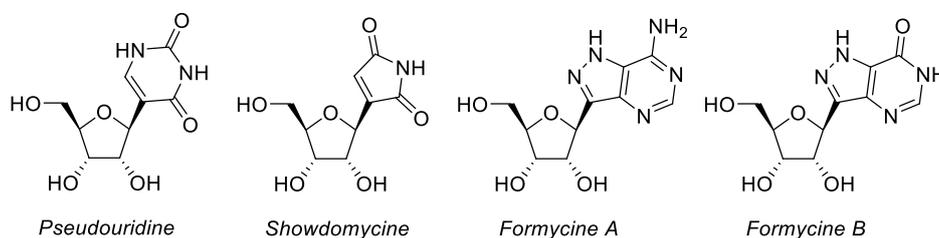
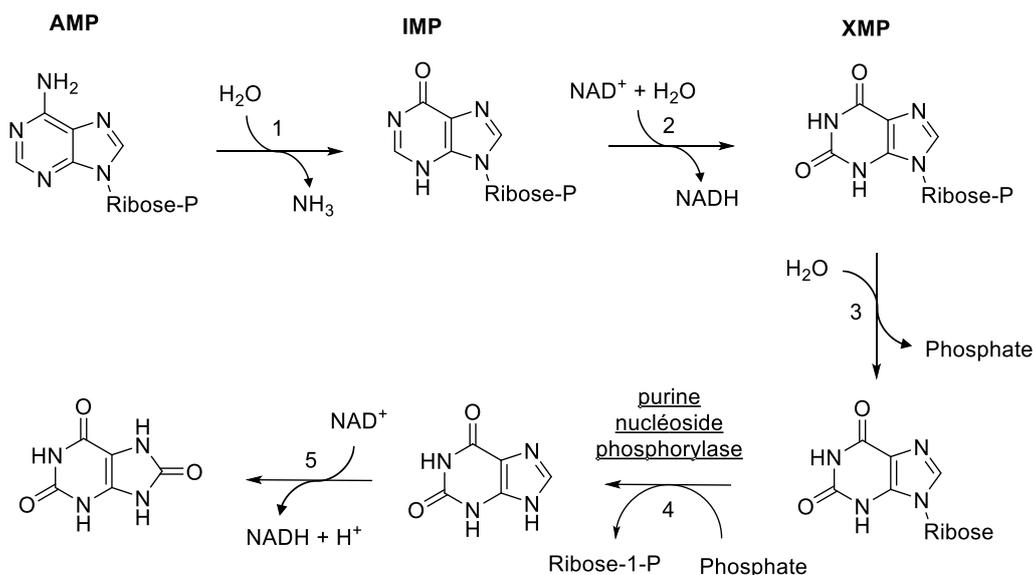


Figure 11: *C*-nucléosides isolés de sources naturelles

Outre des activités biologiques détaillées plus loin, les *C*-nucléosides présentent l'avantage d'être stables à l'hydrolyse acide et enzymatique contrairement à leurs homologues azotés. Ils sont ainsi résistants à la dégradation par les phosphorylases coupant le lien *N*-glycosidique entre le sucre et la base correspondante (Etape 4 du cycle de dégradation de l'adénosine, Schéma 1).

<sup>32</sup> Townsend, L. B. *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Springer US: Boston, MA 1994.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale



**Schéma 1 : Cycle de dégradation de l'adénosine**

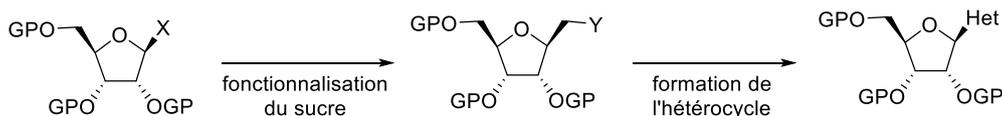
Les différentes réactions sont catalysées par les enzymes suivantes : AMP désaminase (1), IMP déshydrogénase (2), 5'-nucléotidase (3), purine nucléoside phosphorylase (4), et xanthine déshydrogénase/oxydase (5).

AMP = adénosine monophosphate ; IMP = inosine monophosphate ; XMP = xanthine monophosphate ; NAD = nicotinamide adénine dinucléotide

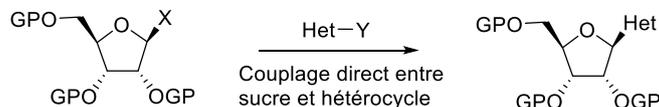
### 1.1. Synthèse des C-nucléosides

La synthèse des C-nucléosides passe par la formation d'un lien C-C entre un sucre, principalement le ribose sous sa forme protégée, et un hétérocycle analogue d'une base. Trois stratégies principales peuvent ainsi être envisagées : (i) la création du lien C-C à partir d'un sucre puis la formation de l'hétérocycle, (ii) un couplage direct entre le sucre et l'hétérocycle, et enfin (iii) la fonctionnalisation d'un hétérocycle suivie de la construction du sucre (Schéma 2).<sup>33</sup>

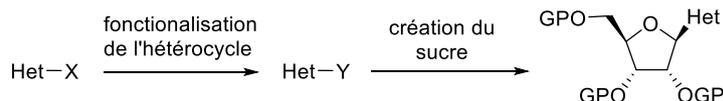
#### Méthode 1:



#### Méthode 2:



#### Méthode 3:



**Schéma 2 : Schéma des différentes méthodes de préparation des C-nucléosides**

<sup>33</sup> Boutureira, O.; Matheu, M. I.; Díaz, Y.; Castellón, S. In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; 263–316.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 1.1.1. Synthèse à partir du sucre

Il existe de nombreuses méthodes permettant la création d'une liaison C-C en position anomère d'un sucre. L'une des stratégies les plus simples consiste à réaliser une substitution nucléophile en position anomère à partir de 1-*O*-acétyl-, 1-chloro- ou encore 1-séloglycosides dans le cas de réactions radicalaires. Ces réactions permettent d'accéder aux composés 1-cyano-, 1-carboxy- (Schéma 3), 1-alcényl- ou 1-alcynylglycoside *via* des réactions avec des organométalliques (Schéma 4).

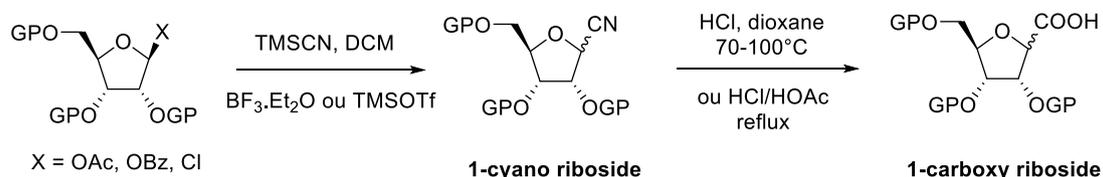


Schéma 3 : Formation des 1-cyano et 1-carboxyglycosides

Ces fonctionnalisations serviront ensuite de base pour la formation d'hétérocycles par différents aménagements fonctionnels.

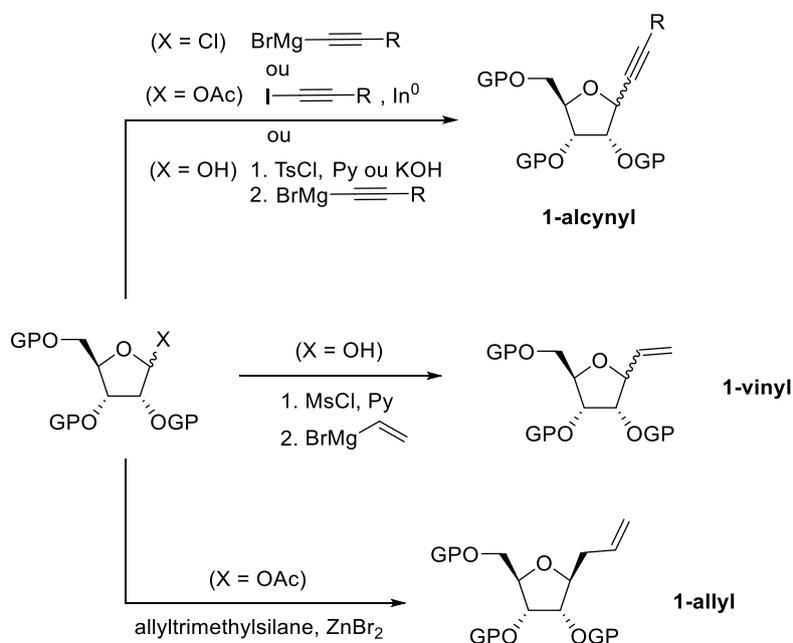


Schéma 4 : Synthèse des 1-alcényl- et 1-alcényl glycosides

Ramasamy *et al.*<sup>34</sup> ont ainsi rapporté la synthèse de la tiazofurine, un C-nucléoside présentant une activité antitumorale, à partir d'un 1-cyanoribofuranose et du chlorhydrate de l'ester éthylique de la cystéine (Schéma 5).

<sup>34</sup> Ramasamy, K. S.; Bandaru, R.; Averett, D. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (18), 5849–5851.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

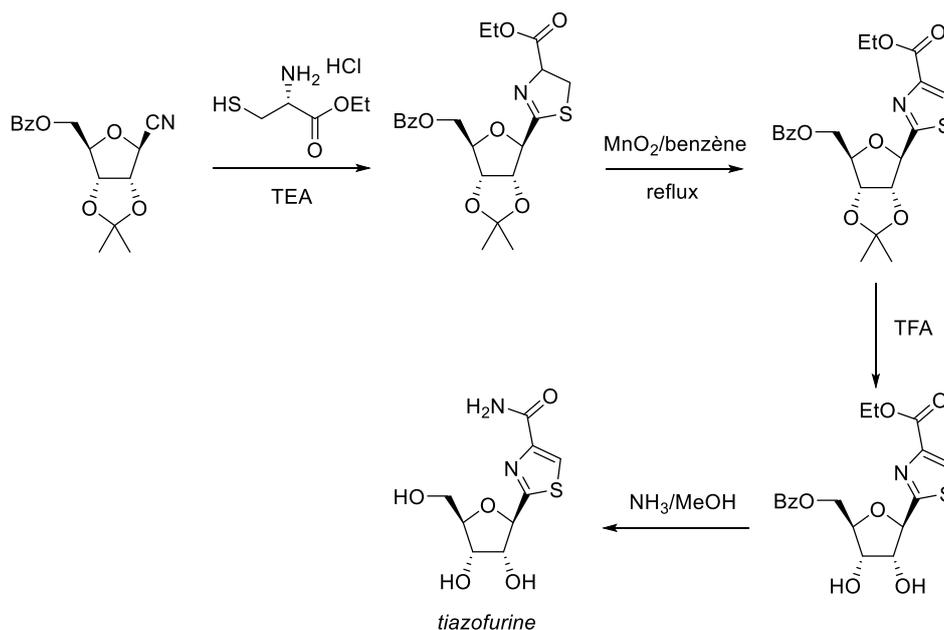


Schéma 5 : Synthèse de la tiazofurine à partir d'un 1-cyanoribofuranose

La deuxième principale stratégie utilisée pour créer un lien C-C sur la position anomère d'un glycoside est une réaction avec la fonction aldéhyde du sucre. Il est ainsi possible de faire intervenir l'aldéhyde dans une réaction multicomposante de type cyclocondensation aldolique comme la synthèse de Hantzsch permettant la formation des 1,4-dihydropyridines,<sup>35</sup> ou la réaction de Biginelli donnant accès aux dihydropyrimidinones (Schéma 6).<sup>36</sup>

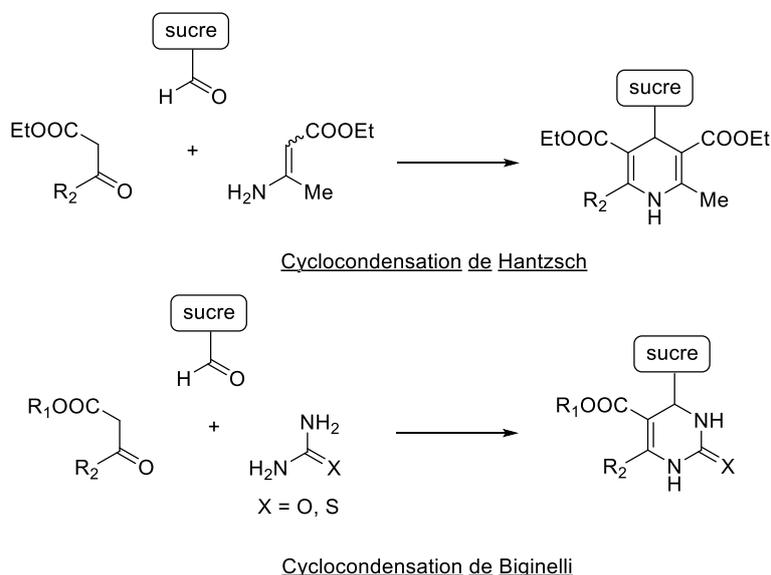


Schéma 6 : Synthèse d'un C-nucléoside par réaction multicomposante à partir de la forme aldéhyde d'un sucre

La fonction aldéhyde d'un sucre peut également réagir selon des réactions d'oléfination de Wittig comme la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons ou une réaction tandem Wittig-Michael. Comme les réactions de substitution en position anomère, les oléfination permettent d'accéder à des

<sup>35</sup> Dondoni, A.; Massi, A.; Aldhoun, M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (20), 7677–7687.

<sup>36</sup> Dondoni, A.; Massi, A.; Sabbatini, S.; Bertolasi, V. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (20), 6979–6994.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

1-alcényl-*C*-glycosides qui peuvent ensuite subir diverses modifications afin de créer un hétérocycle pour obtenir le *C*-nucléoside final.

Butora *et al.*<sup>37</sup> ont ainsi synthétisé la 9-déaza-2'-*C*-méthyladénosine en faisant réagir un 2'-*C*-ribose protégé avec le cyanométhylphosphonate de diéthyle par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons, suivie d'une addition intramoléculaire pour former le *C*-glycoside. Le cycle pyrrolique a ensuite été construit par une réaction de Claisen avec le formiate de méthyle, puis une cyclisation de Kirsch en présence de DBU (Schéma 7).

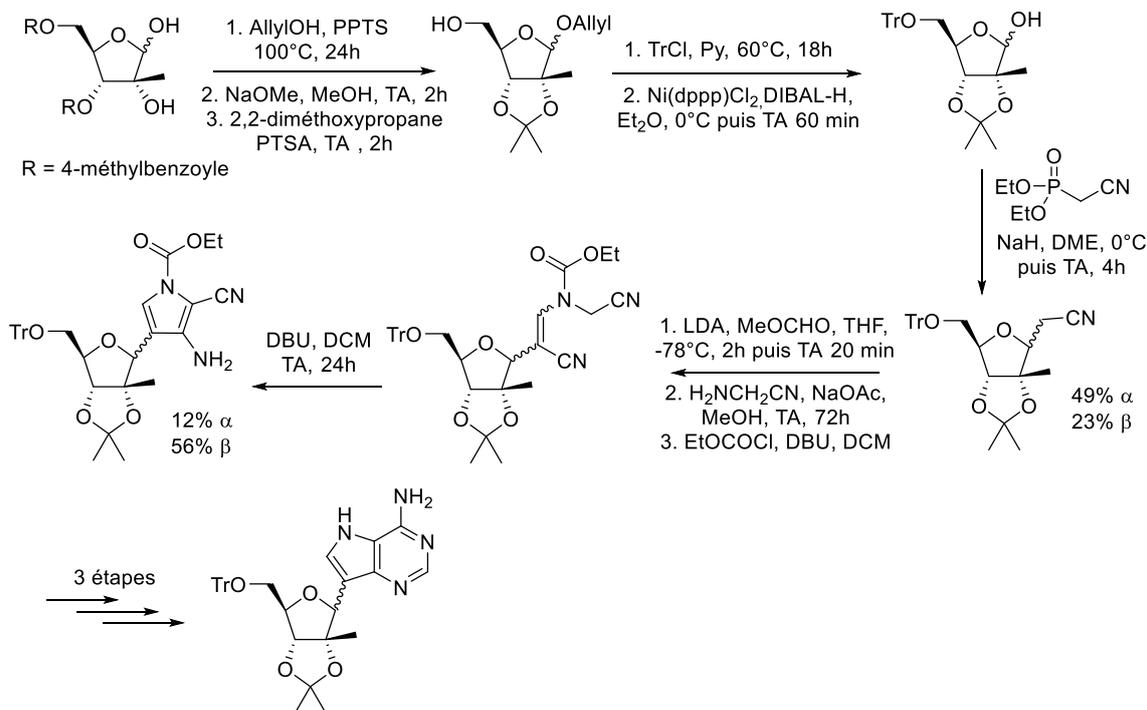


Schéma 7 : Synthèse de la 9-déaza-2'-*C*-méthyladénosine

### 1.1.2. Synthèse par couplage entre le sucre et l'hétérocycle

La deuxième stratégie pour la synthèse des *C*-nucléosides consiste à réaliser une réaction de couplage entre le sucre protégé et un hétérocycle déjà fonctionnalisé.

Le lien C-C peut, par exemple, être créé en effectuant des réactions faisant intervenir des réactifs organométalliques telles que des substitutions sur des halofuranoses,<sup>38</sup> des additions sur la fonction aldéhyde de furanose<sup>39,40</sup> ou encore sur la fonction lactone de furanone<sup>39,41</sup> (Schéma 8).

<sup>37</sup> Butora, G.; Olsen, D. B.; Carroll, S. S.; McMasters, D. R.; Schmitt, C.; Leone, J. F.; Stahlhut, M.; Burlein, C.; MacCoss, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (15), 5219–5229.

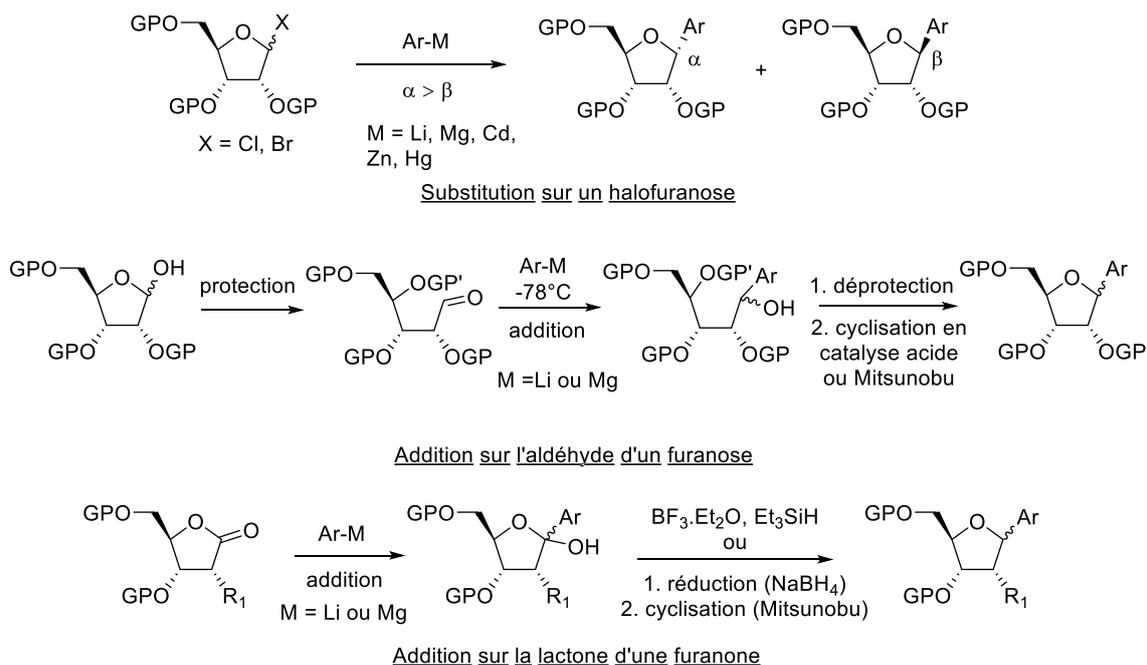
<sup>38</sup> Hocek, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 9914–9921.

<sup>39</sup> Krohn, K.; Heins, H.; Wielckens, K. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (3), 511–517.

<sup>40</sup> Harusawa, S.; Murai, Y.; Moriyama, H.; Imazu, T.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (13), 4405–4411.

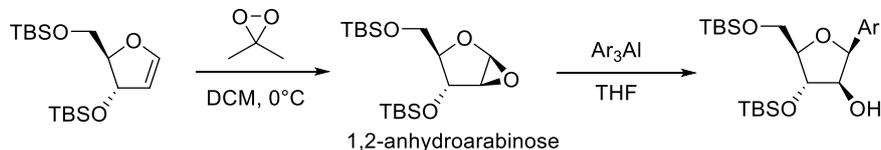
<sup>41</sup> Hildbrand, S.; Blaser, A.; Parel, S. P.; Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (24), 5499–5511.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale



**Schéma 8 : Couplage entre un sucre et un hétérocycle faisant intervenir des organométalliques**

Le couplage entre un glycoside et un hétérocycle peut également être effectué en utilisant un époxyde, lui-même obtenu à partir du glycal correspondant. Néanmoins, l'époxydation de furanoglycals s'effectuant préférentiellement en *anti* du substituant en position 3, cette méthode ne permet d'obtenir que des 1,2-anhydroarabinoses (Schéma 9).<sup>42</sup>



**Schéma 9 : Synthèse d'un C-arabino-furanoside passant par un intermédiaire époxyde**

Les réactions de substitution allylique catalysée au palladium, molybdène, tungstène, ruthénium, rhodium ou encore iridium, sont également d'excellents moyens d'obtenir des C-nucléosides. En effet, les réactions pallado-catalysées développées par Trost<sup>43,44</sup> sont des outils permettant la synthèse de différents nucléosides avec une excellente énantiosélectivité. La L-showdomycine a ainsi été synthétisée à partir du 2,5-dibenzoyloxy-2,5-dihydrofurane en utilisant une réaction de substitution allylique (Schéma 10).<sup>45</sup>

<sup>42</sup> Singh, I.; Seitz, O. *Org. Lett.* **2006**, 8 (19), 4319–4322.

<sup>43</sup> Trost, B. M. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 5813–5837.

<sup>44</sup> Trost, B. M.; Machacek, M. R.; Aponick, A. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39 (10), 747–760.

<sup>45</sup> Trost, B. M.; Kallander, L. S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (15), 5427–5435.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

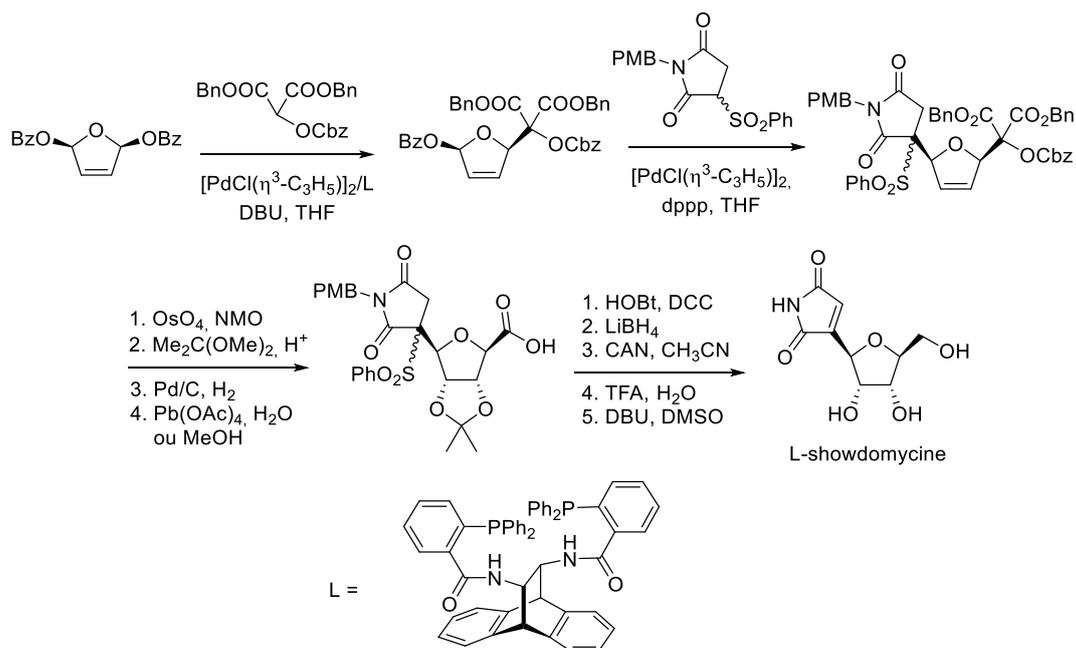


Schéma 10 : Synthèse de la L-showdomycine utilisant une substitution allylique pallado-catalysée

La création d'un lien C-C entre le sucre et un hétérocycle peut également être réalisée par couplage pallado-catalysé. Un couplage de Heck entre un glycal et un composé haloaromatique permet ainsi d'obtenir des 2'-désoxy-C-nucléosides.

Zhang *et al.*<sup>46</sup> ont ainsi synthétisé la 2'-désoxypseudouridine à partir d'un furanoglycal et de 5-iodouracile en présence de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{AsPh}_3$  suivi d'un traitement par le fluorure de tétrabutylammonium et de triacétoxyborohydrure de sodium (Schéma 11).

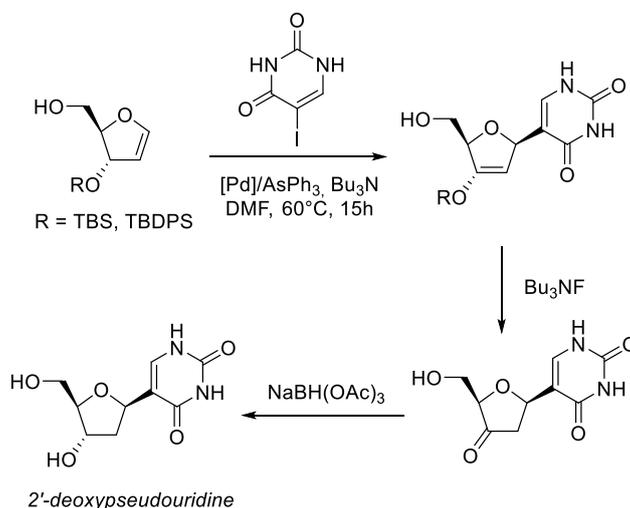


Schéma 11 : Synthèse de la 2'-désoxypseudouridine en utilisant un couplage de Heck

Enfin, les réactions de couplage catalysées par des acides de Lewis telles que la réaction de Friedel-Crafts constituent aussi une approche simple pour la préparation des C-nucléosides, particulièrement dans le cas des sucres activés grâce à la formation d'oxonium (Schéma 12). Néanmoins ces réactions ont généralement un rendement moyen de l'ordre de 40 % et ne sont pas toujours diastéréosélectives.

<sup>46</sup> Zhang, H. C.; Daves, G. D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (17), 4690–4696.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

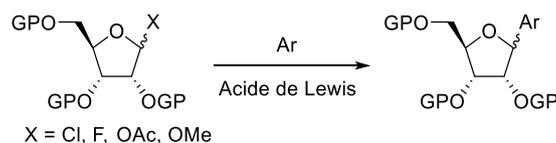


Schéma 12 : Préparation de C-nucléosides par réaction de Friedel-Crafts

### 1.1.3. Synthèse à partir de l'hétérocycle

La dernière méthode de préparation des C-nucléosides consiste à fonctionnaliser un hétérocycle puis à créer la partie glycosidique. Cette méthode est certainement la plus difficile à réaliser puisqu'elle nécessite la création de plusieurs centres stéréogènes.

Son et Fu<sup>47</sup> ont ainsi développé la synthèse de 2'-désoxy-C-nucléoside par une cycloaddition [4+1] catalysée au cuivre, entre des énones et des diazoesters (Schéma 13). Les 2,3-dihydrofuranes ainsi formés sont obtenus avec un bon rendement et une bonne stéréosélectivité. Une hydrogénation suivie d'une réduction de l'ester et une déprotection du groupement triméthylsilyléthyle donne finalement le désoxy-C-nucléoside.

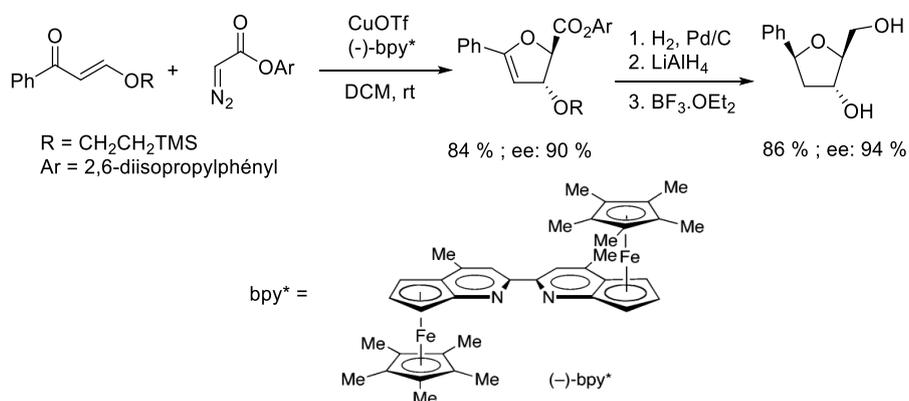


Schéma 13 : Cycloaddition [4+1] catalysée au cuivre donnant des 2'-désoxy-C-nucléosides

## 1.2. Activité biologique des C-nucléosides

Les C-nucléosides ont reçu un intérêt important pour leur synthèse, mais peu d'études portent sur leurs activités biologiques. En effet, si un nombre grandissant de C-nucléosides fait l'objet d'études cliniques,<sup>48,49</sup> aucun n'a encore été commercialisé pour ses activités antivirales ou antitumorales contrairement aux N-nucléosides. Pourtant, outre leur meilleure stabilité à l'hydrolyse acide et enzymatique, les C-nucléosides sont capables de mimer les nucléosides naturels, tout comme les N-nucléosides non naturels. Tout comme les N-nucléosides, les C-nucléosides peuvent subir une ou plusieurs phosphorylations, leur permettant ensuite d'inhiber des enzymes virales (protéases, polymérases), des enzymes nécessaires à la réplication de virus ou tout simplement à la survie cellulaire (Figure 12).<sup>50</sup>

<sup>47</sup> Son, S.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1046–1047.

<sup>48</sup> A Phase 1 Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of BCX4430 - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02319772> (accessed Sep2,2017).

<sup>49</sup> GS-5734 to Assess the Antiviral Activity, Longer-Term Clearance of Ebola Virus, and Safety in Male Ebola Survivors With Evidence of Ebola Virus Persistence in Semen <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610606678> (accessed Sep2,2017).

<sup>50</sup> De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2301–2311.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

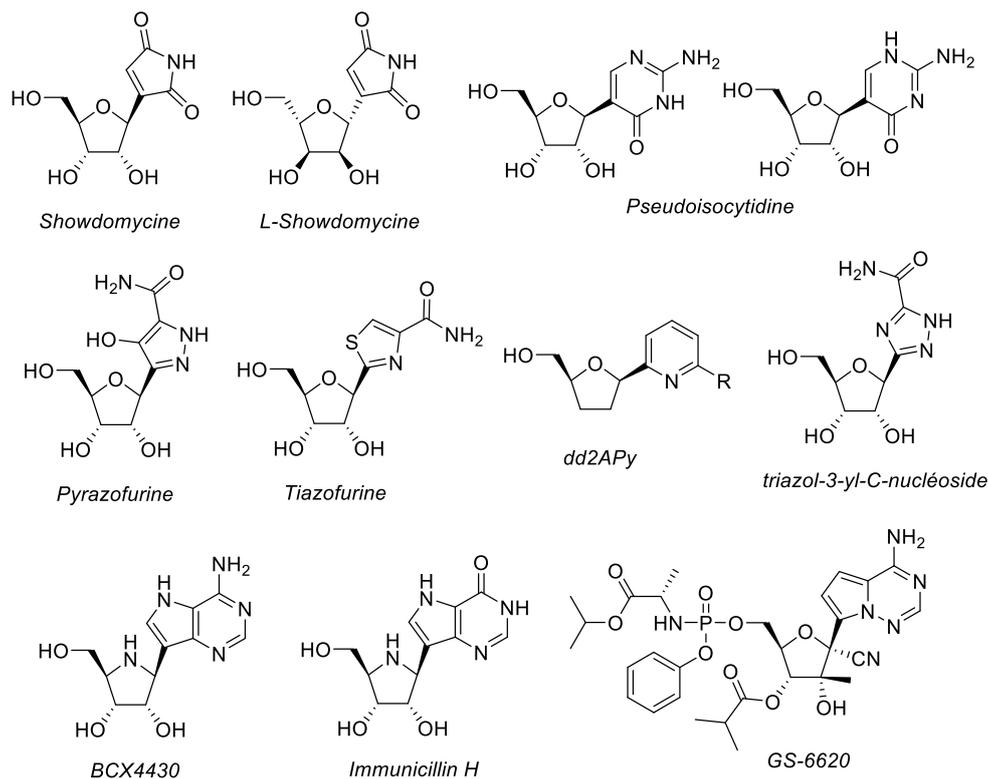


Figure 12: Exemples de C-nucléosides biologiquement actifs

Ainsi, des C-nucléosides tels que la showdomycine, son énantiomère la L-showdomycine ou encore la formycine sont des composés cytotoxiques pouvant potentiellement être utilisés dans des chimiothérapies. En effet, les showdomycines peuvent fonctionner comme des agents alkylants du fait de leur hétérocycle maléimide.

La pseudoisocytidine, existant sous la forme de deux tautomères, a été rapportée comme un agent anti-leucémique potentiel ( $IC_{50} = 0,04-3,8 \mu\text{g/mL}$ )<sup>51</sup>, tout comme les triazol-3-yl-C-nucléosides.

La pyrazofurine a été développée en 1975 par Gutowski *et al.*,<sup>52</sup> initialement en tant qu'agent antitumoral. Ce composé a montré une inhibition du développement tumoral, apparemment due à l'inhibition de la synthèse *de novo* des nucléosides pyrimidiques (inhibition de plus de 50 % de différentes tumeurs chez la souris et le rat).<sup>53</sup> Par la suite, il a été montré que le dérivé pyrazofurine monophosphate était capable d'inhiber l'orotidine monophosphate (OMP) décarboxylase et ainsi d'empêcher la conversion de l'OMP en uridine monophosphate (UMP). L'UMP étant l'un des éléments constitutifs de l'ARN, la diminution de sa concentration intracellulaire entraîne alors l'arrêt de la transcription. Par ailleurs, l'OMP décarboxylase a été identifiée comme une cible thérapeutique pertinente pour stopper les infections par le *P. falciparum* responsable de la malaria. Ceci renforce le potentiel thérapeutique de la pyrazofurine. De plus, ce C-nucléoside est également un antiviral à spectre large notamment contre le virus de la stomatite vésiculaire et le virus Ebola, dont l'activité antivirale pourrait dépasser celle de la ribavirine (RBV).

<sup>51</sup> Burchenal, J. H.; Ciovacco, K.; Kalaher, K.; Kietner, R.; Dowling, M. D.; Chu, C. K.; Watanabe, K. A.; Wempen, I.; Fox, J. J. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1520–1523.

<sup>52</sup> Gutowski, G. E.; Sweeney, M. J.; DeLong, D. C.; Hamill, R. L.; Gerzon, K.; Dyke, R. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 544–551.

<sup>53</sup> Sweeney, M. J.; Davis, F. A.; Gutowski, G. E.; Marnili, R. L.; Hoffman, D. H.; Poore, G. A. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2619–2623.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

La tiazofurine a également été identifiée comme agent antitumoral puisque ce composé est capable d'inhiber la croissance de nombreuses tumeurs notamment le carcinome pulmonaire de Lewis, qui pourtant est insensible à la plupart des traitements. Ainsi, l'utilisation de tiazofurine a permis d'atteindre jusqu'à 90 % de survie chez des souris atteintes du carcinome pulmonaire après 60 jours.<sup>54</sup> Le mode d'action de la tiazofurine passe par la formation de son dérivé monophosphate qui est ensuite métabolisé en dinucléotide, le thiazole-4-carboxamide adénine dinucléotide. Ce dernier peut alors inhiber l'IMPDH entraînant, comme pour la RBV, une diminution de la quantité de GTP.

Le 2',3'-didésoxy-C-nucléoside dd2APy a, quant à lui, été identifié comme inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH.

Plus récemment, l'imino-C-nucléoside BCX4430 a montré une activité antivirale contre l'infection au filovirus (Marbug) avec une IC<sub>90</sub> de 5,4 µM. Ce composé serait triphosphorylé et inhiberait par la suite l'ARN polymérase.<sup>55</sup> Par ailleurs, BCX4430 s'est montré efficace pour le traitement de la fièvre jaune chez le hamster. Son produit de désamination par l'adénosine déaminase est l'immucilline H, un puissant inhibiteur de la purine nucléoside phosphorylase, ralentissant ainsi la prolifération de lymphocytes T humains. Cette propriété en fait un bon candidat pour le traitement de leucémies et de lymphomes, mais également d'autres pathologies caractérisées par des réponses activées par les lymphocytes T (maladies auto-immunes, greffes d'organe).

Enfin, Cho *et al.*<sup>56</sup> ont montré que le composé GS-6620, une prodrogue phosphoramidate de C-nucléoside, était capable d'inhiber la polymérase du VHC (EC<sub>50</sub> 68-427 nM) lançant ainsi l'intérêt de l'utilisation de ces composés pour leur potentiel antiviral. Ce composé est d'ailleurs le premier C-nucléoside à entrer en développement clinique.

### 1.3. Travaux antérieurs : SRO91

Dans l'optique de développer des C-nucléosides analogues de la RBV, l'équipe de glycochimie du laboratoire s'est intéressée à la synthèse de C-ribosyl-1,2,3-triazoles en réalisant une réaction d'alcynylation médiée à l'indium en position anomère d'un ribose suivie d'une cycloaddition 1,3-dipolaire (Schéma 14).<sup>57</sup>

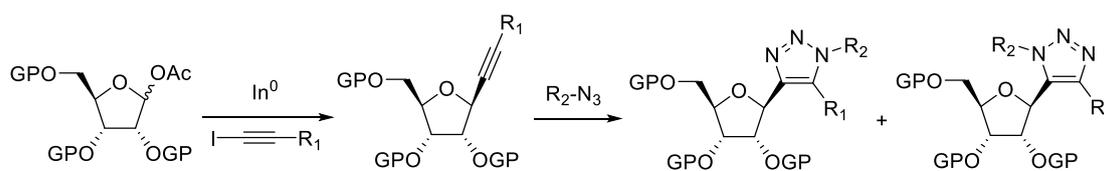


Schéma 14 : Synthèse des C-ribosyl-1,2,3-triazoles analogues de la RBV

Les composés ainsi obtenus (Figure 13) ont été testés pour leurs activités biologiques, notamment contre le VHC. Parmi eux, le composé SRO91 s'est montré le plus prometteur.

<sup>54</sup> Robins, R. K.; Srivastava, P. C.; Narayanan, V. L.; Plowman, J.; Paull, K. D. *J. Med. Chem.* **1982**, *25* (2), 107–108.

<sup>55</sup> Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. *Nature* **2014**, *508* (7496), 402–405.

<sup>56</sup> Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Lee, R.; Butler, T.; Metobo, S.; Aktoudianakis, V.; Lew, W.; Ye, H.; Clarke, M.; Doerffler, E.; Byun, D.; Wang, T.; Babusis, D.; Carey, A. C.; German, P.; Sauer, D.; Zhong, W.; Rossi, S.; Fenaux, M.; McHutchison, J. G.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1812–1825.

<sup>57</sup> Lubin-Germain, N.; Baltaze, J.-P.; Coste, A.; Hallonet, A.; Laurenno, H.; Legrave, G.; Uziel, J.; Augé, J. *Org. Lett.* **2008**, *10* (5), 725–728.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

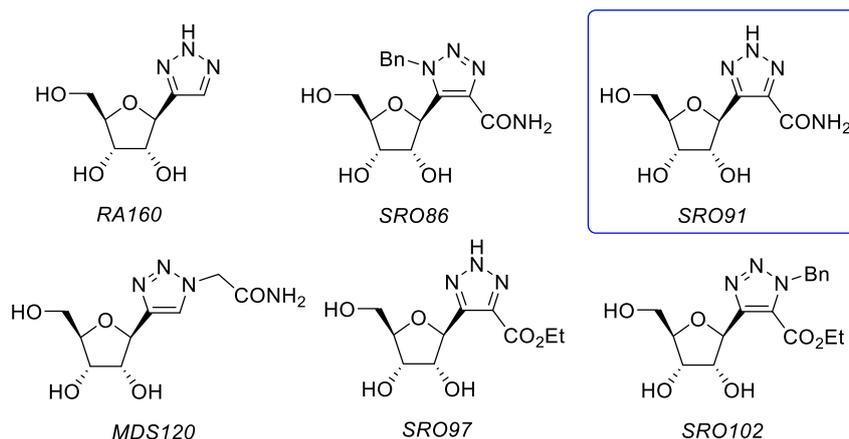


Figure 13: C-ribose-1,2,3-triazoles analogues de la RBV synthésés au laboratoire

### 1.3.1. Synthèse de SRO91

Le C-nucléoside SRO91 a donc été synthésé selon une méthode développée au laboratoire (Schéma 15).

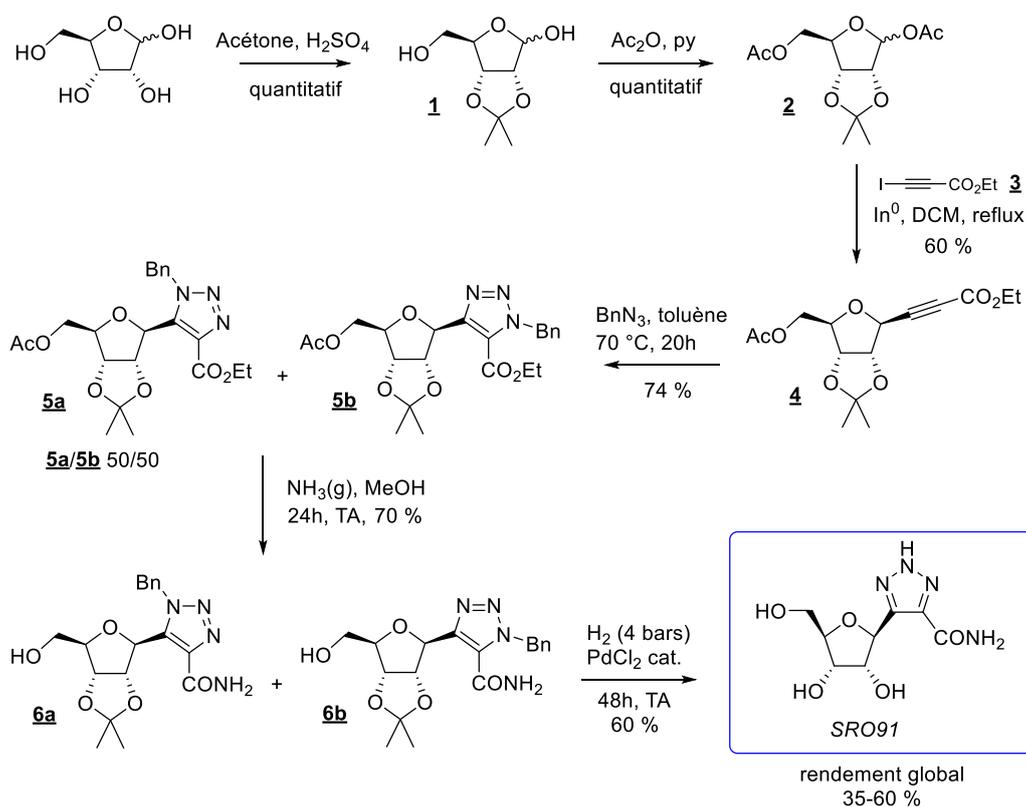


Schéma 15 : Synthèse de SRO91 développée au laboratoire

Pour réaliser la synthèse de SRO91, le D-ribose est protégé en position 2 et 3 par un isopropylidène puis en position 1 et 5 sous forme d'acétate pour donner le composé **2**. Ce dernier est soumis à une réaction d'alcynylation médiée à l'indium(0) dans le DCM à 60 °C pendant 2 à 3 jours pour donner sélectivement le β-C-ribofuranoside **4** avec un rendement allant de 35 à 60 %. La cycloaddition 1,3-dipolaire en présence d'azoture de benzyle permet alors d'obtenir le mélange d'isomères **5a** et **5b** (ratio 50/50) avec un rendement de 74 %. Il est à noter que l'utilisation d'une catalyse par un

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

surfactant glycosylé permet d'obtenir un des isomères avec une meilleure sélectivité.<sup>58</sup> Ces composés sont alors soumis à une aminolyse en présence d'ammoniac dans le MeOH pour donner les isomères **6a** et **6b** avec un rendement de 70 %. Enfin, la déprotection des benzyles par hydrogénolyse en présence de chlorure de palladium permet également de déprotéger les positions 2 et 3 du sucre grâce au HCl généré par le catalyseur, permettant d'obtenir l'unique produit final SRO91 avec un rendement de 60 %. La synthèse de SRO91 est ainsi réalisée en 6 étapes avec un rendement global allant de 8 à 23 %.

Il est à noter que la séparation des diastéréoisomères **5a/5b** ou **6a/6b** n'est pas nécessaire puisque la déprotection finale donne un unique composé. Cela a été confirmé par la structure de SRO91 obtenue par diffraction aux rayons X (réalisées par le Dr. Régis Guillot de l'ICMMO de l'Université de Paris Sud) où l'on peut constater que l'atome d'hydrogène est porté par l'azote central du triazole (Figure 14).<sup>59</sup> Suite à la débenzylation, il y a donc un équilibre tautomérique au niveau de l'hétérocycle ce qui permet d'obtenir une unique molécule.

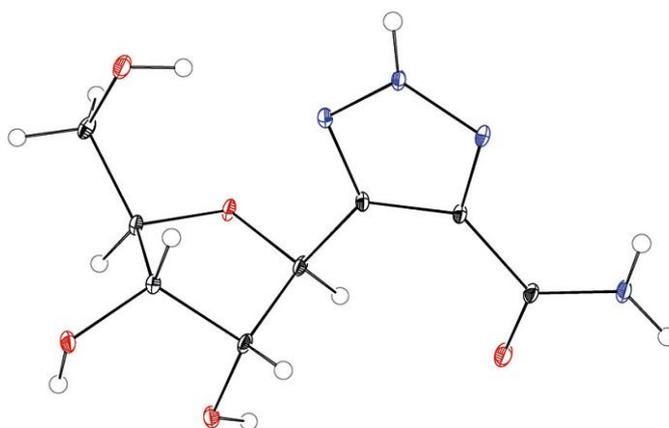


Figure 14: Structure cristalline de SRO91 obtenue par diffraction aux rayons X

### 1.3.2. Activité biologique de SRO91

L'activité antivirale de SRO91 contre le VHC a été étudiée par l'équipe du Pr. Amilcar Tanuri de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro. Pour cela, des tests *in vitro* ont été réalisés sur des lignées cellulaires Huh7-ET qui contiennent un réplicon de l'ARN du VHC ainsi qu'un rapporteur de type luciférase. Lors de ces essais, l'activité du gène rapporteur est directement proportionnelle au niveau d'ARN du VHC. L'activité antivirale peut ainsi être évaluée en observant la diminution du signal de luciférase. SRO91 a ainsi montré une activité intéressante contre le VHC avec une  $IC_{50}$  de 25  $\mu$ M similaire à celle de la RBV d'environ 50  $\mu$ M (Figure 15), tout en ayant une cytotoxicité peu importante (seuil de cytotoxicité supérieur à 100  $\mu$ M).

<sup>58</sup> Aït-Youcef, R.; Dos Santos, M.; Roussel, S.; Baltaze, J.-P.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (11), 4318–4323.

<sup>59</sup> Solarte, C.; Dos Santos, M.; Gonzalez, S.; Miranda, L. S. M.; Guillot, R.; Ferry, A.; Gallier, F.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Synthesis* **2017**, *49*, 1993–2002.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

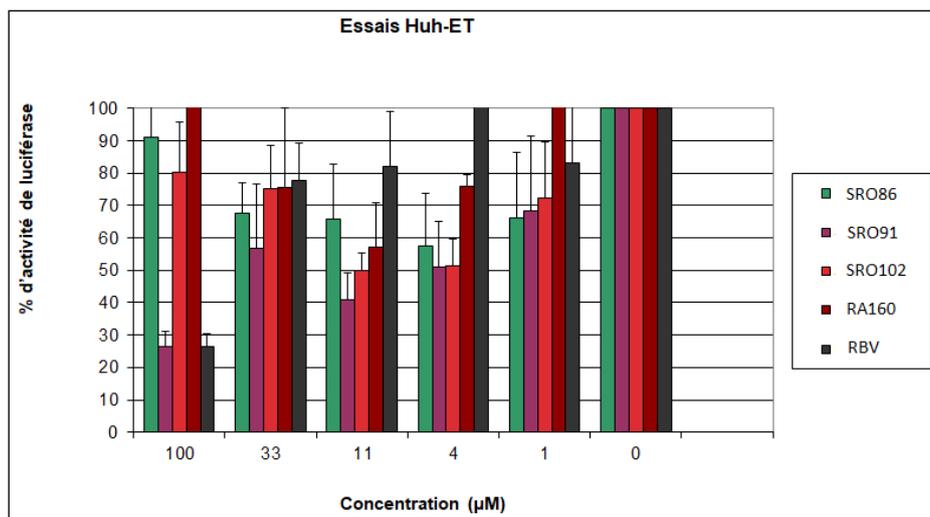


Figure 15: Essais HuH7-ET des différents C-nucléosides et RBV

Les affinités pour le site actif de l'ARN polymérase du VHC des triphosphates de SRO91 et de la RBV ont également été calculées par le Dr. Nelilma Correia Romeiro de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (données non publiées). Là encore, SRO91 apparaît comme un antiviral très prometteur, son dérivé triphosphate présentant une meilleure affinité que celui de la RBV (environ 92 % d'adéquation pour le triphosphate de SRO91 contre 86 % pour le RTP). En effet, la modélisation montre que le triphosphate de SRO91 s'insère dans le site catalytique de l'enzyme en effectuant 6 liaisons H avec différents acides aminés (Figure 16).

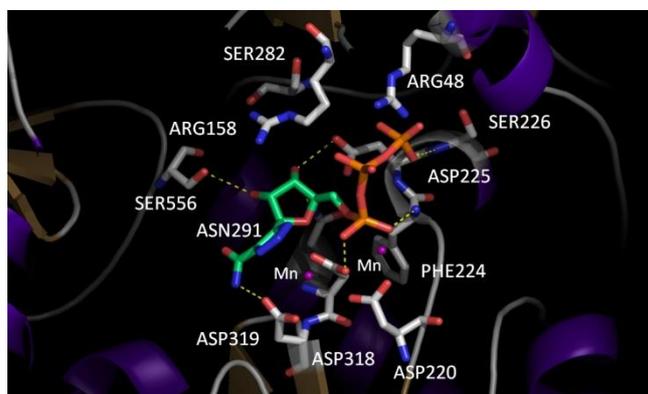


Figure 16: Modélisation du site actif de l'ARN polymérase du VHC en présence de SRO91

Enfin, des études plus récentes (données confidentielles) menées grâce à différentes collaborations ont montré que SRO91 et ses dérivés sont également actifs contre d'autres virus et possèdent des propriétés antitumorales. Ces résultats laissent ainsi penser que, comme la RBV, SRO91 pourrait présenter un profil antiviral à spectre large.

### 2. Modifications structurales

Une première stratégie permettant d'améliorer l'activité antivirale d'un N- ou C-nucléoside consiste à lui apporter des modifications structurales. Ces dernières peuvent stabiliser le complexe nucléoside/enzyme en renforçant certaines interactions, apporter des conformations particulières, ou encore améliorer la stabilité du composé en milieu biologique. On peut ainsi retrouver différentes

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

modifications, les principales pour les nucléosides étant : l'ajout d'un substituant en position 1', l'ajout ou la modification de substituants en position 2' et la modification de l'hétérocycle.

### 2.1. Modification en position 1' du ribose

Il existe assez peu de nucléosides comportant une modification structurale en position 1' du sucre. En effet, ces composés sont généralement instables et sont très vite dégradés.<sup>60,61</sup> On peut néanmoins citer les travaux de Cho *et al.*<sup>56</sup> portant sur un 1'-cyano-C-nucléoside (Schéma 16). Ces composés développés par Gilead Sciences se sont révélés aussi actifs sur la polymérase du VHC que le nucléoside non modifié en position 1'. De plus, leur prodrogue phosphoramidate (GS-6620) a montré une excellente activité (EC<sub>50</sub> d'environ 100-500 nM).

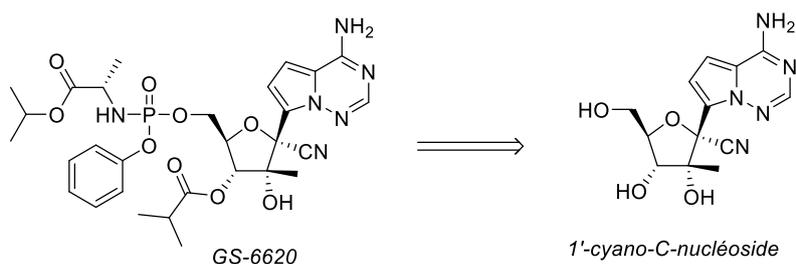
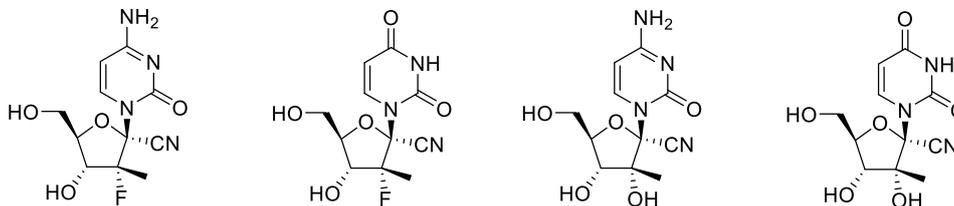


Schéma 16 : 1'-cyano-C-nucléosides développés par Gilead Sciences

En 2015, Kirschberg *et al.*<sup>62</sup> ont également rapporté la synthèse de 1'-C-cyano-2'-fluoro-2'-C-méthylpyrimidines (Figure 17). Des études d'activité anti-VHC ont ainsi montré que l'ajout du groupement cyano en position 1' augmentait le potentiel antiviral du nucléoside.



### 2.2. Modification en position 2' du ribose

Les modifications structurales apportées en position 2' d'un nucléoside sont beaucoup plus courantes. On trouve ainsi de nombreux exemples dans la littérature mais également plusieurs composés déjà commercialisés pour leur activité thérapeutique.

L'une des modifications les plus répandues en position 2' est l'introduction d'un groupement méthyle ce qui a généralement pour effet d'augmenter l'activité antivirale du composé. Stuyver *et al.*<sup>63</sup> ont ainsi rapporté en 2003 que la 2'-C-méthylcytidine et la 2'-C-méthyladénosine sont capables de réduire

<sup>60</sup> Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Vita, P.; Jayaram, H. N.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Grifantini, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (15), 4983–4989.

<sup>61</sup> Damont, A.; Dukhan, D.; Gosselin, G.; Peyronnet, J.; Storer, R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26* (10–12), 1431–1434.

<sup>62</sup> Kirschberg, T. A.; Mish, M. R.; Zhang, L.; Squires, N. H.; Wang, K. Y.; Cho, A.; Feng, J. Y.; Fenaux, M.; Babusis, D.; Park, Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (5), 1040–1043.

<sup>63</sup> Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. *J. Virol.* **2003**, *77* (19), 10689–10694.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

le taux d'ARN du VHC tout en ayant très peu d'effet sur la prolifération cellulaire ( $EC_{90}$  de 10,4 et 1,4  $\mu\text{M}$  respectivement). De plus, Carroll *et al.*<sup>64</sup> ont montré que la 2'-C-méthyladénosine est capable d'inhiber la polymérase virale NS5B du VHC du fait de la capacité de son dérivé triphosphate à s'intégrer dans le site catalytique de l'enzyme ( $IC_{50}$  de 1,9  $\mu\text{M}$ ). La présence du groupement méthyle apporte alors une gêne stérique suffisante pour empêcher l'enzyme d'assembler le nucléotide suivant, ce qui met un terme à la réplication de l'ARN viral. Différents 2'-méthyl-C-nucléosides analogues de SRO91 ont également été synthétisés au laboratoire mais leurs activités biologiques, notamment anti-VHC, ne sont encore connues (Figure 18).<sup>65</sup>

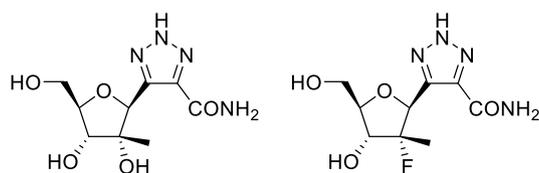


Figure 18: 2'-méthyl-C-nucléosides synthétisés au laboratoire

Parmi les modifications possiblement introduites en position 2', on retrouve les 2'-désoxy-2',2'-difluoro-nucléosides dont l'exemple le plus important est la gemcitabine (Figure 19) synthétisée pour la première fois par Hertel *et al.* en 1988.<sup>66</sup> Ce composé est utilisé en tant que traitement de première intention pour certains cancers et des tests d'inhibition d'un réplicon d'ARN du VHC lui ont également attribué une excellente activité ( $IC_{50} = 0,07 \mu\text{M}$ ).<sup>67</sup>

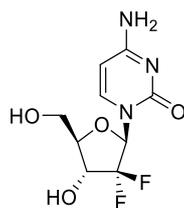


Figure 19: Structure de la gemcitabine

Les composés 2'-désoxy sont des dérivés de nucléoside ayant reçu une attention particulière depuis les années 1960.<sup>68</sup> Parmi eux, on retrouve des antiviraux tels que la lamivudine (anti-VIH et anti-VHB) ou la telbivudine (anti-VHB) ainsi que des antitumoraux tels que la decitabine (traitement de la leucémie myéloïde aigüe).

<sup>64</sup> Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A. B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A. L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C. A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L. C.; MacCoss, M.; Olsen, D. B. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (14), 11979–11984.

<sup>65</sup> Cosson, F.; Faroux, A.; Baltaze, J.; Farjon, J.; Guillot, R.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 755–761.

<sup>66</sup> Hertel, L. W.; Kroin, J. S.; Misner, J. W.; Tustin, J. M. *J. Org. Chem.* **1988**, 53 (11), 2406–2409.

<sup>67</sup> Devos, R.; Dymock, B. W.; Hobbs, C. J.; Jiang, W.; Martin, J. A.; Merrett, J. H.; Najera, I.; Shimma, N.; Tsukuda, T. Anti-HCV nucleoside derivatives.20040110718, June 10, 2004.

<sup>68</sup> Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12 (6), 447–464.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

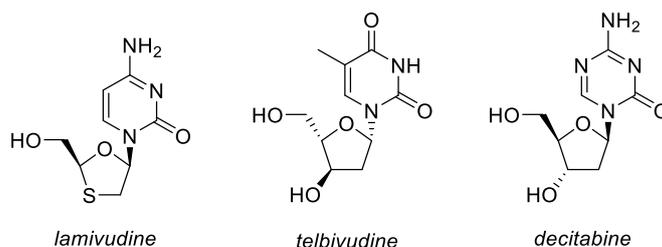


Figure 20: Exemples de 2'-désoxynucléosides présentant des activités biologiques

Enfin, les composés 2'-désoxy-2'-méthyl-2'-fluoro ont beaucoup été développés pour les traitements contre le VHC. En effet, ces composés sont généralement des inhibiteurs de polymérase et la présence d'un groupement méthyle ainsi que celle d'un atome de fluor, bioisostère de la fonction hydroxyle, permet une meilleure occupation du site actif de l'enzyme et donc une meilleure incorporation dans l'ARN viral. Le composé PSI-6130 développé par Clark *et al.*<sup>69</sup> a ainsi montré une meilleure activité sur des réplicons du VHC ( $EC_{90} = 5,4 \mu\text{M}$ ) que son homologue non fluoré ( $19 \mu\text{M}$ ). On peut également citer l'exemple du sofosbuvir, qui est à l'heure actuelle, le composé le plus utilisé dans les traitements contre le VHC (Figure 21).

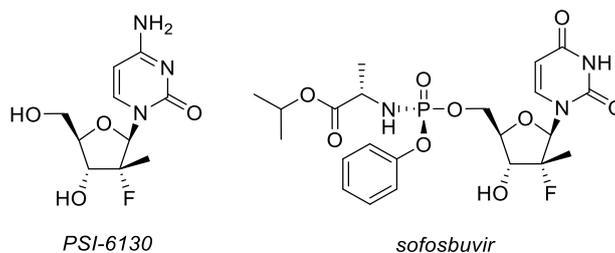


Figure 21: Exemples de 2'-désoxy-2'-méthyl-2'-fluoronucléosides actifs contre le VHC

### 2.3. Modification sur l'hétérocycle

Une autre modification structurale apportée sur les nucléosides est le changement ou l'ajout de différentes fonctionnalisations sur l'hétérocycle.

Dans le cas des analogues de la ribavirine, une des modifications les plus rencontrées porte sur la fonction carboxamide. Ce dernier peut être remplacé par une fonction acide ou encore fonctionnalisé par différentes amines pour donner une nouvelle série de composés, et permettre d'autres interactions avec les cibles thérapeutiques. La fonction carboxamide de SRO91 a ainsi été modifiée au laboratoire pour donner plusieurs composés dont l'activité anti-VHC n'est pas encore connue (Figure 22).<sup>59</sup>

<sup>69</sup> Clark, J. L.; Hollecker, L.; Mason, J. C.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; Lostia, S.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Furman, P. A.; Stec, W. J.; Patterson, S. E.; Pankiewicz, K. W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (17), 5504–5508.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

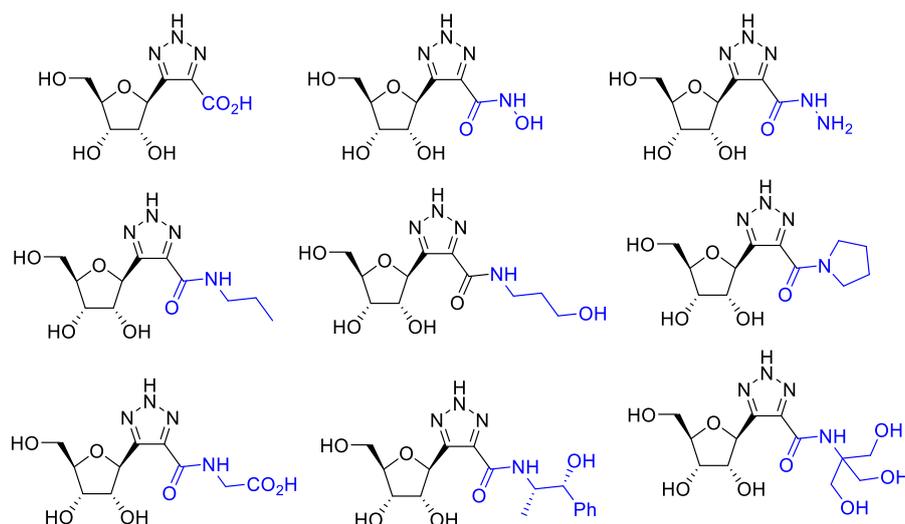


Figure 22: Dérivés carboxamides de SRO91

Toujours pour les analogues de la RBV tels que SRO91, il est également possible d'apporter des modifications sur le triazole, soit en modifiant l'hétérocycle en lui-même (SRO91 est un 1,2,3-triazole alors que la RBV est un 1,2,4-triazole) soit en le fonctionnalisant. Il est ainsi possible d'obtenir des dérivés de SRO91 portant la fonction carboxamide sur un atome d'azote du triazole,<sup>59</sup> ou encore différents cycles aromatiques sur le  $N^2$  par des couplages pallado-catalysés (Figure 23).<sup>70</sup>

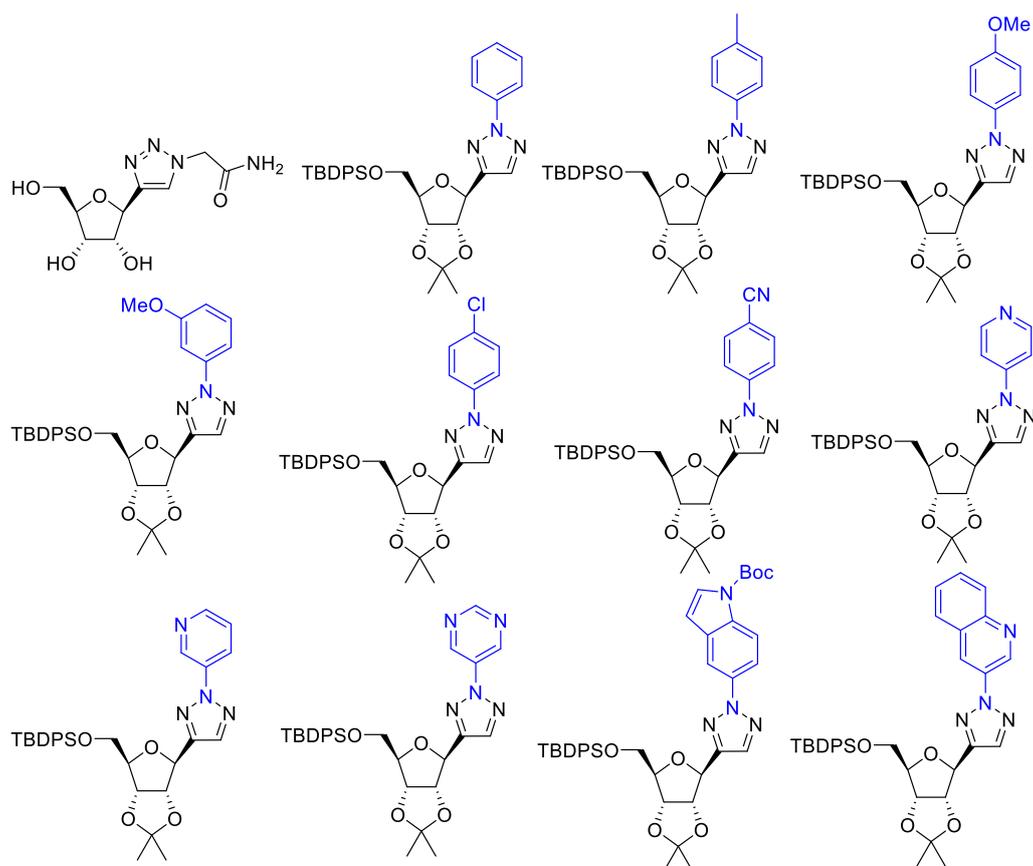


Figure 23: Dérivés de SRO91 fonctionnalisés sur le triazole

<sup>70</sup> Lopes, A. B.; Wagner, P.; Octavio, R.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Bourguignon, J.-J.; Schmitt, M.; Miranda, L. S. M. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4540–4549.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 3. Stratégie prodrogue

### 3.1. Généralités

Les prodrogues sont des dérivés ou des précurseurs de molécules bioactives, mais qui ne présentent pas d'effet thérapeutique en elle-même. La bioconversion des prodrogues en molécules actives se fait *in vivo*, par des processus biochimiques comme l'hydrolyse ou tout autre activité enzymatique, pouvant être spécifique ou non. L'utilisation d'une prodrogue peut alors permettre d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques d'un composé : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Élimination (ADME). Par exemple, les prodrogues peuvent améliorer la solubilité aqueuse d'un composé, augmenter son absorption du système digestif au système sanguin, faciliter sa pénétration cellulaire ou encore diminuer sa cytotoxicité.

Il existe deux types de prodrogues, qui diffèrent par leur modes de bioconversion (Schéma 17) :<sup>71</sup>

- Les prodrogues à « activation » ou « bioprécurseurs » subissent *in vivo* des modifications chimiques leur donnant une activité biologique. Ces modifications peuvent également correspondre à des conjugaisons telles que des phosphorylations dans le cas d'analogues de nucléosides.
- Les prodrogues à « dégradation » qui correspondent à des conjugués de la molécule active. La bioconversion implique alors l'élimination d'un agent « masquant » ou « promoiety » afin de reformer les fonctions nécessaires à l'activité biologique.

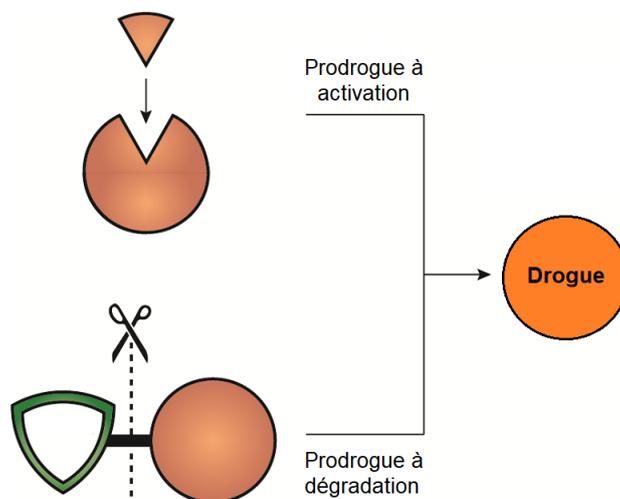


Schéma 17 : Deux types de prodrogues: à activation et à dégradation<sup>71</sup>

### 3.2. Prodrogues de type esters

Les prodrogues de type ester sont des composés se basant sur l'hydrolyse d'un lien ester par des estérases (Schéma 18). Les nombreux composés thérapeutiques possédant une fonction alcool ou acide carboxylique peuvent ainsi être protégés et libérés *in vivo* par les estérases, très présentes dans notre métabolisme. Par ailleurs, les prodrogues de type ester représentent environ la moitié des prodrogues actuellement commercialisées.

<sup>71</sup> Walther, R.; Rautio, J.; Zelikin, A. N. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 10.1016/j.addr.2017.06.013.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

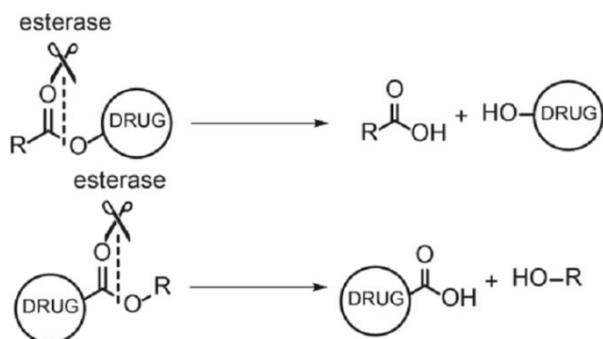


Schéma 18 : Bioconversion des prodrogues esters par les estérases<sup>71</sup>

Les antibiotiques tels que les dérivés de la pénicilline comme la pivampicilline et la bacampicilline possèdent une fonction acide carboxylique qui peut être protégée sous forme de prodrogue de type ester. La fonction acide carboxylique étant une fonction très polaire, chargée au pH physiologique, l'utilisation d'une stratégie prodrogue permet d'augmenter la solubilité de ces antibiotiques ainsi que leur absorption par voie orale. Le Tamiflu est également un exemple de succès dans l'utilisation d'une stratégie prodrogue pour un composé thérapeutique déjà commercialisé. En effet, le principe actif du Tamiflu, le carboxylate d'oseltamivir, est un inhibiteur sélectif de la neuramidase des virus influenza A et B. Si la forme carboxylate ne possède qu'une biodisponibilité orale de 5% chez l'Homme, sa forme ester éthylique (Tamiflu), plus lipophile, est rapidement absorbée par voie orale (au moins 80 %).<sup>72</sup> Après absorption, l'oseltamivir est métabolisé en sa forme active carboxylate principalement par la carboxylestérase-1 dans le foie (Schéma 19).

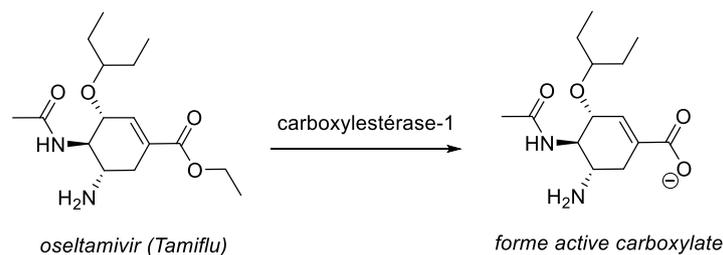


Schéma 19 : Transformation du Tamiflu en son métabolite actif

Les composés contenant des groupements hydroxyle peuvent également être utilisés sous forme de prodrogue ester après acylation avec des acides carboxyliques aliphatiques ou aromatiques, ce qui augmente leur lipophilie et donc améliore potentiellement leur pénétration cellulaire. Ainsi, le famciclovir est une prodrogue diacylée d'un agent antiviral dont la biodisponibilité orale passe de 4% pour la molécule parente à 75 % (Schéma 20).<sup>73</sup>

De plus, les composés comportant des groupements alcool peuvent également être acylés avec des acides aminés. De telles prodrogues peuvent alors devenir des substrats de transporteurs de peptides endogènes tels que PepT1. Ces modifications ont ainsi permis d'améliorer la biodisponibilité orale de l'acyclovir et du ganciclovir par 3 et 10 fois respectivement.

<sup>72</sup> Bardsley-Elliot, A.; Noble, S. *Drugs* **1999**, 58 (5), 851–860.

<sup>73</sup> Jarvest, R. L.; Sutton, D.; Vere Hodge, R. A. *Pharm. Biotechnol.* **1998**, 11, 313–343.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

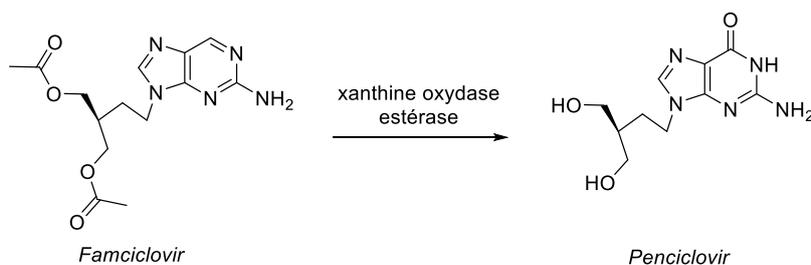


Schéma 20 : Transformation du famciclovir en sa forme active, le penciclovir

### 3.3. Prodrogues phosphate

Certaines molécules particulièrement peu solubles peuvent être délivrées sous forme de phosphate. Néanmoins, même si la forte polarité et les charges de ce groupement améliorent la solubilité, cela diminue également la pénétration cellulaire du composé. Cette stratégie ne peut donc être utilisée que dans le cas de molécules dont la cible est extracellulaire. Après l'administration, la dégradation de la prodrogue se fait par des phosphatases alcalines, des estérases non-spécifiques présentes dans l'ensemble du corps (Schéma 21).

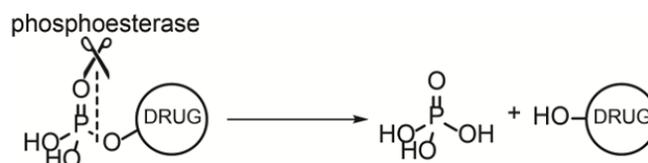


Schéma 21 : Dégradation des prodrogues phosphate<sup>71</sup>

L'utilisation de prodrogues phosphate est une stratégie qui a amené à la commercialisation de plusieurs composés, notamment le fosamprenavir, prodrogue de l'amprenavir. Ce dernier est un composé anti-VIH agissant en tant qu'inhibiteur de protéase. Cette molécule très peu soluble voit sa solubilité aqueuse augmenter d'un facteur 10 lorsque l'alcool secondaire est fonctionnalisé sous forme de phosphoester (Schéma 22).<sup>74</sup>

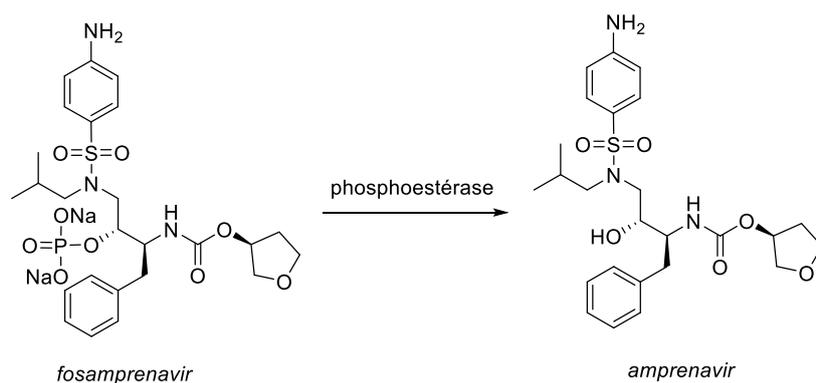


Schéma 22 : Transformation du fosamprenavir en sa forme active, l'amprenavir

<sup>74</sup> Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 677–694.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 3.4. Prodrogues de groupements phosphate et phosphonate

Les groupements phosphate et phosphonate sont parmi les sites de modifications les plus importants dans les stratégies prodrogues, notamment dans le cas des nucléosides antiviraux. En effet, certains dérivés triphosphates de nucléosides sont capables d'inhiber les polymérases virales. Pour cela, le nucléoside va subir, *in vivo*, trois phosphorylations catalysées par des phosphokinases dont la première est généralement l'étape limitante. Afin d'améliorer l'activité de ces nucléosides, l'utilisation des nucléosides monophosphate permet de s'affranchir de cette limitation. Néanmoins, le groupement phosphate étant chargé au pH physiologique, le composé ainsi obtenu présente des problèmes de pénétration cellulaire. Différentes stratégies prodrogues des dérivés monophosphate ont ainsi vu le jour, notamment *via* la formation de phosphoesters et phosphoramidates.<sup>75,76</sup>

### 3.4.1. Esters d'acyloxyalkyle

Alors que les phosphoesters d'alkyle simples ne sont pas utilisés dans des stratégies prodrogues du fait de leur trop grande stabilité, les esters d'acyloxyalkyle sont nombreux. Dans ce cas, l'hydrolyse enzymatique du carboxylate ou du carbonate par une estérase génère un intermédiaire hydroxyméthyle qui, rapidement, se dégrade en perdant une molécule de formaldéhyde pour donner le monoester. Ce dernier est alors métabolisé de la même manière ou directement par une phosphodiéstérase. Un des groupements les plus utilisés dans cette stratégie est certainement le pivaloyloxyméthyle (POM, Schéma 23).

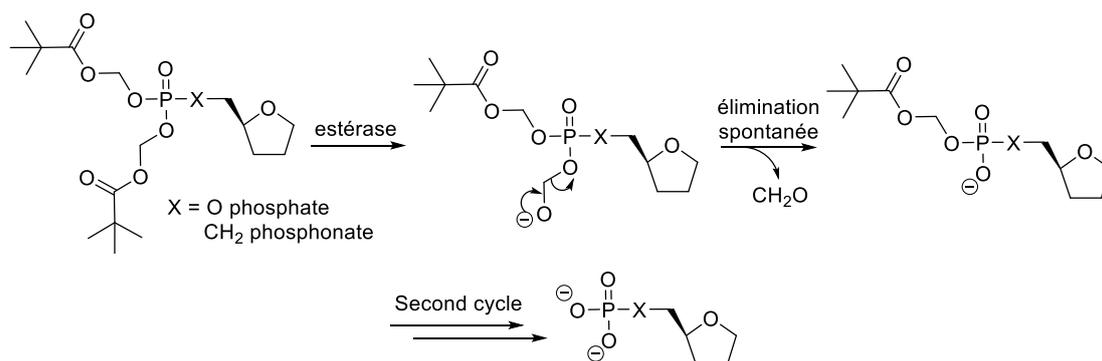


Schéma 23 : Métabolisme des prodrogues bisPOM

Cette stratégie employée par Farquhar *et al.*<sup>77</sup>, avec la bis(POM) 2'-désoxy-5-fluorouridine 5'-monophosphate (FdUMP), se concrétise avec la commercialisation de l'adefovir dipivoxil (Figure 24) comme traitement du VIH. Ainsi, la biodisponibilité orale chez le rat a été augmentée avec l'utilisation de prodrogue, passant de 7,8 à 17,3 %. De même, des tests *in vitro* ont montré une amélioration de l'activité avec une IC<sub>50</sub> de 0,6 µM contre 119 µM pour la 9-[2-(phosphonométhoxy)éthoxy]adénine (PMEA).<sup>78</sup>

Son équivalent carbonate, l'isopropylloxyméthylcarbonate (POC) a également été utilisé avec succès avec le tenofovir disoproxil (Figure 24) pour le traitement du VHB (IC<sub>50</sub> de 3 nM). Dans le cas du groupement POC, le carbonate est hydrolysé par une estérase donnant un carboxylate qui, étant

<sup>75</sup> Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328–2345.

<sup>76</sup> Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10400–10410.

<sup>77</sup> Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (23), 3902–3909.

<sup>78</sup> Starrett, J. E. J.; Tortolani, D. R.; Russell, J.; Hitchcock, M. J. M.; Whiterock, V.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (12), 1857–1864.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

instable, subit deux dégradations successives à savoir une décarboxylation puis l'élimination d'une molécule de formaldéhyde.

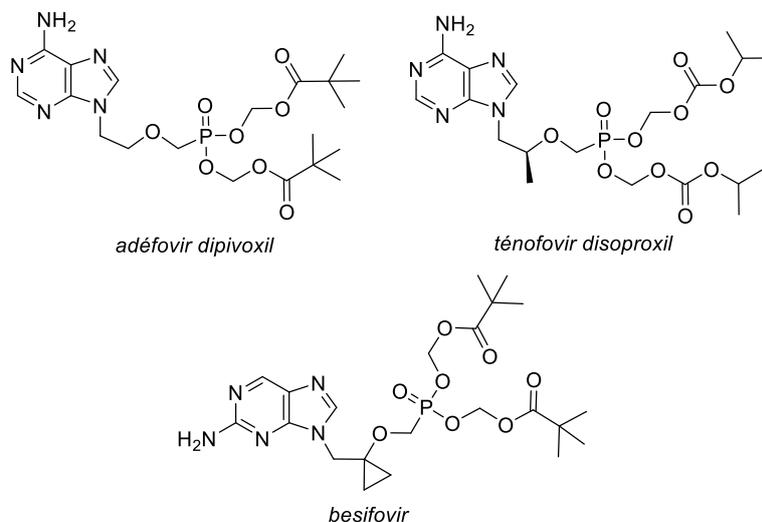


Figure 24: BisPOM ou bisPOC commercialisés ou en développement

Le besifovir est un autre exemple de prodrogue de phosphonate de nucléotide de type bisPOM qui présente une activité contre le VHB (Figure 24).<sup>79</sup> Le Besifovir est absorbé et rapidement dégradé en phosphonate de nucléotide qui est ensuite oxydé en position C6 par des enzymes comme la xanthine oxydase. Le dérivé triphosphate du métabolite oxydé est alors capable d'inhiber la réplication de l'ADN viral.

### 3.4.2. S-acylthioesters

Tout comme les esters d'acyloxyalkyle, les prodrogues S-acylthioesters (SATE) ont beaucoup d'applications dans la délivrance de drogues phosphates ou phosphonates. Leur dégradation est effectuée par des estérases donnant un ester de thioéthyle intermédiaire qui se décompose par élimination de thiirane (Schéma 24).

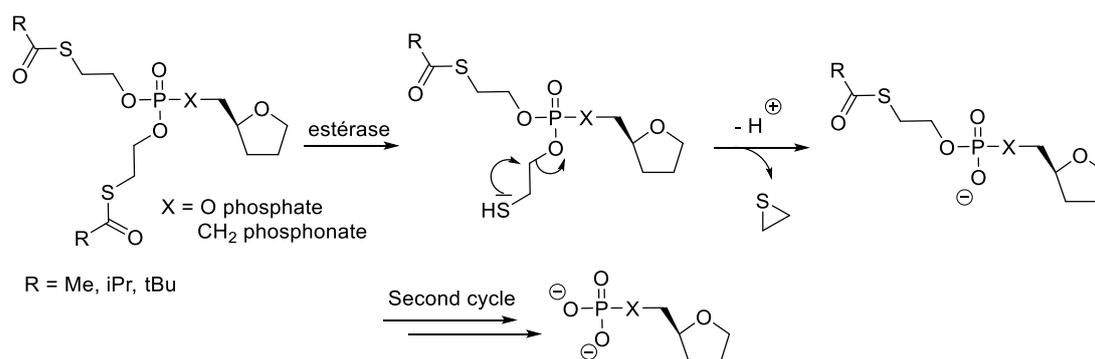


Schéma 24 : Activation des SATE

<sup>79</sup> Choi, J.-R.; Cho, D.-G.; Roh, K. Y.; Hwang, J.-T.; Ahn, S.; Jang, H. S.; Cho, W.-Y.; Kim, K. W.; Cho, Y.-G.; Kim, J.; Kim, Y.-Z. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (11), 2864–2869.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

L'équipe de Jean-Louis Imbach est à l'origine de cette stratégie de protection des nucléosides monophosphate et leurs analogues.<sup>80</sup> Il a été démontré que le groupement SATE est relativement stable dans le milieu extracellulaire mais se décompose rapidement dans les cellules étudiées, en faisant un excellent candidat pour la délivrance de molécules actives dans le milieu intracellulaire.

Les prodrogues SATE ont été largement appliquées aux monophosphates de didésoxyuridine, didésoxyadénine, azidothymidine, acyclovir et d'autres.<sup>81</sup>

Ainsi, des prodrogues SATE de la 2',3'-didésoxyadénosine (ddA) ont montré une activité antivirale dans des cellules infectées par le VIH ou le VIS.<sup>82</sup> Cette stratégie a même montré son efficacité *in vivo*, puisqu'une prodrogue bis(*t*BuSATE) de l'acyclovir (ACV) a montré une meilleure activité anti-VHB que son nucléoside parent sur des poussins, après administration par voie orale ou intrapéritonéale (IC<sub>50</sub> de 0,6 nM contre 100 nM).<sup>83</sup> Cette stratégie a ensuite été perfectionnée par l'introduction d'un groupement hydroxyle sur la chaîne acyle de *t*BuSATE. Cette modification permet de diminuer le taux d'hydrolyse du phosphotriester dans le milieu biologique. Ainsi, le bis(*HOt*BuSATE) phosphotriester de l'azidothymidine (AZT) s'est montré capable de traverser la membrane de cellules Caco-2, généralement employée comme modèle d'absorption intestinale. Cette propriété indique que cette protection serait compatible avec une administration par voie orale (Figure 25).<sup>84</sup>

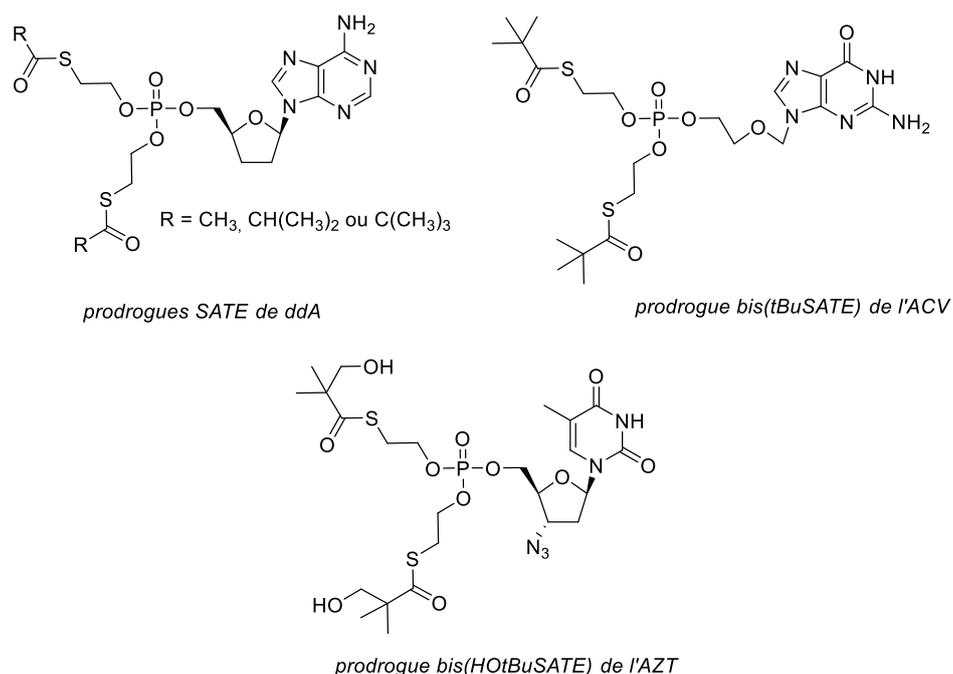


Figure 25: Exemples de prodrogues bis(SATE) de nucléosides

<sup>80</sup> Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3 (12), 2521–2526.

<sup>81</sup> Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Périgaud, C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, 4 (4), 395–408.

<sup>82</sup> Shirasaka, T.; Chokekijchai, S.; Yamada, A.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Mitsuya, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39 (11), 2555–2559.

<sup>83</sup> Hantz, O.; Périgaud, C.; Borel, C.; Jamard, C.; Zoulim, F.; Trépo, C.; Imbach, J. L.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **1999**, 40 (3), 179–187.

<sup>84</sup> Shafiee, M.; Deferme, S.; Villard, A. L.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Lioux, T.; Pompon, A.; Varray, S.; Aubertin, A. M.; van Den Mooter, G.; Kinget, R.; Périgaud, C.; Augustijns, P. *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90 (4), 448–463.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

Par la suite, Peyrottes *et al.*<sup>85</sup> ont développé des dérivés *S*-acyl-2-thioéthyl aryl phosphotriesters de l'AZT en utilisant un groupement *t*BuSATE et un ester de L-tyrosine. Afin d'éviter que la forme zwitterionique (carboxylate et ammonium) de l'acide aminé, n'empêche la pénétration cellulaire, les deux fonctions ont été modifiées : réduction en alcool ou amidification pour le carboxylate; protection de l'amine sous forme d'un carbamate (Figure 26).

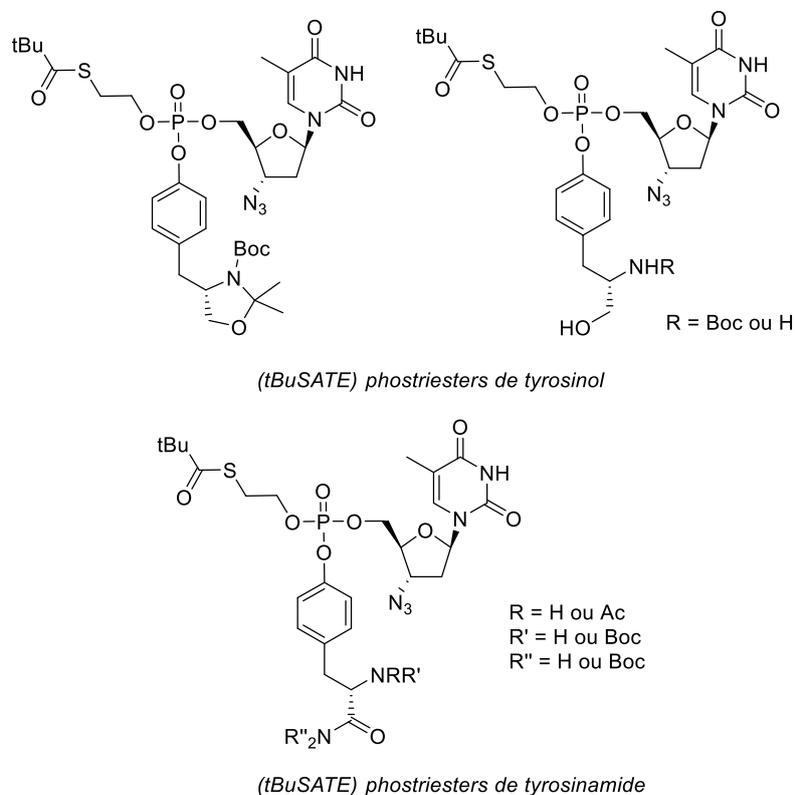


Figure 26: *S*-acyl-2-thioéthyl aryl phosphotriesters de l'AZT développés par Peyrottes *et al.*

Ces composés ont montré une activité anti-VIH significative (EC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire) sur des cellules CEM/TK<sup>-</sup> contrairement au nucléoside parent, l'AZT. Le mécanisme proposé pour la dégradation de ces prodrogues fait intervenir successivement une estérase et une hydrolyse catalysée par une phosphodiesterase.

### 3.4.3. Esters d'aryle

Dans l'optique de s'affranchir de la formation de sous-produits tels que le formaldéhyde ou le thiirane, la communauté scientifique s'est attachée à développer de nouvelles prodrogues de phosphate ou phosphonate. Un premier composé possédant un phosphonate protégé par deux esters de phényle a ainsi été rapporté.<sup>86</sup> Ce dernier a montré une activité en tant qu'inhibiteur d'endopeptidase et l'utilisation d'esters de phényle a permis d'améliorer la biodisponibilité orale tout en assurant la bioconversion en composé actif *in vivo*. Il est à noter que, lors de l'administration orale chez le rat, la prodrogue possédant des aromatiques non substitués a donné des niveaux importants de composé actif dans le plasma, issus de sa dégradation précoce. Ces niveaux ont diminué lors de l'utilisation d'aromatiques possédant des groupements électrodonneurs (9,5 nM pour des groupements *m*-

<sup>85</sup> Peyrottes, S.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Périgaud, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 782–793.

<sup>86</sup> De Lombaert, S.; Erion, M. D.; Tan, J.; Blanchard, L.; El-Chehabi, L.; Ghai, R. D.; Sakane, Y.; Berry, C.; Trapani, A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (4), 498–511.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

méthoxyphényle contre 427,5 nM pour des phényles non-substitués, après administration par voie orale de 30 mg/kg chez le rat).

D'autres groupes ont rapporté l'application d'esters de diaryle comme des dérivés de PMEAs dont le diphosphoester a montré une biodisponibilité orale supérieure au nucléoside parent (Figure 27) (passant de 0 % pour la PMEAs à 10 % pour sa prodrogue).<sup>87</sup>

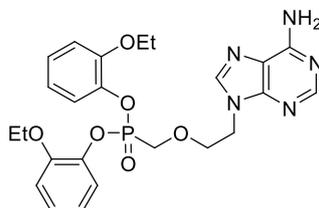


Figure 27: Structure du bis(*O*-éthoxyphényl) PMEAs

### 3.4.4. Phosphoramidates et phosphonamidates d'aryle

L'utilisation de prodrogues phosphoramidates d'aryle est certainement la stratégie prodrogue la plus employée à l'heure actuelle pour délivrer des dérivés monophosphate de nucléosides. Cette technologie, appelée ProTide pour Prodrogue de nucléoTide, a été développée par l'équipe du Pr. McGuigan dans les années 1990.<sup>88,89</sup> Cette stratégie repose sur la protection du groupement phosphate ou phosphonate sous la forme d'un ester arylique et d'un phosphoramidate formé à partir d'un acide  $\alpha$ -aminé protégé sous forme d'ester.

Le mécanisme de dégradation de la prodrogue fait intervenir une estérase (cathepsine) libérant la fonction carboxylate de l'acide  $\alpha$ -aminé. Le composé ainsi obtenu subit une cyclisation intramoléculaire avec élimination de phénol, donnant un intermédiaire cyclique à cinq chaînons. Cet intermédiaire est spontanément hydrolysé pour donner un acide phosphoramidique. Le phosphoramidate est alors hydrolysé (catalyse enzymatique par une phosphoramidase ou simple hydrolyse acide) pour donner la forme monophosphate du nucléoside (Schéma 25).<sup>76</sup>

Des études de relation structure-activité ont démontré que bien que la L-alanine soit préférée en tant qu'acide aminé, l' $\alpha,\alpha$ -diméthylglycine et d'autres acides aminés non-naturels entraînent également la dégradation de la prodrogue en dérivé monophosphate. Des modifications sur le groupement aryle ont aussi été investiguées montrant que les composés les plus lipophiles possèdent une meilleure activité dans des tests *in vitro*, probablement due à une amélioration de la pénétration cellulaire.<sup>75</sup>

<sup>87</sup> Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (8), 1372–1379.

<sup>88</sup> McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J. *Antiviral Res.* **1992**, *17* (4), 311–321.

<sup>89</sup> McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; de Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048–1052.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

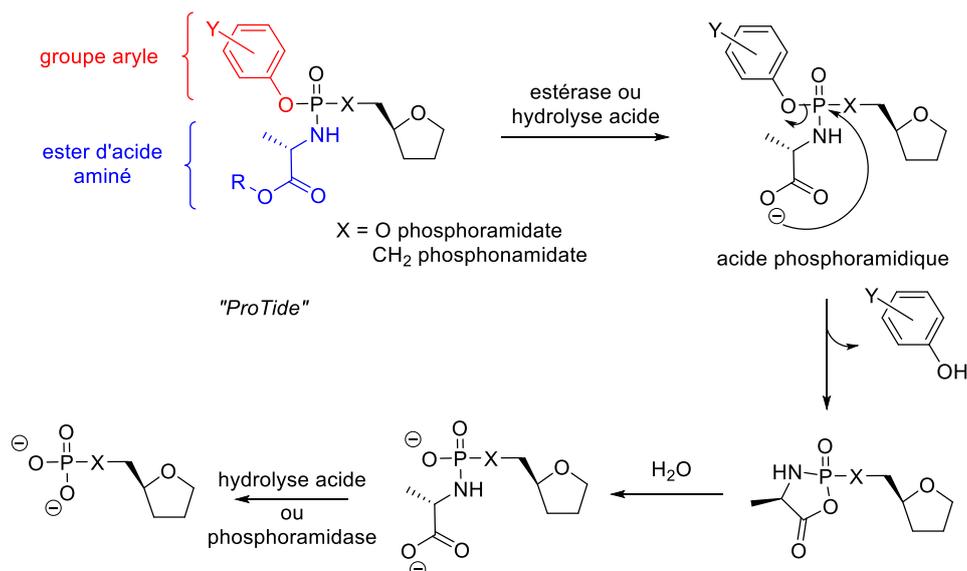


Schéma 25 : Mécanisme suppose de dégradation *in vivo* des ProTides

Si l'étude initiale menée par McGuigan *et al.* portait uniquement sur un dérivé de l'AZT, beaucoup d'autres composés ont ensuite été développés dont des dérivés de didésoxythymidine d4T (stampidine)<sup>90</sup> ou de la 4'-azidouridine. Cette stratégie a mené à de nombreuses applications puisque plusieurs dérivés monophosphate de nucléosides utilisant la technologie ProTide sont en étude clinique ou déjà commercialisés tels que le sofosbuvir, traitement de référence actuel des infections au VHC (Figure 28).<sup>91</sup>

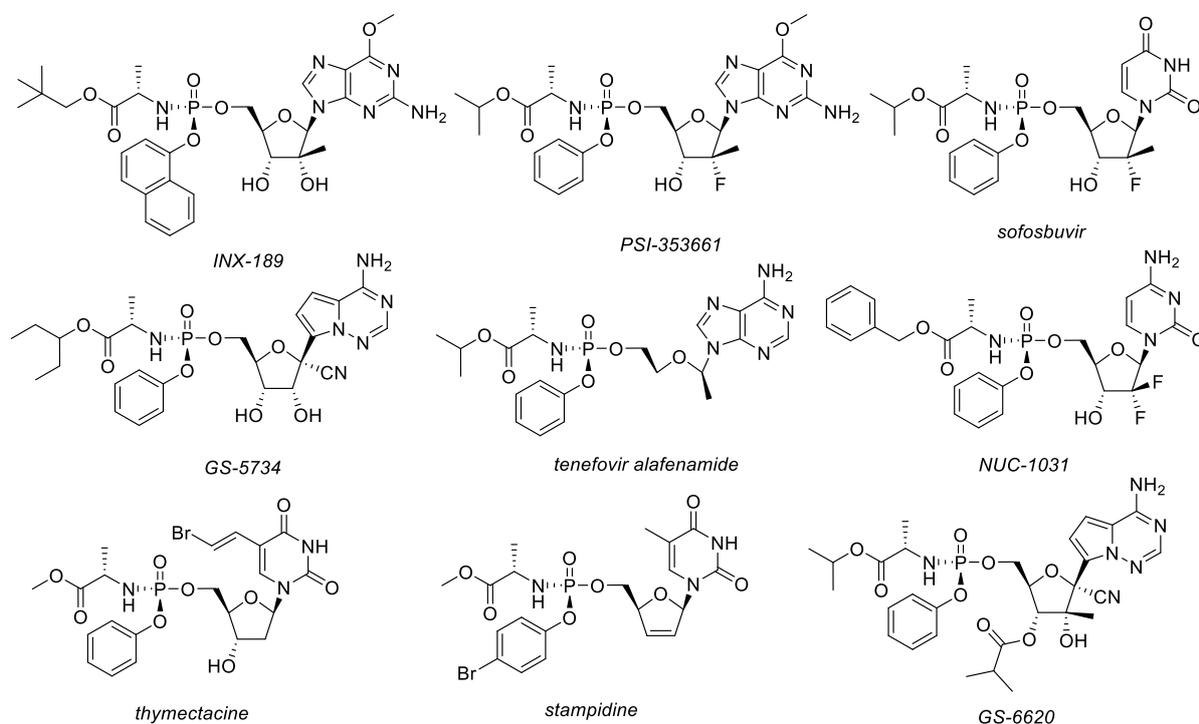


Figure 28: Exemples de ProTides étudiés en phase clinique ou commercialisés

<sup>90</sup> McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (8), 1748–1753.

<sup>91</sup> Mehellou, Y. *ChemMedChem* **2016**, 1114–1116.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 3.4.5. Phosphoesters cycliques de 1-aryl-1,3-propanyle

Les prodrogues de phosphate ou phosphonate sous forme d'esters cycliques de 1-aryl-1,3-propanyle sont des prodrogues initialement développées pour se dégrader uniquement dans le foie. Cette technologie, appelée HepDirect, a été pensée pour apporter une bonne biodisponibilité orale, une dégradation rapide par une unique enzyme présente dans le foie, une bonne stabilité dans l'eau, le sang et les tissus non-hépatiques ainsi qu'une faible toxicité induite par de possibles sous-produits.<sup>92</sup>

En effet, la dégradation des prodrogues HepDirect se fait grâce au cytochrome P<sub>450</sub> (CYP450), enzyme présente uniquement dans le foie, capable d'oxyder un carbone benzylique en  $\alpha$  de l'oxygène du phosph(on)ate. L'action du CYP450 va donc générer un hémiacétal cyclique qui subit spontanément une ouverture de cycle suivie d'une  $\beta$ -élimination pour donner le dérivé monophosph(on)ate (Schéma 26).<sup>75</sup>

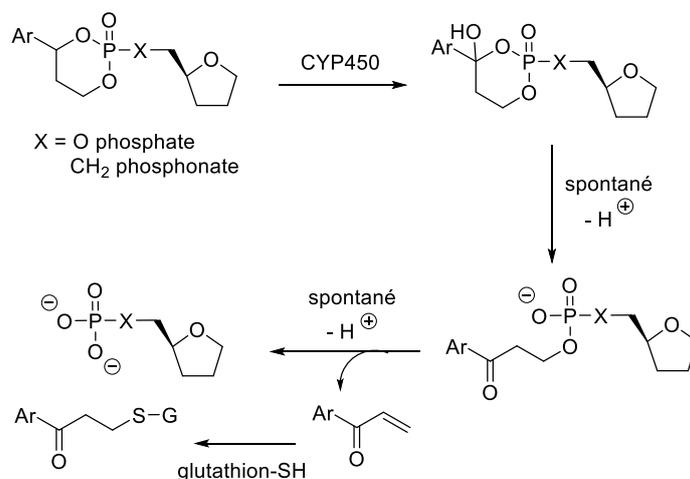


Schéma 26 : Dégradation des prodrogues HepDirect par CYP450

Bien que le produit de  $\beta$ -élimination, une aryl-vinyl-cétone, puisse présenter une certaine toxicité, le glutathion présent dans le foie permet de l'éliminer par conjugaison.

A l'heure actuelle, deux prodrogues HepDirect de nucléosides sont entrés en phase clinique : le pradefovir et le MB07133 (Figure 29).<sup>76</sup>

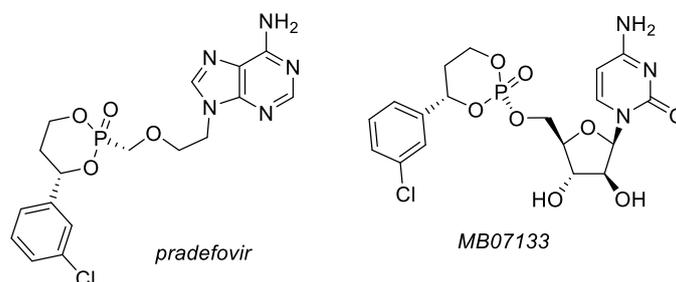


Figure 29: Structures de deux prodrogues HepDirect en phase clinique

Le pradefovir est une prodrogue HepDirect du phosphonate de l'adefovir, composé anti-VHB. L'utilisation de la technologie HepDirect permet ainsi de cibler l'action du composé au niveau du foie et de s'affranchir de certains effets secondaires notamment dus à la néphrotoxicité du composé. En

<sup>92</sup> Erion, M. D.; Reddy, K. R.; Boyer, S. H.; Matelich, M. C.; Gomez-Galeno, J.; Lemus, R. H.; Ugarkar, B. G.; Colby, T. J.; Schanzer, J.; van Poelje, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (16), 5154–5163.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

effet, dans une étude chez le rat, il a été montré que, grâce à l'utilisation de la prodrogue HepDirect, l'accumulation d'adefovir dans le foie a augmenté d'un facteur 12 alors que celle dans les reins a diminué.<sup>93</sup> De plus la biodisponibilité de l'adefovir est améliorée, passant de 31 % à 42 % dans le cas du pradefovir.

### 3.5. Prodrogues à enzymes ciblées

Les prodrogues à enzymes ciblées sont des composés utilisés dans une stratégie prodrogue particulière (Enzyme Prodrug Therapy ou EPT). Dans cette stratégie, les prodrogues sont imaginées de manière à ce que leur bioconversion soit effectuée par une enzyme spécifique, localisée principalement où le composé exerce son activité biologique. De cette manière, la drogue est libérée spécifiquement proche de sa cible. Contrairement aux prodrogues « classiques », l'EPT présente une libération de composé actif moins importante mais qui reste site-spécifique.

Afin de garder une bonne spécificité, les enzymes ciblées sont des enzymes faiblement présentes dans le corps humain ou encore des enzymes exogènes, elles-mêmes introduites par l'action d'anticorps spécifiques (antibody-directed-enzyme-prodrug-therapy ou ADEPT) ou suite à l'expression d'un gène introduit par transfection (gene-directed-enzyme-prodrug-therapy GDEPT ou thérapie par gène suicide).

Une cible intéressante pour une stratégie EPT est la thymidine kinase virale. En effet, les nombreux nucléosides antiviraux agissant sous leur forme triphosphate sont d'excellents substrats de cette enzyme qui va catalyser la première phosphorylation. L'acyclovir, par exemple, est phosphorylé par la thymidine kinase du virus de l'herpès introduite dans les cellules par le virus (Schéma 27). L'enzyme virale étant beaucoup plus active que son homologue humaine, les niveaux d'acyclovir triphosphate sont plus importants dans les cellules infectées que dans les cellules saines. La très forte activité de la thymidine kinase virale ainsi que l'existence de nombreux nucléosides nécessitant cette enzyme pour agir en tant qu'agent antiviral en font une excellente candidate pour des stratégies GDEPT.<sup>71</sup>

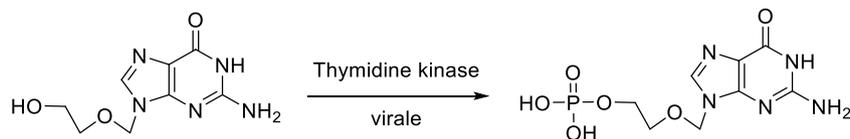


Schéma 27 : Bioconversion de l'acyclovir en acyclovir monophosphate par la thymidine kinase virale

Le système le plus approprié pour l'EPT est probablement l'utilisation de prodrogues glucuroniques et leur enzyme correspondante, la  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Gluc). L'ajout d'un motif glucosidique à une drogue diminue généralement sa pénétration cellulaire du fait de la forte polarité du sucre (Schéma 28). Néanmoins, la faible concentration en  $\beta$ -Gluc dans le corps humain (présente dans les lysosomes) fait que son utilisation diminue fortement la toxicité d'un composé (l'amélioration de l'IC<sub>50</sub> allant jusqu'à un facteur 1000).<sup>71</sup>

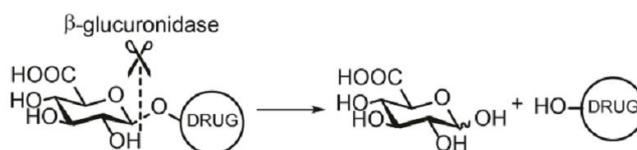


Schéma 28 : Bioconversion de prodrogue comportant un motif glucuronique<sup>71</sup>

<sup>93</sup> Reddy, K. R.; Matelich, M. C.; Ugarkar, B. G.; Gómez-Galeno, J. E.; DaRe, J.; Ollis, K.; Sun, Z.; Craigo, W.; Colby, T. J.; Fujitaki, J. M.; Boyer, S. H.; van Poelje, P. D.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 666–676.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

De la même manière, des composés peuvent être fonctionnalisés sous forme de glucosides ou galactosides (Schéma 29). L'enzyme ciblée par la stratégie EPT est alors une  $\beta$ -glucosidase ou  $\beta$ -galactosidase, très abondantes dans le foie, la rate, les cellules intestinales et les lymphocytes. Les prodrogues glycosidiques présentent une meilleure pénétration cellulaire que leurs homologues glucuroniques et sont capables de cibler sélectivement des tumeurs. En effet, ces prodrogues sont capables d'interagir avec des transporteurs de glucose insulino-dépendants (GLUT-1) surexprimés à la surface des cellules cancéreuses du fait de la forte demande énergétique de ces cellules en prolifération rapide.

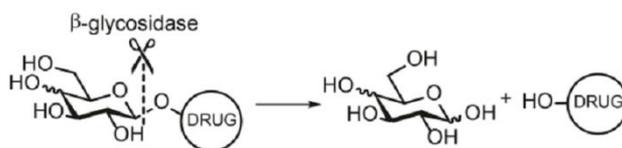


Schéma 29 : Bioconversion de prodrogues glycosidiques<sup>71</sup>

### 4. Stratégie de vectorisation

La vectorisation est une stratégie qui consiste à modifier un composé actif pour le délivrer de manière plus efficace et plus sûre. Le but est donc généralement d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques du composé (ADME) tout en le protégeant de la dégradation induite par le métabolisme. Il est ainsi possible d'utiliser des vecteurs nanoparticules (liposomes, polymères) ou de conjuguer la molécule active à des biomolécules particulières (peptides, glycosides, protéines).

Les stratégies de vectorisation sont préférentiellement appliquées à des biomolécules de taille importante tels que les oligonucléotides. Dans le cas des nucléosides, bien qu'une stratégie prodrogue soit généralement privilégiée, il existe quelques exemples traitant de ces applications. En effet, les propriétés communes entre ces deux types de composés telles que la présence de groupements phosphate chargés négativement, permettent d'envisager l'utilisation de vecteurs ou de bioconjugués pour la délivrance de nucléosides.

#### 4.1. Vecteurs d'oligonucléotides

Les oligonucléotides (ONs) sont des composés largement développés comme agents thérapeutiques dans de nombreuses pathologies notamment dans des traitements anticancéreux. Il existe plusieurs types d'ONs : les oligonucléotides antisens (asON), les petits ARN interférents (siRNA) et les micro-ARN (miRNA).<sup>94</sup> Les asONs agissent sur l'ARN messager par la formation de duplex, ce qui a pour effet d'activer la ribonucléase H (catalysant la dégradation de l'ARN) ou l'arrêt de la traduction et donc de la répllication cellulaire. Les siRNA, quant à eux, interagissent avec la protéine Argonaute-2 pour former un complexe protéique RISC (pour *RNA-induced silencing complex*) qui va couper l'ARN messager ciblé.

Ces composés étant des oligomères de nucléotides, ils sont fortement chargés au pH physiologique du fait des groupements phosphate et ont ainsi une très mauvaise pénétration cellulaire. De plus, leur sensibilité à certaines enzymes telles que les nucléases minimise fortement leur biodisponibilité. Ces limitations ainsi que le fait que les cibles des ONs soient intracellulaires, en font d'excellents candidats pour des stratégies de vectorisation, généralement basées sur des nanoparticules de deux types : les liposomes et les polymères.

<sup>94</sup> Yu, B.; Zhao, X.; Lee, L. J.; Lee, R. J. *AAPS J.* **2009**, *11* (1), 195–203.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 4.1.1. Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques (NPLs) sont des complexes formés entre des ONs anioniques et des lipides cationiques (Figure 30). Ce type de vecteur est certainement le plus utilisé dans le cas des ONs mais si leur action est très bénéfique *in vitro*, leurs interactions avec les opsonines (protéines se liant à des antigènes entraînant leur phagocytose) et leur élimination rapide par les phagocytes du système réticulo-endothélial rendent leur utilisation *in vivo* difficile.<sup>95</sup> L'utilisation *in vivo* des NPLs nécessite donc une fonctionnalisation par un polymère neutre tel que les polyéthylène glycols (PEG) pour minimiser l'élimination du vecteur par les phagocytes.

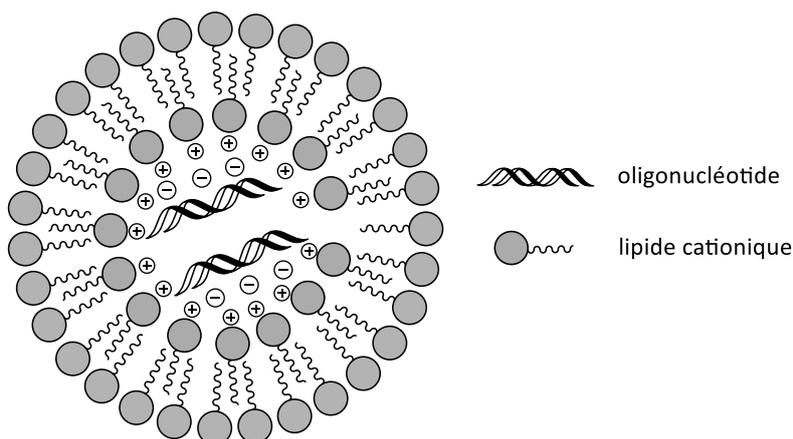


Figure 30: Structure de nanoparticule lipidique complexée par un ON

Du fait de leur taille (100-200 nm), les NPLs ne peuvent être absorbés qu'aux sites où la barrière endothéliale est plus perméable, à savoir le foie, la rate ainsi que certaines tumeurs.<sup>95</sup> Par conséquent, la plupart des études portant sur des ONs délivrés par des NPLs portent sur des maladies du foie dont l'amylose de la transthyrétine, la thrombophilie, le cancer du foie et les troubles du métabolisme des lipides.

L'action des NPLs fait intervenir une pénétration cellulaire par endocytose. Une fois dans les endosomes, les lipides cationiques interagissent avec les lipides anioniques de la membrane et modifient sa structure en formant une phase lipidique appelée phase hexagonale inverse. Cela entraîne la perméabilisation de la membrane ainsi que la dissolution de la particule, libérant ainsi l'ON dans le cytosol. Il convient de noter que si l'interaction lipides cationiques/anioniques est responsable de la libération du composé, elle induit parfois une toxicité.

De nombreux siRNA utilisant des NPLs sont actuellement en développement clinique. Ainsi, l'utilisation de NPLs de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane (DOTAP, Figure 31) de siRNA sur des tumeurs *in vivo* a permis d'observer une efficacité jusqu'à 10 fois supérieure à l'injection d'ON seuls.<sup>96</sup>

<sup>95</sup> Juliano, R. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (14), 6518–6548.

<sup>96</sup> Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 108–119.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

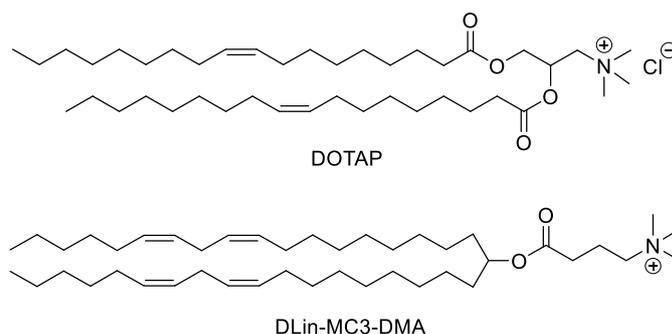


Figure 31: Structure du DOTAP et DLin-MC3-DMA

La deuxième génération de NPLs a permis d'apporter une meilleure efficacité tout en diminuant la toxicité du vecteur. Utilisant des NPLs à base de DLin-MC3-DMA, le vecteur ALN-TTR02 (aussi appelé patisiran) cible la transthyréline (TTR) et a été étudié pour le traitement de la neuropathie amyloïde. En phase clinique, l'administration par injections intraveineuses de l'ALN-TTR02 a permis de réduire la présence de TTR dans le sérum de 85 %.<sup>97</sup>

### 4.1.2. Nanovecteurs polymères

De nombreux vecteurs polymères sont également utilisés pour la délivrance d'oligonucléotides. Il convient d'ailleurs de noter que la première utilisation de siRNA pour le traitement du cancer impliquait une nanoparticule de poly-cyclodextrine.<sup>95</sup>

D'autres nanovecteurs polymères ont ensuite été développés tels que le poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA). Bien que PLGA soit un polymère anionique, il est possible de fonctionnaliser ses chaînes latérales par des groupements cationiques capables de complexer des ONs.

Les micelles polymériques ou nanoparticules « core-shell » sont également un système courant de délivrance des ONs. Ces structures sont formées par auto-assemblage de polymères amphiphiles en milieu aqueux. Généralement, un copolymère à 3 blocs est utilisé, incluant une portion hydrophobe pour l'auto-assemblage, une partie cationique pour complexer les ONs et un polymère neutre comme le PEG pour protéger le vecteur du métabolisme. Ainsi, des études récentes font état d'un nanovecteur hybride composé d'un « cœur » PLGA et d'une enveloppe lipidique pegylée. L'utilisation de ce système a montré d'excellents résultats quant à la délivrance de siRNA dans des tumeurs xénogreffées chez le rat (Figure 32).<sup>98</sup>

<sup>97</sup> Wittrup, A.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (9), 543–552.

<sup>98</sup> Zhu, X.; Xu, Y.; Solis, L. M.; Tao, W.; Wang, L.; Behrens, C.; Xu, X.; Zhao, L.; Liu, D.; Wu, J.; Zhang, N.; Wistuba, I. I.; Farokhzad, O. C.; Zetter, B. R.; Shi, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (25), 7779–7784.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

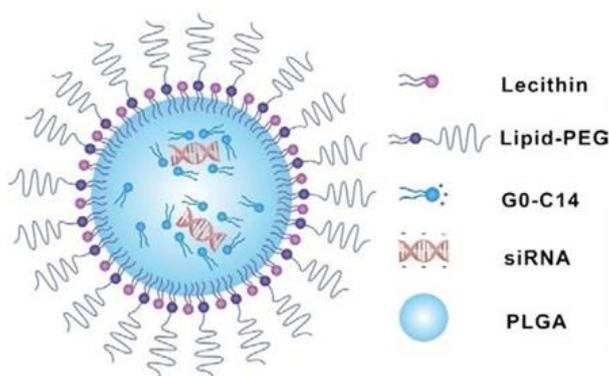


Figure 32: Nanoparticule hybride PLGA/lipides pegylés permettant la délivrance de siRNA<sup>98</sup>

Les nanohydrogels sont un autre type de vecteurs d'ONs. Ces nanoparticules comportent un réseau polymérique piégeant des molécules d'eau et où les ONs peuvent facilement être incorporés (Figure 33). Il est intéressant de noter qu'il est possible de moduler la cinétique de délivrance de l'ON en jouant sur le degré de branchement du réseau. Ainsi, un copolymère poly(méthacrylate de pentafluorophényle)-poly[méthacrylate de *O*-méthyltri(éthylène glycol)] étudié par Nuhn *et al.*,<sup>99</sup> est capable de s'auto-assembler puis d'incorporer des siRNA dans son réseau polymérique. Des expériences par microscopie à fluorescence ont également pu mettre en évidence la pénétration cellulaire du composé (sur cellules RBE4).

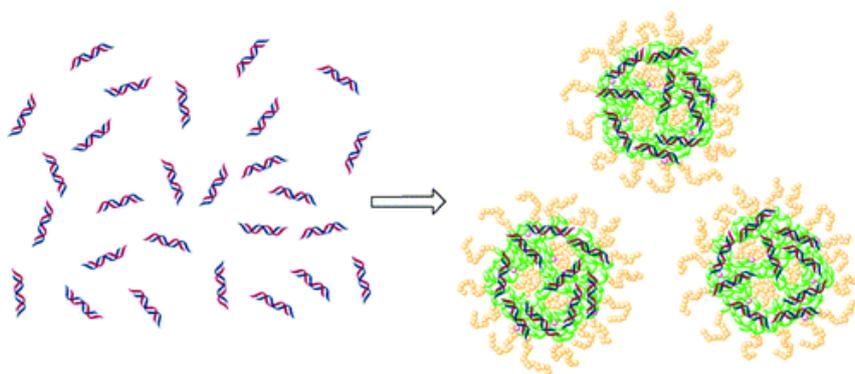


Figure 33: Incorporation de siRNA dans le réseau polymérique d'un nanohydrogel<sup>99</sup>

D'autres systèmes utilisent un complexe entre un ON et les polyéthylène-imines (PEI). Les PEI sont des polymères linéaires ou branchés comportant des fonctions amine pouvant complexer facilement les ON (Figure 34). La présence de ces amines permet également au polymère d'exercer un effet de « pompe à protons ». En effet, ces fonctions sont capables, à pH acide, de se protoner dans l'endosome ou le lysosome, ce qui nécessite un transport accru de protons et de chlorures par la V-ATPase entraînant l'accumulation d'eau, le gonflement et enfin la rupture de l'organite. Si cette propriété fait des vecteurs PEI un système de délivrance des ONs efficace, leur inconvénient majeur reste leur faible biodégradation.

<sup>99</sup> Nuhn, L.; Hirsch, M.; Krieg, B.; Koynov, K.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Helm, M.; Zentel, R. *ACS Nano* **2012**, 6 (3), 2198–2214.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

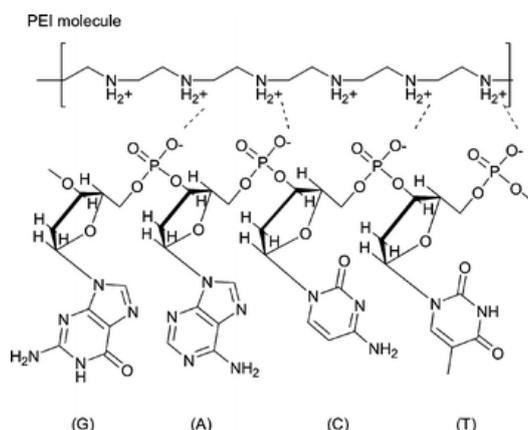


Figure 34: Interaction entre ONs et polymère linéaire de PEI<sup>100</sup>

Enfin, les dendrimères sont des polymères branchés qui peuvent également être utilisés pour la délivrance de composés biologiquement actifs. En contrôlant le degré de branchement, il est possible de préparer différentes « générations » de dendrimères présentant des tailles et un nombre de fonctions réactives différents. Les poly(amidoamines) (PAMAMs) sont probablement les dendrimères les plus utilisés pour la délivrance d'ONs (Figure 35). Comme les PEI, elles sont capables d'exercer un effet « pompe à protons » important, facilitant la délivrance d'ONs dans le cytosol. Néanmoins, leur faible biodégradation ainsi que leurs interactions non-spécifiques avec des protéines induisent une certaine toxicité lors de l'utilisation *in vivo*.

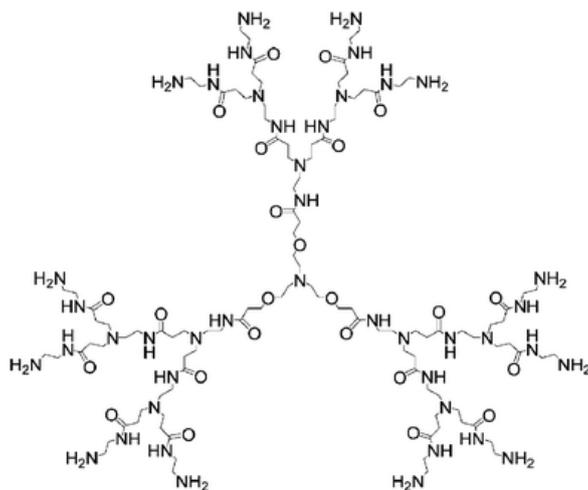


Figure 35: Structure d'un dendrimère PAMAM de deuxième génération comportant un cœur triéthanolamine<sup>101</sup>

### 4.2. Vecteurs de nucléosides

Bien qu'il existe moins d'exemples dans la littérature que pour les oligonucléotides, les nucléosides et leurs analogues peuvent également être délivrés par des nanovecteurs. Comme pour la stratégie prodrogue, l'utilisation de tels systèmes permet de s'assurer d'une meilleure disponibilité et d'une toxicité réduite à la fois pour les nucléosides et pour leur forme triphosphate généralement active.<sup>102</sup>

<sup>100</sup> McBain, S. C.; Yiu, H. H. P.; El Haj, A.; Dobson, J. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2561–2565.

<sup>101</sup> Zhou, J.; Wu, J.; Hafdi, N.; Behr, J.-P.; Erbacher, P.; Peng, L. *Chem. Commun.* **2006**, *0* (22), 2362–2364.

<sup>102</sup> Hillaireau, H.; Le Doan, T.; Couvreur, P. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (9/10), 2608–2617.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 4.2.1. Nanoparticules poly(alkylcyanoacrylate)

Les poly(alkylcyanoacrylates) (PACA) sont parmi les polymères biodégradables les plus utilisés comme nanovecteurs (Figure 36). Des nanosphères de PACA peuvent ainsi être préparées par polymérisation en émulsion avec l'addition de monomère cyanoacrylate à une solution acide de drogue et de surfactant/agent stabilisant. La polymérisation est alors initiée par attaque nucléophile (polymérisation anionique ou cationique) et continue spontanément. De cette manière, le composé actif est incorporé dans le réseau polymérique. Néanmoins, dans certains cas, l'association de nucléosides ou de leurs analogues et de nanoparticules de PACA entraîne l'inactivation du composé due à la création de liaison covalente entre la drogue et le polymère.

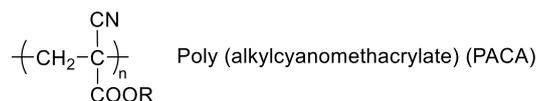


Figure 36: Structure chimique des PACA

Lors d'injections intraveineuses, les nanoparticules de PACA sont généralement absorbées par le foie, la rate et la moelle osseuse. Dans ces tissus, le nanovecteur est généralement éliminé *via* les macrophages du système réticulo-endothélial. De fait, leur potentiel en tant que nanovecteur ciblant les macrophages pour la délivrance d'agent anti-VIH a suscité beaucoup d'intérêt. Ainsi, Löbenberg *et al.*<sup>103</sup> ont étudié la distribution de l'AZT délivrée par des nanoparticules de PACA. Des nanosphères de poly(hexylcyanoacrylate) (PHCA) incorporant de l'AZT (50 % d'efficacité d'incorporation) ont été préparées puis injectées par voie intraveineuse à des rats. Il a alors été montré que la concentration en AZT était plus importante dans les organes appartenant au système réticulo-endothélial, tels que le foie où la concentration en drogue était 18 fois plus importante que lors de l'utilisation d'une solution d'AZT seule.

Une autre étude menée par Dembri *et al.* a montré le potentiel des nanoparticules PACA pour cibler et concentrer l'AZT dans l'appareil digestif. En effet, après administration orale chez le rat, l'utilisation du nanovecteur a permis de concentrer l'AZT au moins 5,9 fois plus que lors de l'administration de la drogue seule. La concentration de nucléoside dans le tissu a même atteint 30-45 µM, bien supérieure à l'IC<sub>50</sub> (0,06-1,36 µM) du composé.

### 4.2.2. Nanoparticules polyesters

Bien que moins utilisées du fait d'un faible taux d'incorporation, les nanoparticules polyesters peuvent également être un moyen de délivrance de nucléosides et de leurs analogues (Figure 37). Ces nanovecteurs sont généralement préparés à partir de polymères préformés évitant ainsi la formation de liaisons covalentes entre la drogue et le polymère lors de la polymérisation. Ils sont formés par ajout d'une solution de polymère dans une phase aqueuse, suivie d'une évaporation du solvant (nanoprécipitation).

<sup>103</sup> Löbenberg, R.; Araujo, L.; von Briesen, H.; Rodgers, E.; Kreuter, J. *J. Control. Release* **1998**, *50* (1-3), 21-30.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

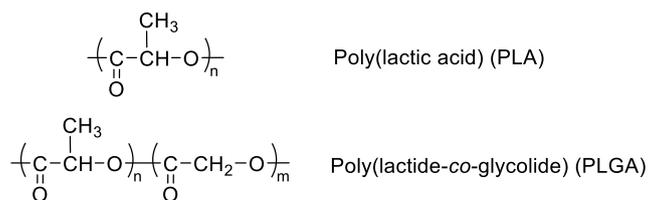


Figure 37: Structure des polymères polyesters utilisés pour la délivrance de nucléosides

Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur l'incorporation de 5-fluorouracile (5-FU) à des nanoparticules de poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA). Malheureusement, le composé est généralement peu piégé (efficacité de 1 à 5 %) et est rapidement libéré (« burst effect »). Ces observations ont été attribuées au fait que la majeure partie de 5-FU est adsorbée sur la surface de la nanoparticule au lieu d'être incorporée en son « cœur ».

Par la suite, Lo *et al.* ont développé des nanoparticules de poly(lactic acid)-*graft*-poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-methacrylic acid) ayant un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile. La 5-FU a ainsi été incorporée bien plus efficacement (jusqu'à 20 %).<sup>104</sup> Il est également intéressant de noter que la délivrance de 5-FU est alors pH dépendante : 80 % à pH 5 mais seulement 15 % à pH 7,4 après 4 jours. Cette propriété pourrait être intéressante pour la délivrance dans le milieu intracellulaire puisque le pH diminue dans les endosomes formés après internalisation du vecteur.

Enfin, des nanoparticules de poly(lactic acid) PLA fonctionnalisées par des PEG ont été développées pour l'administration oculaire d'acyclovir. Même si le taux d'incorporation reste faible (3 à 5 %), l'utilisation de ce système administré par voie oculaire chez le lapin, a permis d'augmenter la biodisponibilité du composé d'un facteur 1,8 et 12,6 comparativement aux nanoparticules sans PEG et au composé seul respectivement.<sup>105</sup>

### 4.2.3. Nanogels et délivrance de nucléoside triphosphate

Comme décrit précédemment, la forme active des nucléosides et leurs homologues est généralement la forme triphosphate. L'administration directe de nucléosides triphosphates est fortement limitée par la faible stabilité de ces composés et surtout par leur hydrophilie diminuant drastiquement leur pénétration cellulaire, d'où l'intérêt de l'utilisation de vecteurs. Néanmoins, le caractère hydrophobe des polymères utilisés pour les nucléosides (PACA et polyesters) défavorise l'incorporation des triphosphates. Vinogradov *et al.* ont ainsi suggéré l'utilisation de nanogels pour la délivrance de nucléosides triphosphate. Ces nanoparticules sont composées d'un réseau hydrophile de poly(éthylène glycol) et poly(éthylène imine) (PEG-PEI) branchés.<sup>106</sup>

Ainsi, la fludarabine 5'-triphosphate (FA-TP), forme active d'un nucléoside anticancéreux, peut être incorporée de manière efficace (jusqu'à 30 %) dans ce type de nanogels. En effet, de la même manière que pour les oligonucléotides, ce sont les interactions ioniques entre les fonctions ammonium du PEI et les phosphates du nucléoside qui permettent son incorporation (Figure 38). Ce système a montré une délivrance continue, une protection de la dégradation enzymatique ainsi qu'une meilleure cytotoxicité sur des cellules cancéreuses humaines MCF-7 *in vitro*.<sup>106</sup>

<sup>104</sup> Lo, C.-L.; Lin, K.-M.; Hsiue, G.-H. *J. Control. Release* **2005**, *104* (3), 477–488.

<sup>105</sup> Fresta, M.; Fontana, G.; Bucolo, C.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Puglisi, G. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (3), 288–297.

<sup>106</sup> Vinogradov, S. V.; Zeman, A. D.; Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. *J. Control. Release* **2005**, *107* (1), 143–157.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

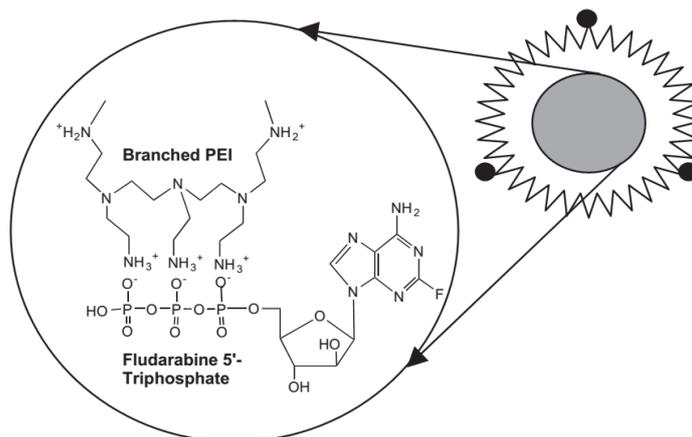


Figure 38: Schéma de la nanoparticule Nanogel incorporant la FA-TP<sup>106</sup>

La même équipe de recherche a également travaillé sur l'utilisation des Nanogels pour l'incorporation d'AZT trisphosphate. Ces nanovecteurs ont montré une bonne incorporation du nucléoside (30 %) et leur utilisation *in vitro* sur des cellules cancéreuses humaines MCF-7 s'est révélée efficace, avec une IC<sub>50</sub> 130 à 200 fois plus faible que l'AZT seul.

### 4.3. Vectorisation et adressage par conjugaison

Que ce soit pour les oligonucléotides ou pour les nucléosides, un intérêt grandissant est porté à l'utilisation de conjugués avec différentes biomolécules pour la délivrance de ces composés. En effet, ces « vecteurs moléculaires » présentent plusieurs avantages par rapport aux nanovecteurs.<sup>95</sup> Tout d'abord, ce sont des composés bien définis qui peuvent être caractérisés par des techniques d'analyse conventionnelles comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectrométrie de masse, contrairement aux nanoparticules qui sont généralement hétérogènes en taille et en nature chimique. Ensuite, ces conjugués présentent généralement une large biodistribution puisqu'ils sont capables de traverser l'endothélium capillaire comme les ONs. De plus, du fait de leur composition relativement simple et l'absence de forte densité de charge positive, ils semblent générer moins de toxicité non-spécifique que les nanovecteurs. Enfin, la biomolécule conjuguée peut être utilisée comme ligand pour cibler spécifiquement un récepteur afin d'adresser le composé actif vers l'organe ou les tissus où il exercera son activité biologique. Même si cela est également possible avec les nanovecteurs (généralement par fonctionnalisation de surface), cela s'accompagne généralement d'interaction non-spécifique.

Néanmoins, ces conjugués présentent également des désavantages dont les plus importants sont leur élimination rapide par les reins du fait de leur petite taille, et leur « charge bioactive » qui est bien moins importante que celle des nanovecteurs. En effet, là où un nanovecteur va entraîner la délivrance de centaines ou milliers de molécules, chaque internalisation de conjugués n'amènera qu'une seule molécule active.

#### 4.3.1. Conjugués avec adressage

Il existe de nombreux conjugués d'ONs ou nucléosides avec des ligands permettant de cibler certains récepteurs ou antigènes (Figure 39). Ces conjugués ont reçu un intérêt croissant ces dernières années du fait de la présence de certaines cibles surexprimées à la surface ou dans l'environnement de cellules cancéreuses.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

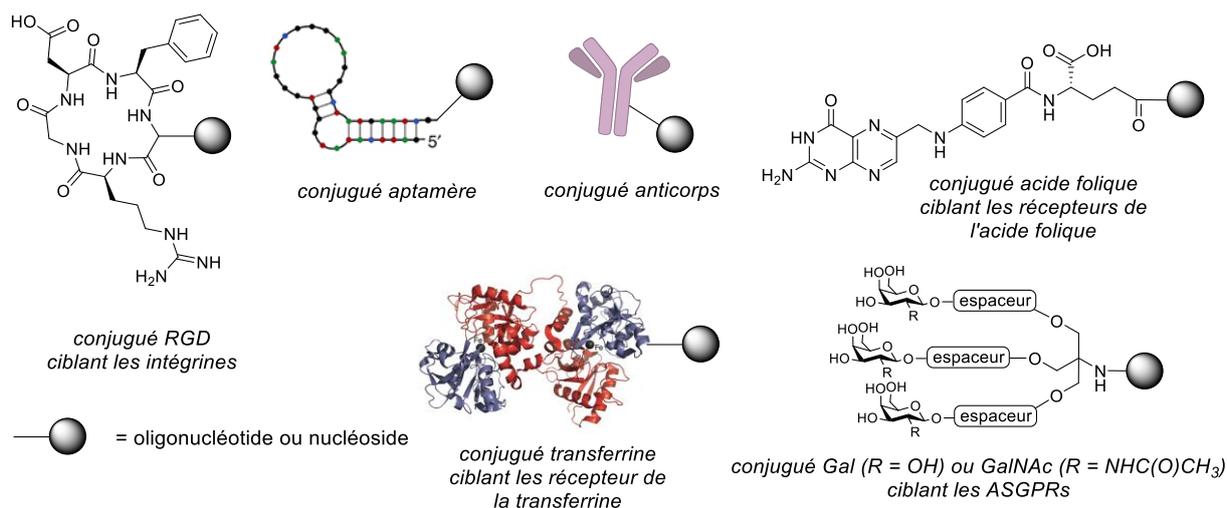


Figure 39: Exemples de conjugués avec adressage

Certains conjugués utilisent ainsi des peptides comme le peptide cyclique Arg-Gly-Asp (RGD) capable de se lier aux intégrines. Liu *et al.*<sup>107</sup> ont ainsi utilisé un conjugué RGD-siRNA pour réduire l'expression du récepteur VEGF-2 essentiel pour l'angiogenèse des cellules tumorales. Le peptide RGD agissant comme un ligand de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  surexprimée à la surface des cellules endothéliales en angiogenèse, le conjugué a permis la délivrance du siRNA par un mécanisme récepteur-spécifique et ainsi de réduire l'expression du VEGF-2 chez la souris.

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont de puissants outils pour l'adressage de composé actif. Le premier conjugué mAb-siRNA a été décrit par Lieberman *et al.*<sup>108</sup> Dans cette étude, un anticorps chimérique a été créé afin de cibler la protéine gp160 du VIH. L'utilisation d'un tel conjugué a montré une activité sur des cellules cancéreuses à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les aptamères sont des acides nucléiques formant des structures tridimensionnelles par appariement intramoléculaire de bases et sont également des composés permettant la délivrance ciblée de drogues (Figure 39). En effet, ces composés présentent de très grandes affinités pour certains antigènes et récepteurs. L'utilisation de conjugués aptamères-siRNA a été développée par Sullenger *et al.*<sup>109</sup> en utilisant un aptamère se liant à un récepteur spécifiquement exprimé à la surface des cellules de la prostate, le PSMA (*prostate-specific membrane antigen*). Le conjugué ainsi obtenu s'est révélé capable de tuer les cellules cancéreuses exprimant le récepteur mais pas les cellules qui ne l'expriment pas, traduisant une excellente sélectivité. Les avantages des aptamères par rapport à d'autres ligands tels que les anticorps sont leur faible immunogénicité et leur synthèse relativement simple permettant d'accéder à une très grande variété de composés.

Enfin, les conjugués les plus étudiés et les plus utilisés sont certainement les glycoconjugués. L'utilisation d'un ou plusieurs motifs galactoside (Gal) ou *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) permet ainsi d'interagir avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs pour *asialoglycoprotein receptors*). Ce système est très efficace pour la délivrance de composés vers le foie puisque les

<sup>107</sup> Liu, X.; Wang, W.; Samarsky, D.; Liu, L.; Xu, Q.; Zhang, W.; Zhu, G.; Wu, P.; Zuo, X.; Deng, H.; Zhang, J.; Wu, Z.; Chen, X.; Zhao, L.; Qiu, Z.; Zhang, Z.; Zeng, Q.; Yang, W.; Zhang, B.; Ji, A. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (18), 11805–11817.

<sup>108</sup> Song, E.; Zhu, P.; Lee, S.-K.; Chowdhury, D.; Kussman, S.; Dykxhoorn, D. M.; Feng, Y.; Palliser, D.; Weiner, D. B.; Shankar, P.; Marasco, W. A.; Lieberman, J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (6), 709–717.

<sup>109</sup> McNamara, J. O.; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (8), 1005–1015.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

ASGPRs sont exprimées en grand nombre à la surface des hépatocytes et entraîne une internalisation rapide du conjugué par endocytose. De plus, des études ont démontré l'affinité de ces ligands pour les ASGPRs à la surface d'hépatocytes avec des  $IC_{50}$  allant d'environ 100  $\mu$ M au nanomolaire suivant la nature du glycoside, de l'espaceur et la multivalence utilisée. Alnylam Pharmaceuticals a ainsi développé un conjugué multivalent GalNAc-siRNA qui a montré une bonne pénétration cellulaire et activité sur des hépatocytes de souris.<sup>110</sup>

Fiume *et al.* ont également effectué une conjugaison avec de l'albumine humaine lactosylée pour délivrer un analogue de nucléotide anti-VHB, l'adénine arabinose monophosphate (ara-AMP).<sup>111</sup> Des études cliniques ont alors montré que l'administration du vecteur à des patients infectés par le VHB pendant 28 jours a un effet antiviral similaire au nucléotide seul, tout en éliminant des effets-secondaires tels que la neurotoxicité.

Oishi *et al.* ont développé un conjugué siRNA-PEG lactosylé en utilisant un espaceur acido-labile. Après internalisation par endocytose du fait de l'interaction avec les ASGPRs, ce lien se rompt dans le milieu légèrement acide de l'endosome, libérant ainsi efficacement le siRNA seul dans les cellules étudiées (Huh7).<sup>112</sup>

Bien que l'effet et la toxicité des glycoconjugués ne soient pas encore totalement définis, cette approche représente, à l'heure actuelle, la meilleure alternative pour la délivrance et l'adressage de composés vers le foie.

### 4.3.2. Conjugués sans adressage

Les conjugués permettant une délivrance d'oligonucléotides ou de nucléosides sans adressage font partie des premières études portant sur des conjugaisons pour de la vectorisation.<sup>95</sup> Ces ligands sont utilisés pour améliorer la pénétration cellulaire du vecteur mais n'apportent pas de sélectivité vis-à-vis des cellules touchées. Les exemples les plus importants sont des conjugaisons avec le cholestérol et avec des peptides de pénétration cellulaire (CPPs pour *cell-penetrating peptides*) (Figure 40).

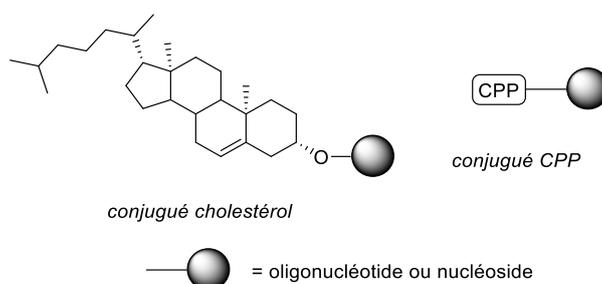


Figure 40: Exemples de conjugués sans adressage

Les conjugués avec le cholestérol comptent parmi les premiers succès des stratégies de vectorisation. L'utilisation de ces conjugués avec des siRNA a permis d'améliorer la pénétration cellulaire dans les hépatocytes de manière significative et d'entraîner l'extinction de certains gènes hépatiques.

<sup>110</sup> 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.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K.; Manoharan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958–16961.

<sup>111</sup> Fiume, L.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Bonino, F.; Torrani-Cerenzia, M.; Verme, G.; Rapicetta, M.; Bertini, M.; Gervasi, G. B. *J. Viral Hepat.* **1997**, *4* (6), 363–370.

<sup>112</sup> Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1624–1625.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

Les CPPs sont généralement des petites séquences peptidiques chargées positivement et capables de traverser la membrane cellulaire. Leur conjugaison à des composés passant difficilement la membrane tels que les ONs ou les nucléosides permet d'améliorer leur pénétration et donc leur activité. Cette conjugaison se fait de manière covalente le plus souvent, mais peut également être effectuée par la formation de complexes dans le cas de certains siRNA, du fait des charges positives portées par les CPPs. Bien que très étudié, leur mécanisme de pénétration cellulaire est encore discuté puisqu'il semble dépendre des conditions expérimentales ainsi que de la nature de la séquence utilisée et du conjugué. Chiu *et al.* ont ainsi conjugué le peptide Tat (YGRKKRRQRRR) à un siRNA qui a alors été internalisé rapidement par les cellules et qui a entraîné l'extinction des gènes cibles.<sup>94</sup>

Plus récemment, des conjugués entre des ONs et des dérivés de la pénétратine (RQIKIWFQNRRMKWVK) incorporant des résidus arginine espacés par des séquences hydrophobes ont été étudiés pour corriger la sous-expression de la dystrophine, qui est la cause de la myopathie de Duchenne. Plusieurs conjugués ont ainsi entraîné une augmentation de l'expression de dystrophine dans les muscles et le cœur.<sup>113</sup>

### 4.4. Stratégie envisagée

Ainsi, différentes stratégies peuvent être mises en place dans le but d'améliorer l'activité thérapeutique d'un nucléoside. Les C-nucléosides semblent être des analogues prometteurs puisque leur lien « glycosidique » C-C renforce leur stabilité dans le métabolisme. Des modifications structurales introduites en position 2', 3' ou sur l'hétérocycle sont également très développées dans l'optique d'améliorer l'efficacité pure du composé. Si ces modifications permettent généralement d'augmenter l'affinité pour la cible, elles ne permettent pas toujours d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques ou la sélectivité. Afin de dépasser ces limitations, les prodrogues ou des stratégies de vectorisation peuvent être envisagées. Ces dernières permettent d'améliorer l'activité en augmentant la biodisponibilité, en diminuant la toxicité ou encore en permettant une délivrance spécifique vers les cellules ou les tissus où l'action du composé est nécessaire.

SRO91 est un C-nucléoside analogue de la ribavirine développé au laboratoire, qui a montré une activité antivirale à spectre large, notamment contre le VHC ( $IC_{50} = 25 \mu M$  sur des réplicons de VHC dans Huh7). Si aucune toxicité n'a été observée *in vitro* (jusqu'à  $100 \mu M$ ), le composé seul ne semble pas présenter de sélectivité pour les hépatocytes.

Comme indiqué précédemment, SRO91 présente une similarité structurale à la Ribavirine, qui laisse présager des activités biologiques et un comportement *in vivo* semblables. Or celle-ci entraîne des effets indésirables à cause de son accumulation dans les globules rouges. Il est donc possible que SRO91 présente la même accumulation. D'autre part, les deux molécules présentent une activité antivirale large spectre, mais faible. Pour ces raisons, l'adressage et la vectorisation semble une stratégie pertinente pour ces deux molécules.

Ce projet a ainsi pour but d'améliorer l'activité anti-VHC de SRO91 tout en diminuant ses potentiels effets secondaires, en utilisant une stratégie de vectorisation.

---

<sup>113</sup> Boisguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; O'Donovan, L.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 52–67.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

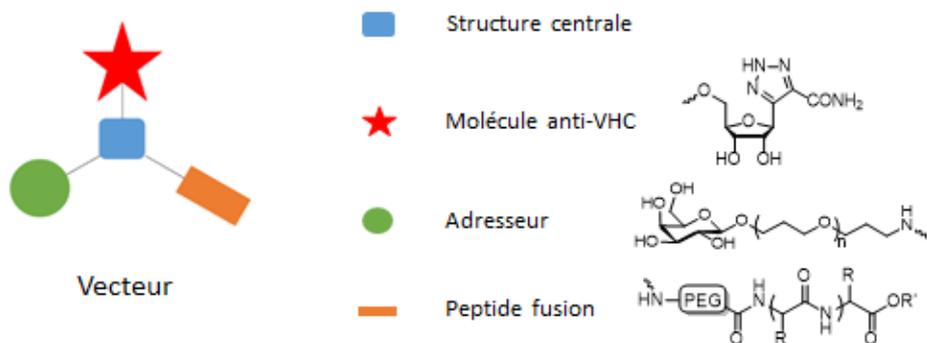


Figure 41: Représentation schématique du vecteur envisagé

La stratégie envisagée repose sur l'utilisation de conjugaisons avec deux ligands (Figure 41) :

- Un adresseur, dérivé du galactose ou de la *N*-acétylgalactosamine. En effet, les cellules infectées par le VHC étant les hépatocytes, l'utilisation de ces composés devrait permettre de créer une interaction entre les récepteurs aux asialoglycoprotéines et le vecteur. Ce ligand permettrait donc de cibler spécifiquement les hépatocytes, voire d'entraîner la pénétration cellulaire par endocytose.
- Un agent de pénétration cellulaire, un peptide de fusion du VHC qui pourrait interagir et déstabiliser la membrane cellulaire ou endosomale permettant ainsi la libération de la molécule d'intérêt biologique dans le milieu intracellulaire.

Ce projet de doctorat s'articule spécifiquement sur trois axes décrits ici. Le premier correspond à la synthèse d'un conjugué entre SRO91 et un galactose afin de vérifier l'apport de ce dernier sur l'activité en tant qu'adresseur. Le deuxième porte sur la synthèse de plusieurs séquences peptidiques issues des protéines de fusion du VHC, fonctionnalisées par différents motifs, notamment la conjugaison avec SRO91 et avec un fluorophore (Schéma 30). Enfin, le troisième axe de ce projet se penche sur l'analyse, par calorimétrie (DSC, ITC) et fluorescence, des interactions entre ces peptides et des liposomes utilisés en tant que modèles de membrane cellulaire, afin d'émettre une hypothèse quant à l'activité de ces séquences et leur possible utilisation dans une stratégie de vectorisation.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

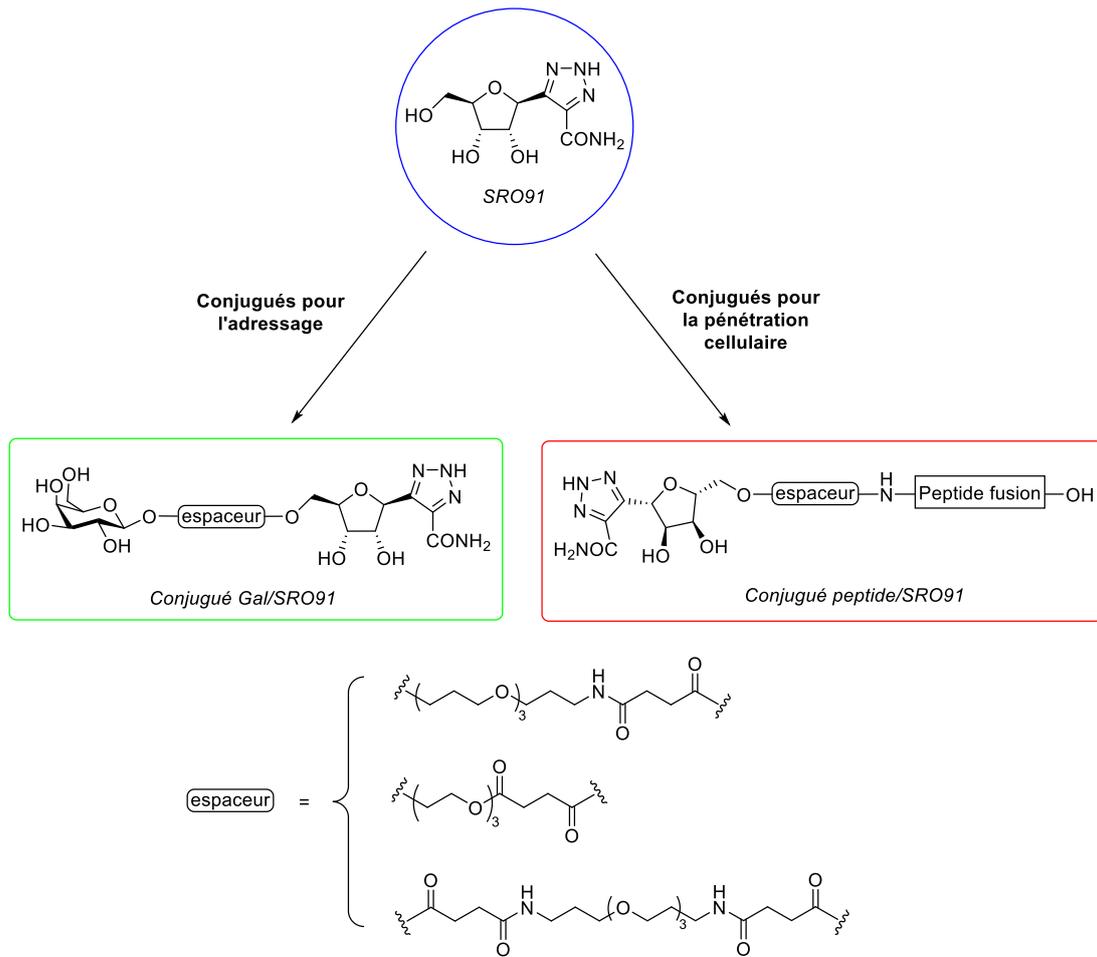


Schéma 30 : Structure des conjugués ciblés dans ce projet



## **Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes**



### Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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

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

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



## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

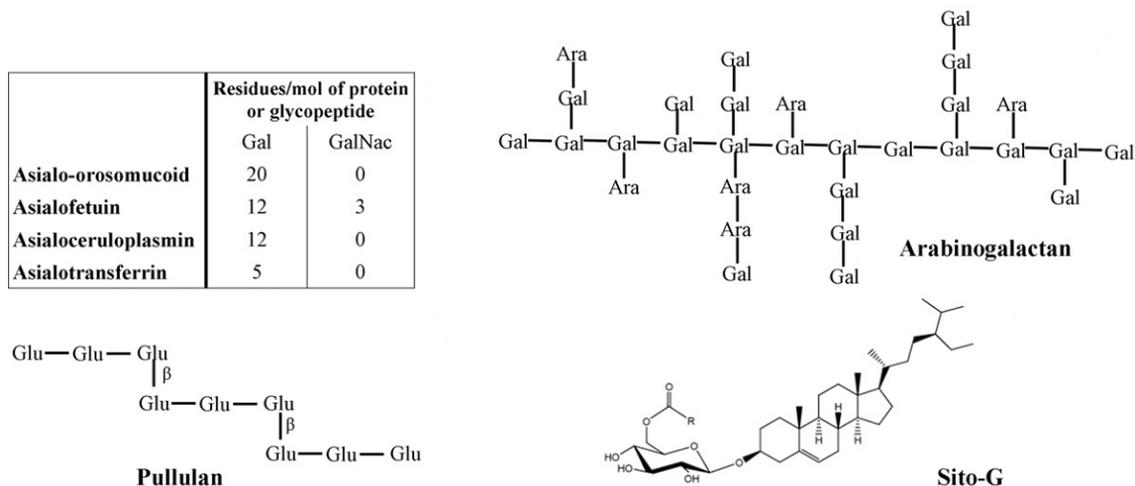


Figure 44: Différents ligands des ASGPRs<sup>120</sup>

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

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

#### 2.1. Conjugués monovalents

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

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

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

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

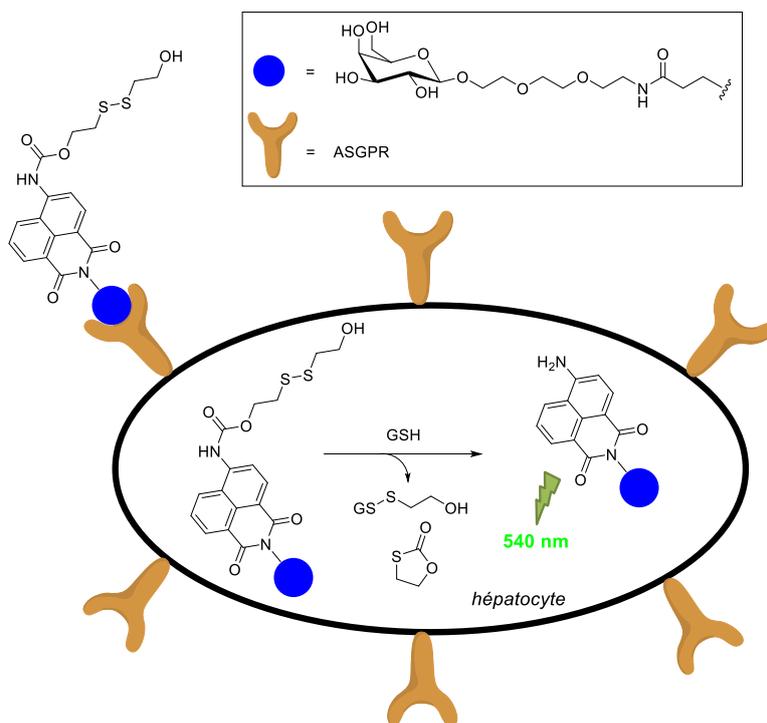


Schéma 31 : Schéma de fonctionnement du conjugué Gal-Naphthalimide pour du diagnostic

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

L'utilisation de galactose permet alors de délivrer spécifiquement l'enzyme dans l'hépatocyte puis, après internalisation de la prodrogue par endocytose, de libérer le composé actif par dégradation enzymatique (Schéma 32). L'utilisation d'un tel système a ainsi permis de réduire des tumeurs HepG2 orthotopiques chez la souris.

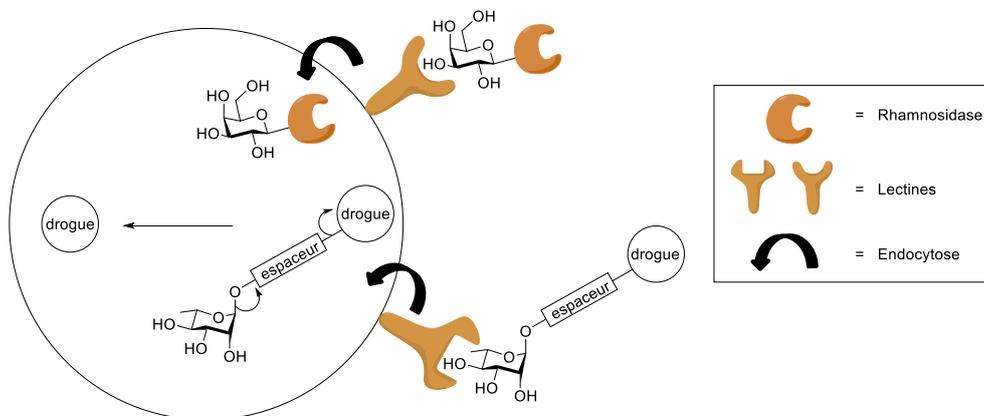


Schéma 32 : Schéma de la stratégie LEAPT utilisant des conjugués galactosides monovalents

### 2.2. Conjugués multivalents

Les conjugués galactosides multivalents pour l'adressage de molécules vers les hépatocytes sont bien plus représentés dans la littérature. En effet, la conformation principale des ASGPRs étant trimérique, l'utilisation de plusieurs motifs galactosides permet d'améliorer considérablement l'affinité pour le récepteur. Des valeurs d' $IC_{50}$  sur les ASGPRs de lapin ont ainsi pu montrer que généralement, l'affinité augmentait avec le nombre de motifs galactosides ( $10^{-9}$ ,  $5.10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$   $M^{-1}$  pour des ligands tétra-, tri-, bi- et monovalents respectivement).<sup>117</sup> Il est intéressant de noter que l'affinité optimale est atteinte lors de l'utilisation de 3 galactosides et n'augmente pas ou très peu avec le ligand tétravalent. Cela est certainement dû au fait que la configuration la plus répandue des ASGPRs est un trimère.

Ce type de conjugué est constitué de 2 ou 3 galactosides, d'espaceurs et d'un répartiteur dont la fonctionnalité dicte la multivalence du produit final (Figure 45).

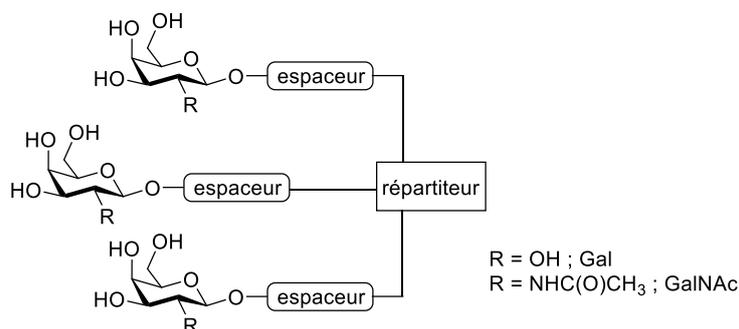


Figure 45: Structure générale d'un ligand galactosidique trivalent

De nombreux efforts ont été fournis ces dernières années pour développer des ligands multivalents afin d'obtenir un adressage optimal vers les ASGPRs. Puisque le site d'interaction du récepteur est supposé être agencé dans une configuration triangulaire de 15 à 25 Å de côté, des propriétés telles que la longueur de l'espaceur, son hydrophilie et la géométrie spatiale apportée par le répartiteur sont des facteurs importants à considérer pour les ligands multivalents.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

### 2.2.1. Ligands bivalents

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

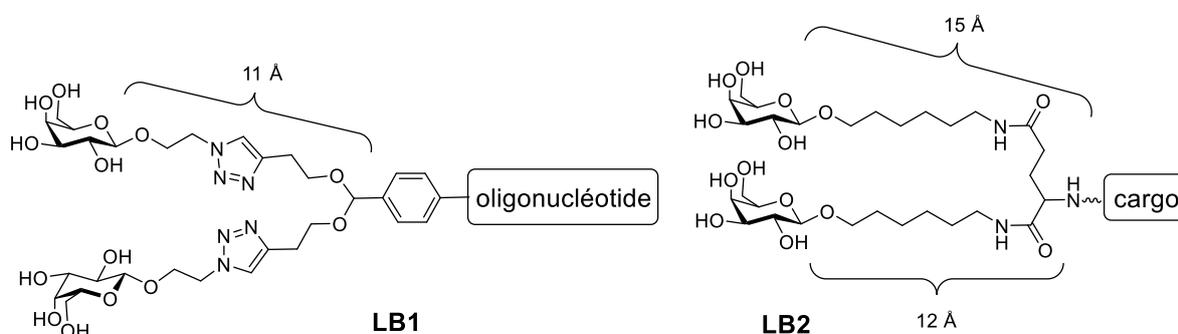


Figure 46: Exemples de ligands galactosides bivalent **LB1** et **LB2**

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

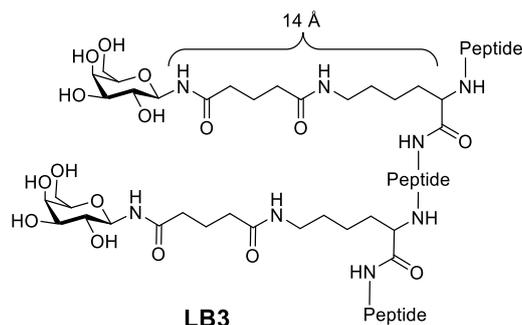


Figure 47: Structure du ligand LG3 développé par Zacco et al.

### 2.2.2. Ligands trivalents

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

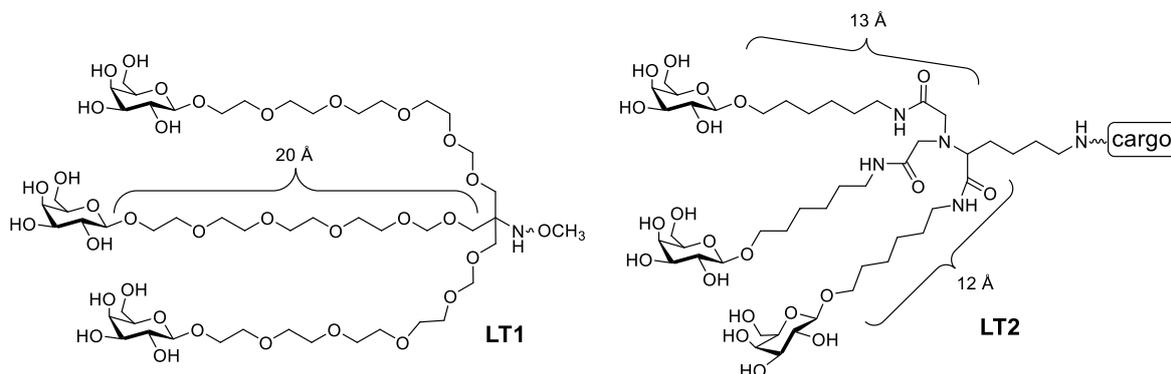


Figure 48: Exemples de structures de ligands galactosides trivalents

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

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

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

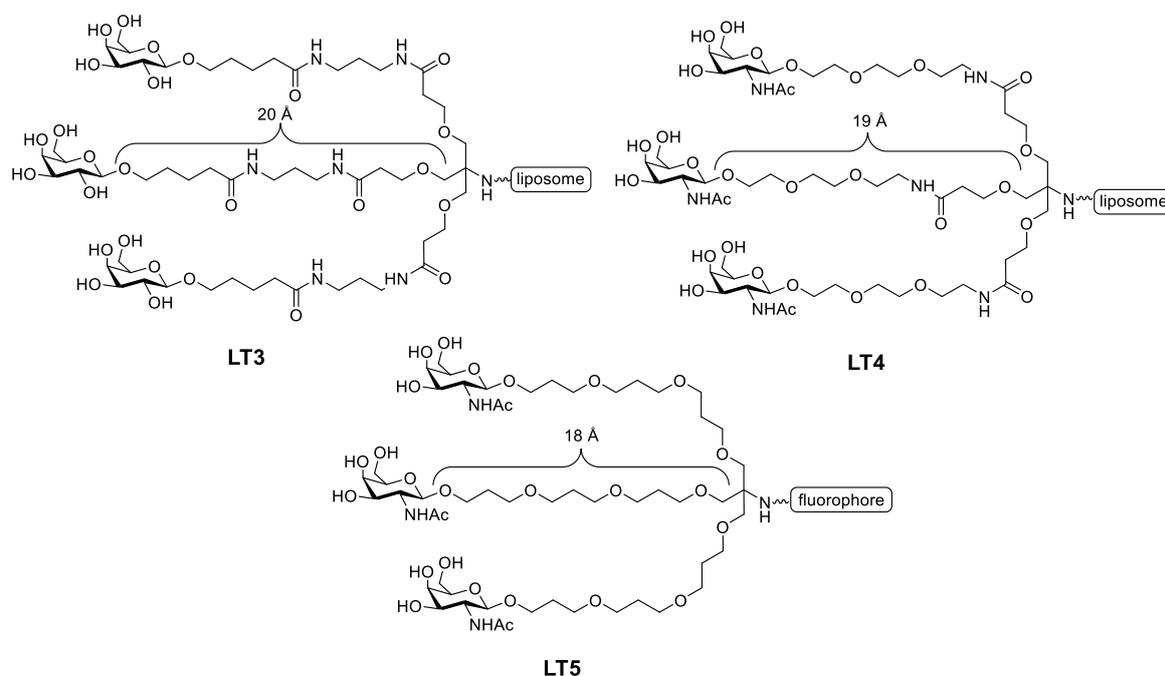


Figure 49: Exemples de LTs avec espaceurs hydrophile/hydrophobe

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

Une autre étude, menée par Ernst *et al.*, a permis de montrer l'importance du ratio hydrophile/hydrophobe de l'espaceur.<sup>130</sup> Pour cela, le ligand **LT5** a été préparé (Figure 49) en remplaçant des espaceurs oligoéthylène glycols habituellement utilisés par des motifs propylène glycols permettant une bonne combinaison entre flexibilité et ratio hydrophile/hydrophobe. Dans ce ligand, le répartiteur Tris et l'espaceur d'une longueur de 18 Å ont permis d'orienter les sucres de manière à obtenir une distance de 29 Å entre chaque résidu. La conjugaison de ce ligand avec un fluorophore a permis de vérifier, par microscopie confocale et cytométrie de flux, la pénétration dans des cellules HepG2 par l'association avec des ASGPRs.

Enfin, l'importance de la géométrie spatiale du répartiteur a déjà été abordée dans le cas des ligands bivalents avec l'ajout d'un motif Gal au ligand **LB3**. On peut également citer les travaux de Lee qui a utilisé un répartiteur basé sur l'acide glutamique afin de préparer le ligand **LT6** (Figure 50).<sup>131</sup> Bien que l'affinité de ce ligand pour les ASGPRs se soit révélée excellente avec des IC<sub>50</sub> allant de 1 à 10 nM dans des essais de compétition, il reste cependant 10 fois moins actif que l'homologue GalNAc du ligand **LT2** qui présente les mêmes espaceurs mais un répartiteur différent. A nouveau, cette observation a été expliquée par la géométrie « brush-like » du répartiteur de **LT6**, ne permettant pas une association optimale avec le récepteur de géométrie triangulaire.

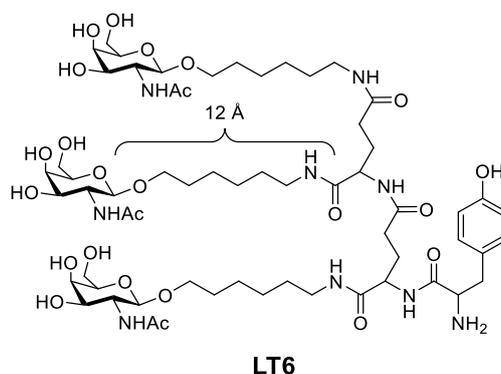


Figure 50: Structure du ligand **LT6**

Ainsi, l'utilisation de ligands galactosides permet de cibler et délivrer spécifiquement des composés dans les hépatocytes grâce à leur interaction forte avec les ASGPRs exprimés à la surface de ces cellules. Si l'utilisation de GalNAc et de plusieurs galactosides semble améliorer l'affinité pour les récepteur, la structure de l'espaceur (longueur et balance hydrophile/hydrophobe) et du répartiteur (géométrie spatiale) sont également des facteurs clés pour l'optimisation de l'interaction.

### 3. Design et synthèse du conjugué Gal/SRO91

Dans l'optique d'étudier l'amélioration de l'activité du nucléoside SRO91 en ciblant spécifiquement les hépatocytes, nous avons ainsi décidé de synthétiser et de caractériser un conjugué entre un galactose et la molécule anti-VHC, dans un premier temps. Le Gal a été préféré à la GalNAc pour des raisons de facilité de synthèse et les premiers efforts ont été concentrés sur l'obtention et la caractérisation du conjugué 1-1 (Figure 51). Pour cela, deux espaceurs ont été envisagés : un dérivé du tripropylène glycol (TPG) et un triéthylène glycol (TEG) couplé à un bras succinique.

<sup>130</sup> Khorev, O.; Stokmaier, D.; Schwardt, O.; Cutting, B.; Ernst, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (9), 5216–5231.

<sup>131</sup> Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconj. J.* **1987**, *4*, 317–328.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

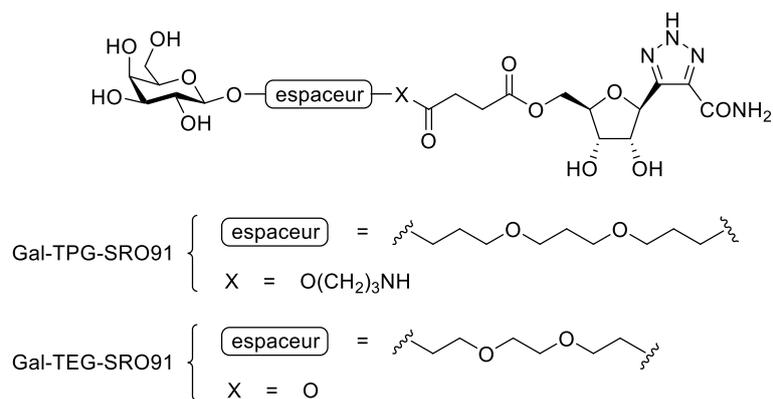


Figure 51: Structures envisagées pour le conjugué Gal-SRO91 1-1

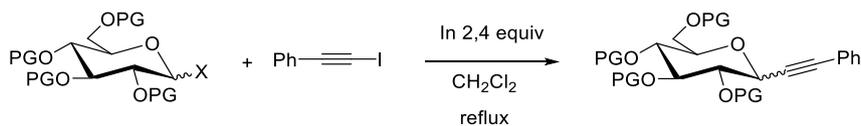
### 3.1. Alcynylation médiée à l'indium

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

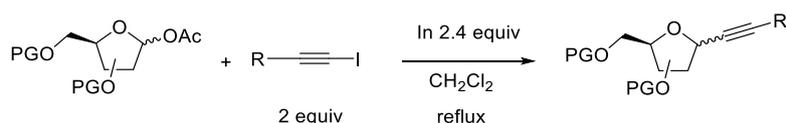


Glycoside de départ	Ratio anomères	temps	rendement (%)	Produit final	Configuration C <sub>1</sub>
	$\alpha/\beta = 20/80$ $\alpha/\beta = 95/5$	24 h 24 h	86 0		$\alpha/\beta > 98/2$ dr = 98/2
	$\alpha/\beta > 2/98$	26 h	92		$\alpha/\beta > 98/2$ dr = 89/11
	$\alpha/\beta = 25/75$ $\alpha/\beta = 88/12$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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes



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

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

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

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

### 3.2. Synthèse du building-block SRO91

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

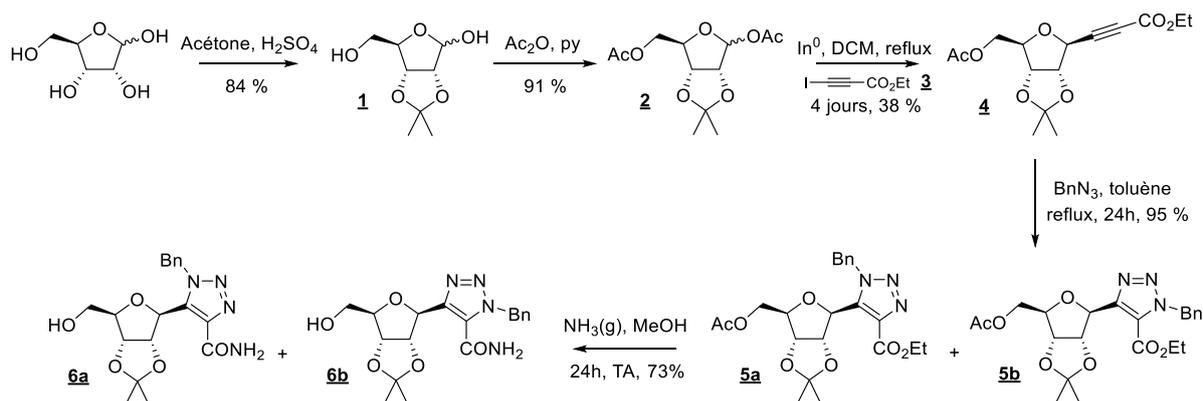


Schéma 33 : Schéma de synthèse de SRO-91 protégé

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

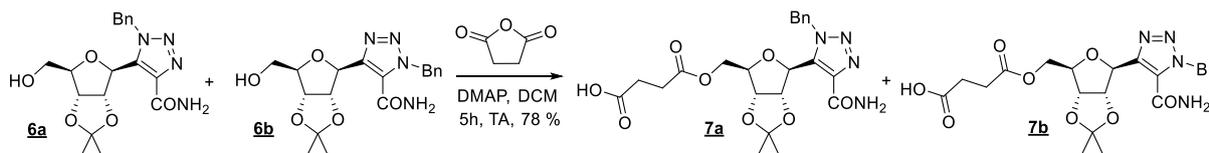


Schéma 34 : Ouverture de l'anhydride succinique par SRO-91 protégé

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

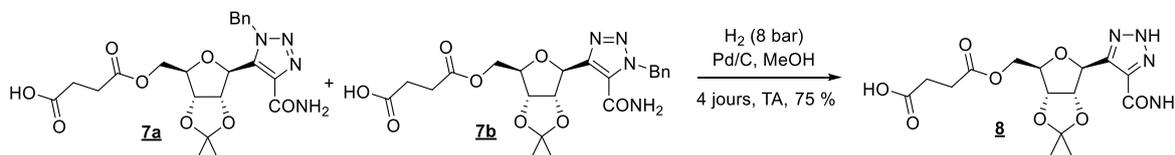


Schéma 35 : Synthèse du building-block débenzylé **8**

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

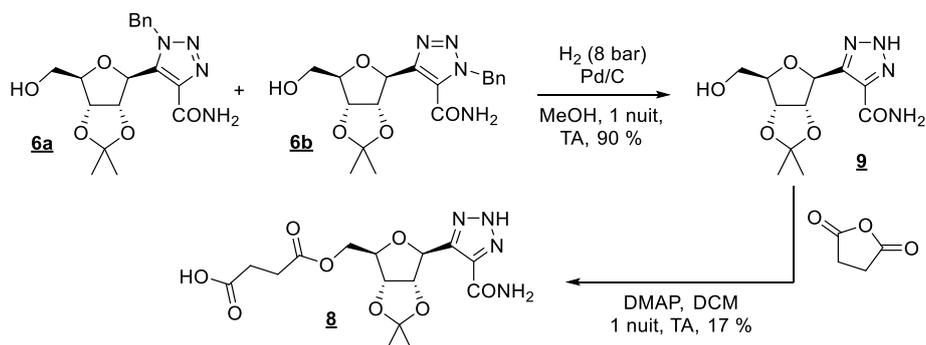


Schéma 36 : Deuxième stratégie de synthèse du building-block envisagée

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

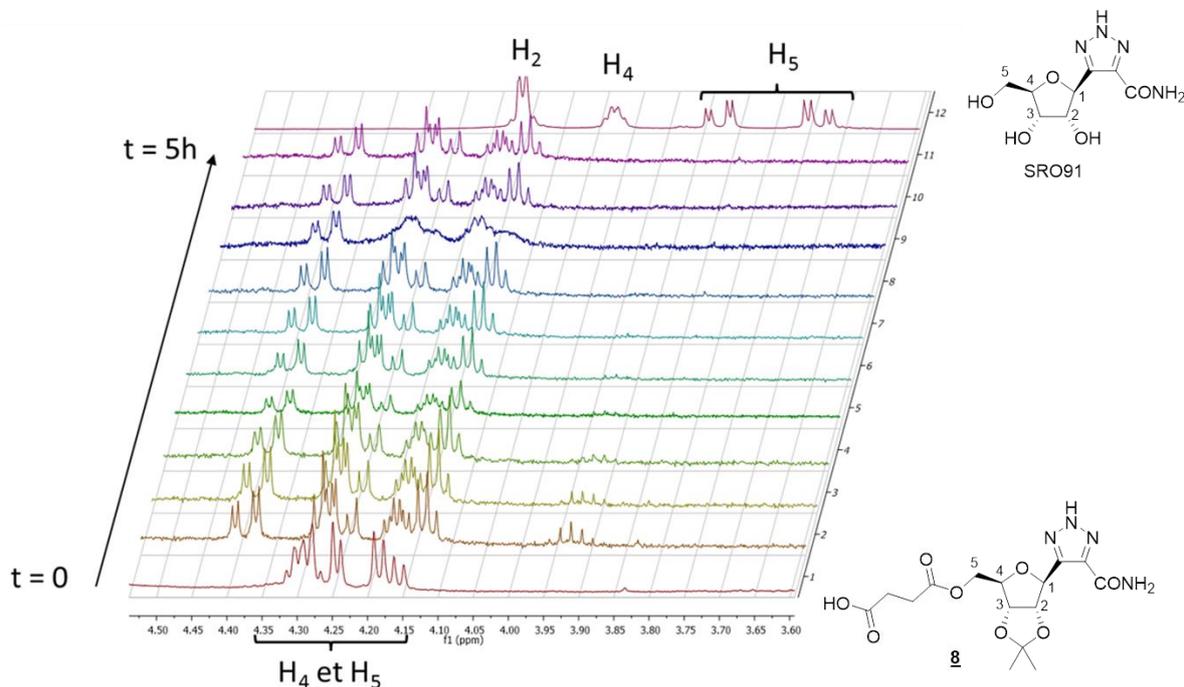


Figure 52: Spectres RMN <sup>1</sup>H du test de stabilité du composé **8** dans les conditions de clivage peptidique

### 3.3. Synthèse de l'adresseur

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

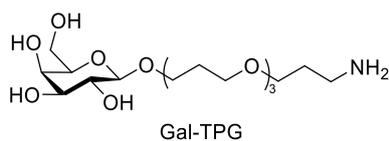


Figure 53: Structure de l'adresseur Gal-TPG

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

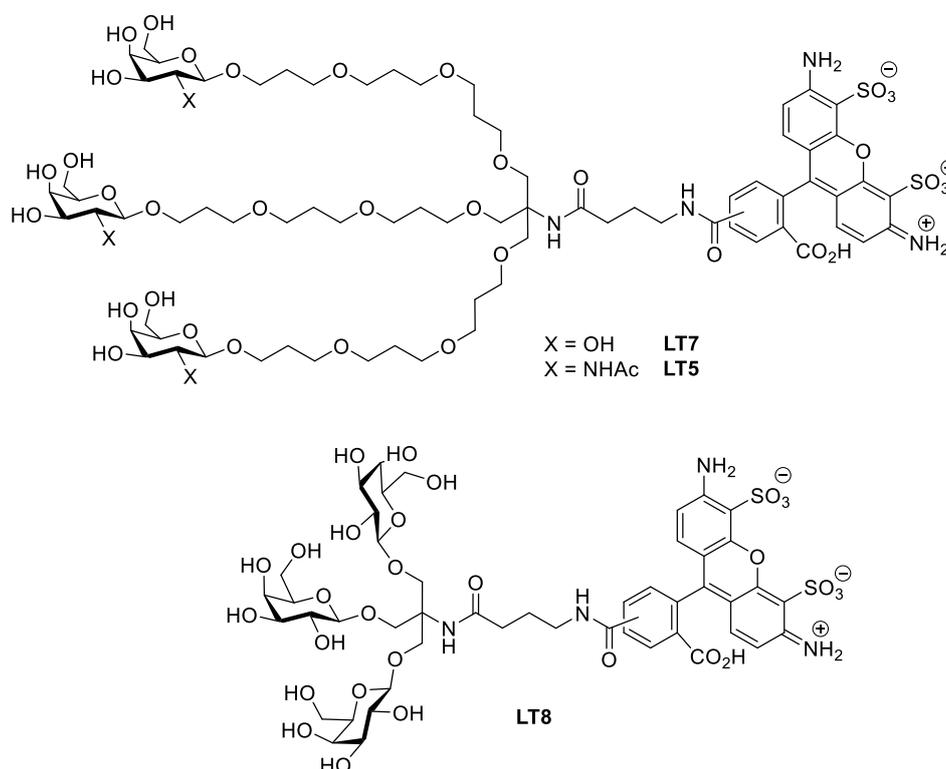


Figure 54: Conjugués synthétisés et étudiés par Khorev *et al.*

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

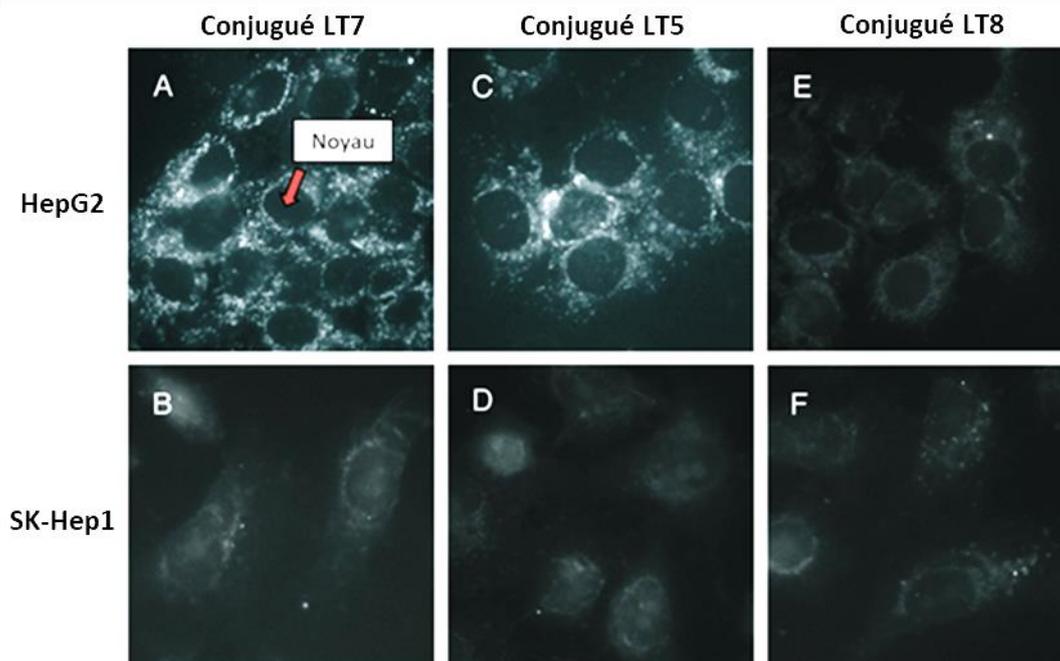


Figure 55: Microscopie à fluorescence des conjugués Gal-TPG (LT7), GalNAc-TPG (LT5) et Gal sans TPG (LT8)<sup>130</sup>

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

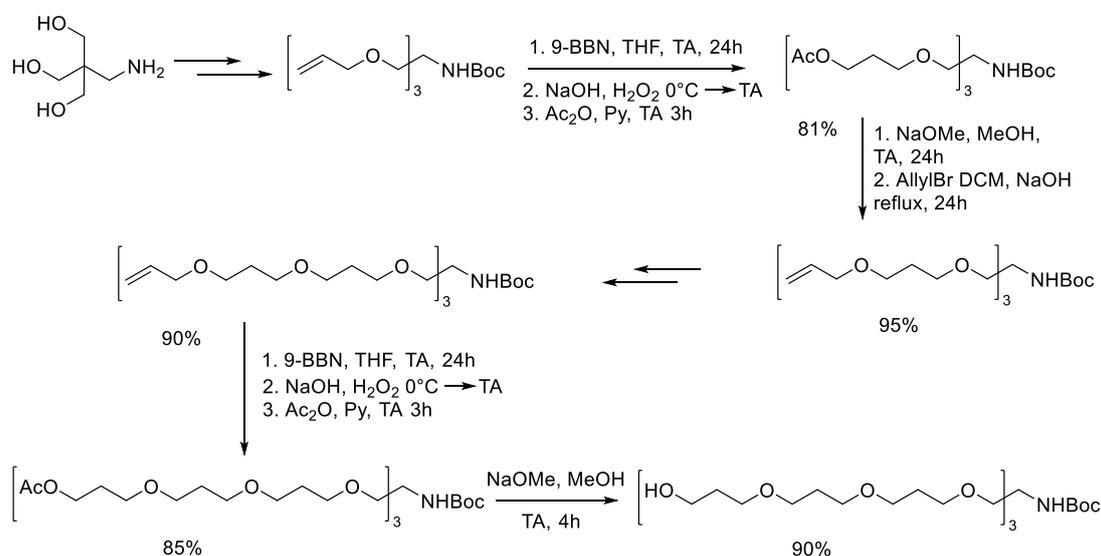


Schéma 37 : Elongation des chaînes propylène glycol par allylation et hydroboration itératives

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

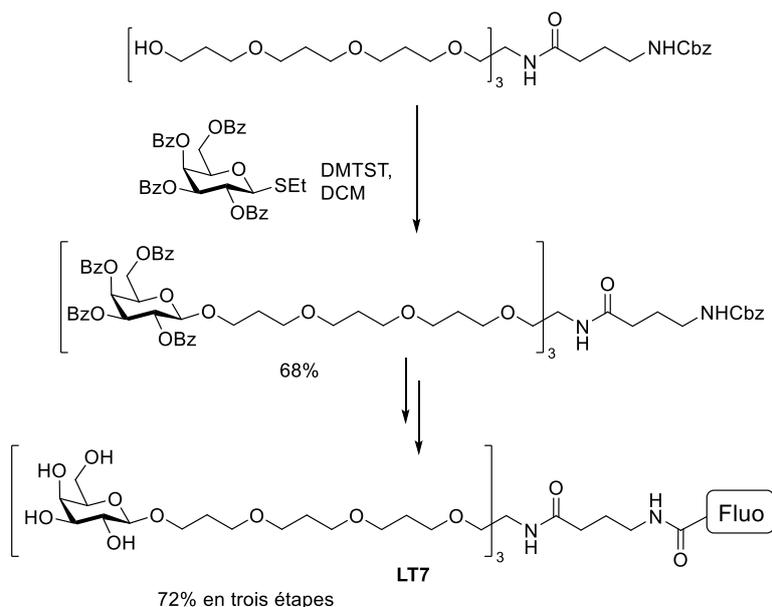


Schéma 38 : Glycosylation en présence de DMTST pour l'obtention du conjugué LT7

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

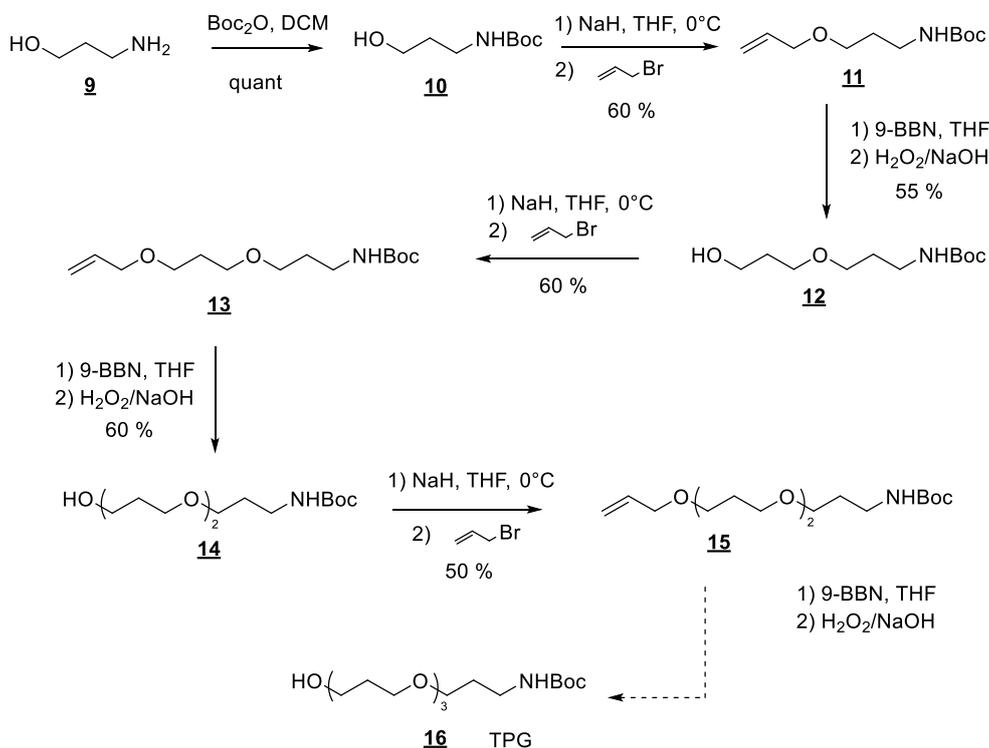


Schéma 39 : Synthèse de l'espaceur TPG

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

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

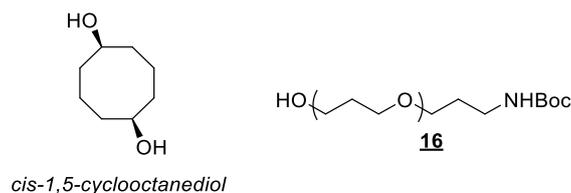


Figure 56: Structure du *cis*-1,5-cyclooctanediol de polarité proche du composé **16**

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

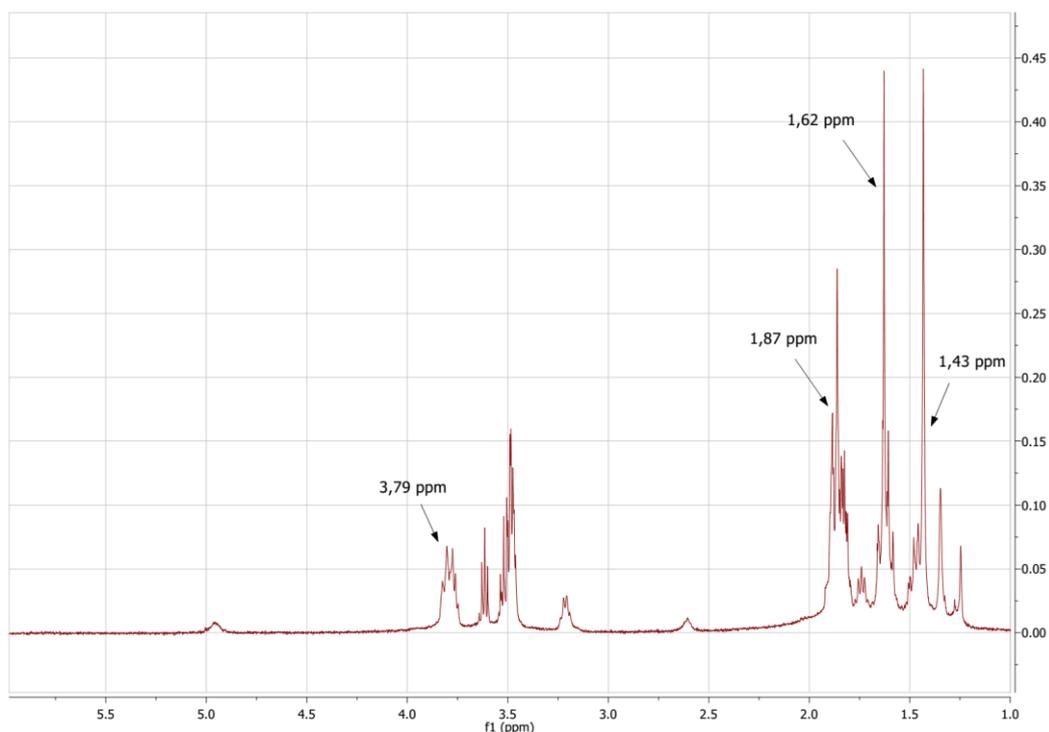


Figure 57: Spectre RMN <sup>1</sup>H du mélange composé **16** et *cis*-1,5-cyclooctanediol

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

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

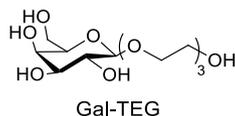


Figure 58: Structure de l'adresseur Gal-TEG

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

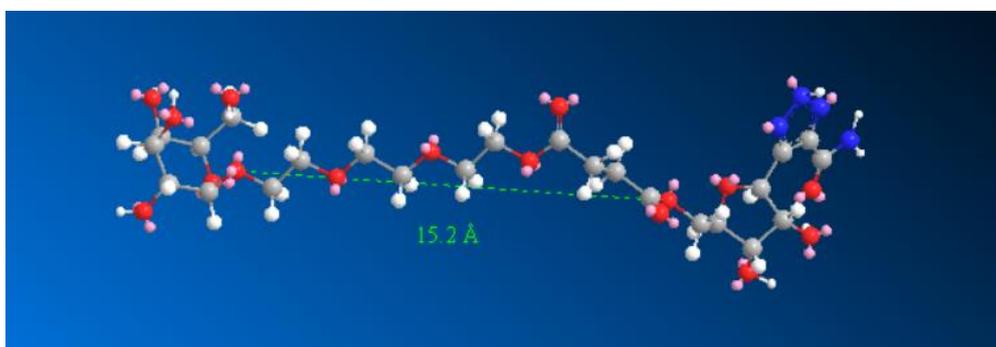


Figure 59: Modélisation du conjugué en utilisant un modèle de minimisation d'énergie MM2 sur le logiciel ChemBioDraw

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

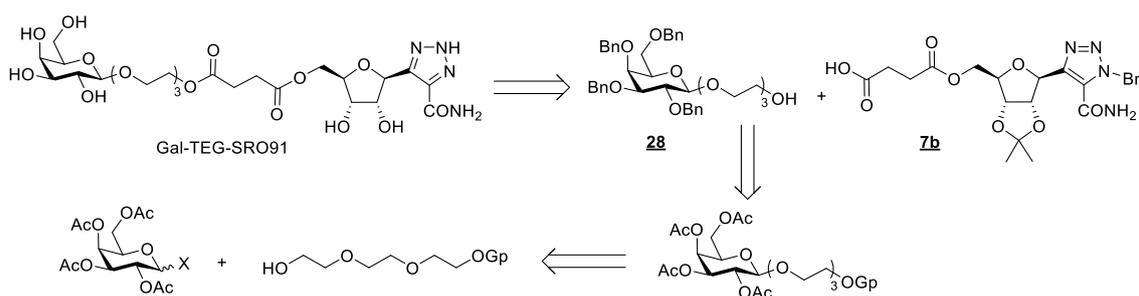


Schéma 40 : Schéma retrosynthétique de l'obtention du conjugué Gal-TEG-SRO91

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

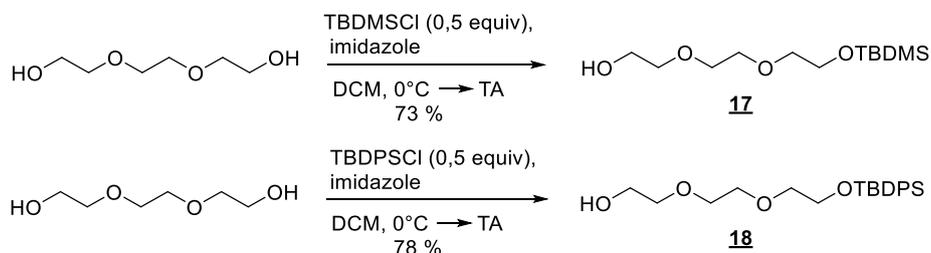


Schéma 41 : Synthèse des espaceurs TEG monoprotégés par des silanes

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

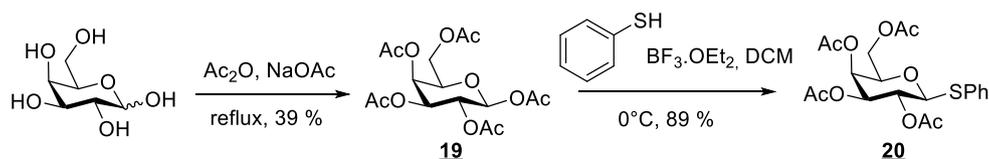


Schéma 42 : Synthèse des thiophénylacétogalactosides

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

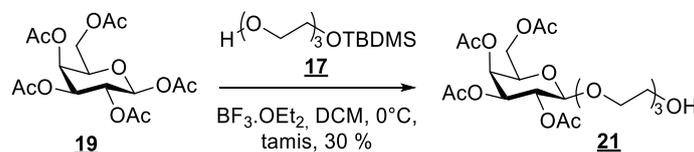


Schéma 43 : Produits de glycosylation entre les composés **19** et **17** en présence de  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$

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

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

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

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

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

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

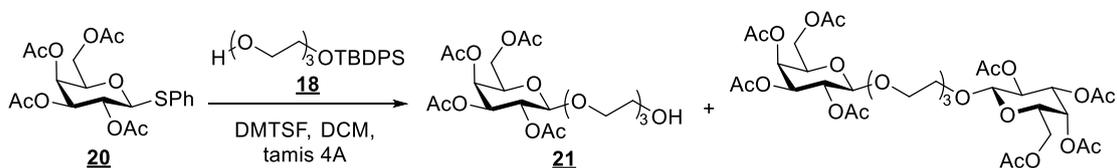


Schéma 44 : Produits obtenus après glycosylation du thioglycosides par le composé **18**

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

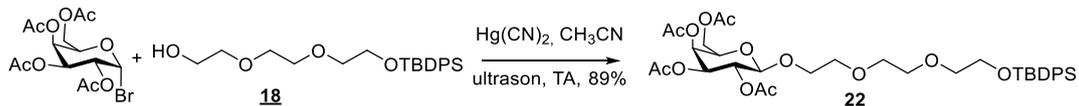


Schéma 45 : Préparation du galactoside **22** à partir de l'acétobromogalactose dans les conditions d'Helferich

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

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

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

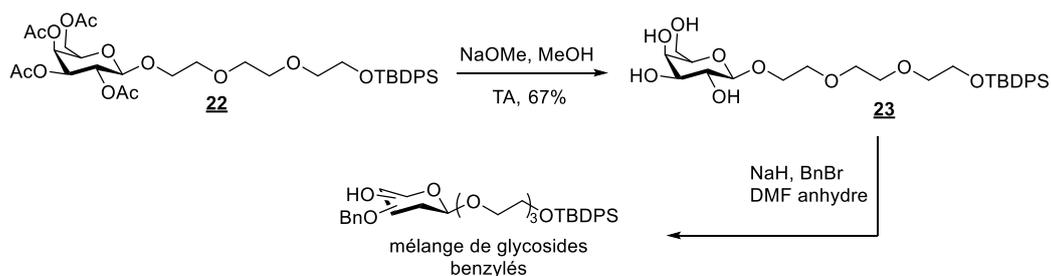


Schéma 46 : Changement de groupement protecteur en 2 étapes

En raison de ces difficultés, le changement de groupement protecteur a été réalisé en une étape en utilisant de la potasse et le chlorure de benzyle à reflux.<sup>137</sup> Cependant, le groupement TBDPS n'est pas stable dans des conditions aussi drastiques. En effet, une analyse RMN <sup>1</sup>H après purification du composé obtenu montre l'absence de signaux caractéristiques du silyle (vers 1 ppm, Figure 60).

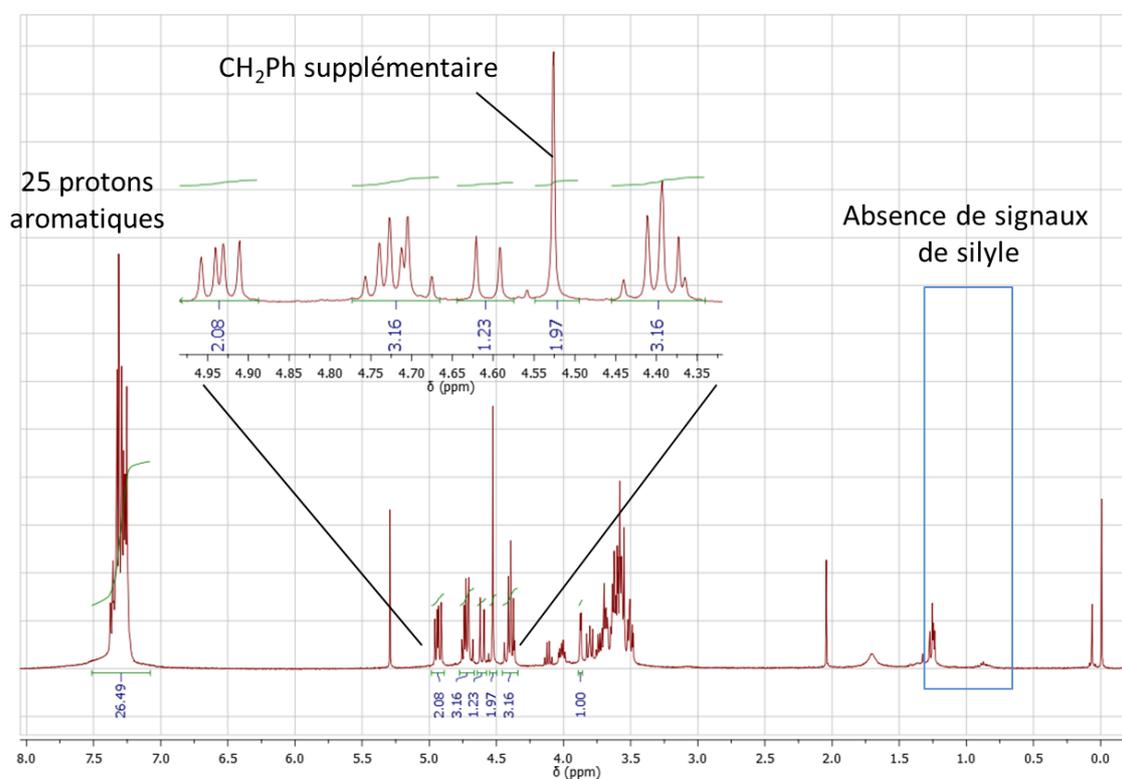


Figure 60: Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé perbenzylé **24** obtenu

De plus, on observe que l'intégration des protons aromatiques ne convient pas à la structure de la molécule attendue puisqu'elle correspond à 25 protons. La région entre 4,3 et 5 ppm montre également la présence d'un CH<sub>2</sub> benzylique supplémentaire, sous la forme d'un singulet caractéristique d'une libre rotation. L'ensemble de ces observations indique que le groupement TBDPS a été remplacé par un groupement benzyle. Il a donc été supposé que l'alcool primaire de la chaîne TEG libéré après déprotection était également benzylé (Schéma 47). Ces observations tendent à indiquer que le changement de groupement protecteur est très efficace dans ces conditions mais que l'éther silylé n'est pas un groupement adapté.

<sup>137</sup> Asai, N.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (9), 1210–1215.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

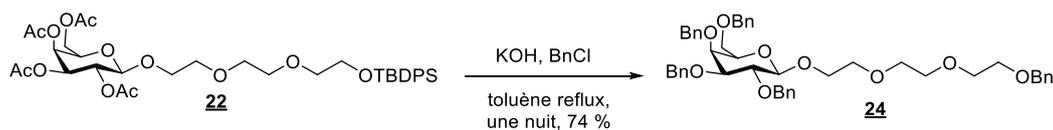


Schéma 47 : Perbenzylation du composé **22** en présence de potasse et BnCl

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

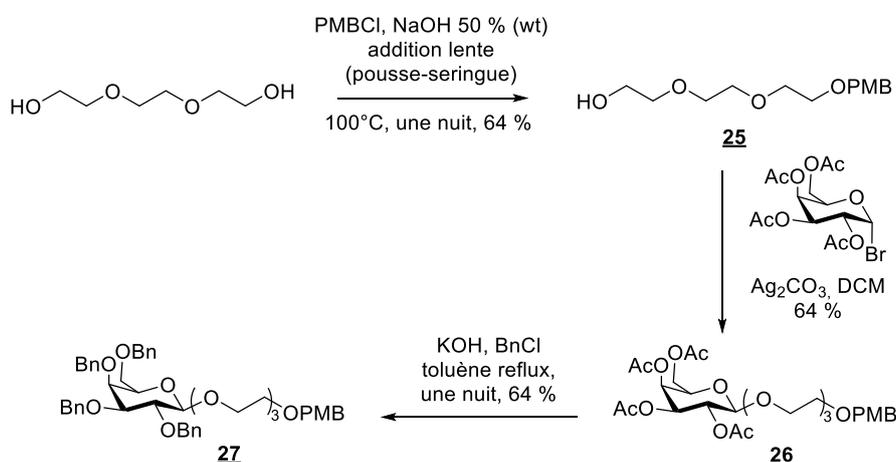


Schéma 48 : Synthèse du galactoside **27** par glycosylation de Koenigs-Knorr

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

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

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

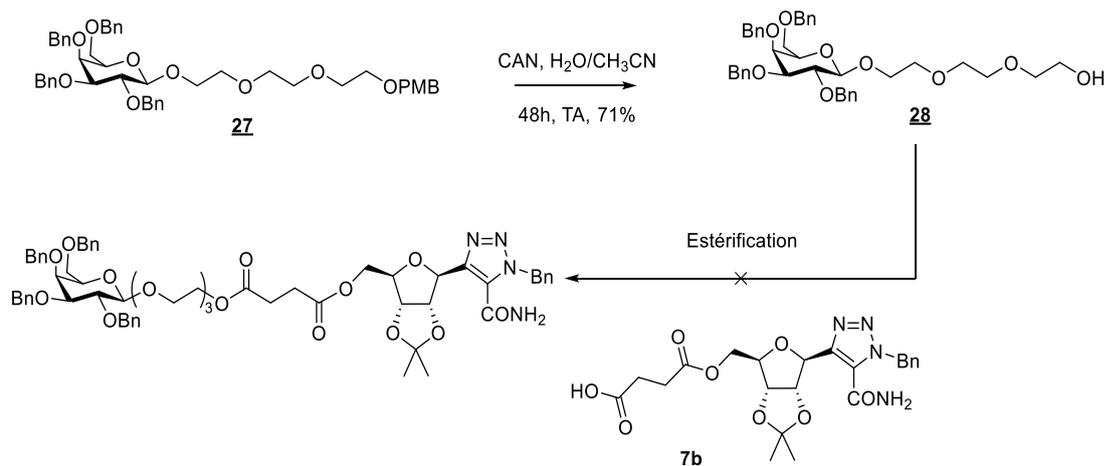


Schéma 49 : Première voie de synthèse du conjugué Gal-TEG-SRO protégé

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

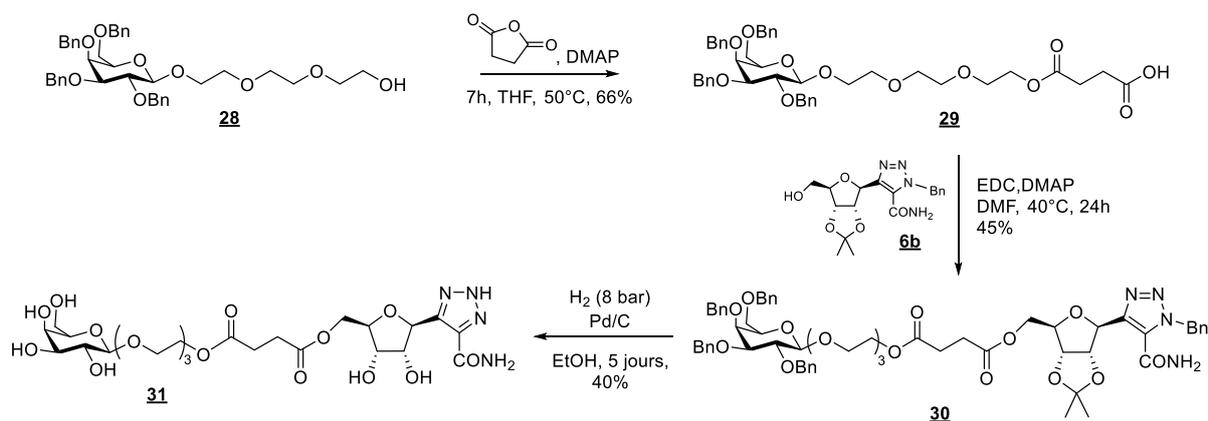


Schéma 50 : Deuxième voie de synthèse du conjugué Gal-TEG-SRO protégé

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

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

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



## **Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire**



### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Le deuxième axe développé dans ce projet porte sur l'amélioration de la pénétration cellulaire du nucléoside SRO91. De nombreux composés, notamment des peptides tels que les *cell-penetrating peptides* (CPPs), les peptides antimicrobiens (AMPs) et les peptides pH-sensibles peuvent ainsi permettre à des molécules thérapeutiques de traverser la membrane plasmique ou la membrane endosomale. Les peptides de fusion sont un autre type de peptides membranotropes pouvant être utilisés comme agents de pénétration cellulaire. En effet, ces séquences très hydrophobes présentes dans les protéines de fusion virales sont capables de s'insérer dans la membrane plasmique afin d'initier le processus de fusion en complément d'interaction avec des récepteurs de la cellule hôte. Afin de conférer une meilleure pénétration cellulaire au nucléoside SRO91, trois peptides de fusion ont été sélectionnés en se basant sur la littérature. Ces séquences ont ensuite été synthétisées puis fonctionnalisées par différents motifs tels qu'un fluorophore ou la molécule antivirale, SRO91.

#### 1. La membrane biologique

##### 1.1. Composition générale

La membrane biologique est une barrière protectrice entre le milieu extracellulaire et intracellulaire contenant les différents organites. Cette séparation est non-seulement nécessaire pour protéger les éléments constitutifs de la cellule mais également pour assurer son bon fonctionnement (reconnaissance, adhésion, signalisation, *etc.*).<sup>139</sup>

La membrane biologique est constituée de différents éléments tels que des lipides de différentes sortes (phospholipides, sphingolipides, stérols et glycolipides) et des protéines remplissant de nombreuses fonctions (Figure 61). Les glycosides sont également présents dans la membrane biologique mais toujours sous la forme de conjugués avec des protéines (glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides).

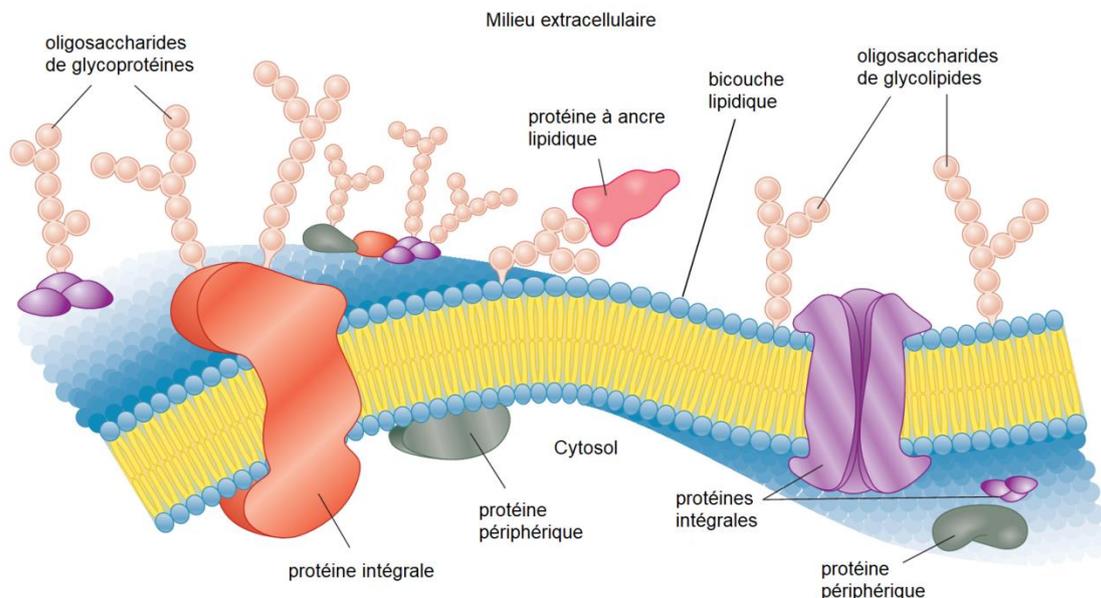


Figure 61 : Structure d'une membrane plasmique d'eucaryote<sup>139</sup>

<sup>139</sup> Moran, L. A.; Horton, H. R.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D. In *Principles of Biochemistry*; Jaworski, A., Ed.; Pearson, 2011; pp 256–293.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Si tous les éléments constitutifs de la membrane remplissent un rôle indispensable pour assurer ses propriétés et sa stabilité, les glycérophospholipides sont responsables de sa construction. En effet, ces composés sont constitués d'un motif glycérol phosphorylé (« tête hydrophile ») et acylé par deux acides gras (« queue hydrophobe »), leur conférant un caractère amphiphile (Figure 62).

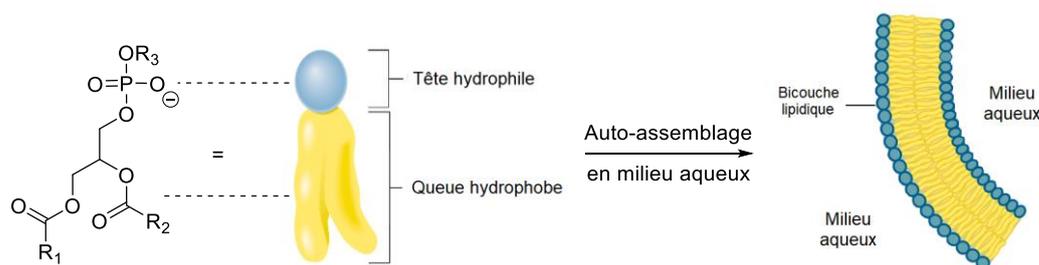


Figure 62 : Structure des glycérophospholipides et auto-assemblage<sup>139</sup>

En milieu aqueux, les glycérophospholipides sont capables de s'auto-assembler de manière à exposer leur tête hydrophile vers les molécules d'eau et d'en éloigner le plus possible leur queue hydrophobe. Ce processus, impliquant des interactions hydrophobes, permet ainsi de mettre en interaction les chaînes grasses des phospholipides de manière à créer une bicouche lipidique d'environ 5 à 6 nm d'épaisseur (Figure 62). Afin de minimiser le contact des queues hydrophobes avec des molécules d'eau, la bicouche s'oriente alors de manière à former une vésicule sphérique. Il existe de nombreux glycérophospholipides constitutifs des membranes biologiques qui diffèrent par la nature de leur tête hydrophile et de leur queue hydrophobe. En effet, le phosphate peut être fonctionnalisé par divers motifs comme la choline chargée positivement au pH physiologique donnant une tête hydrophile zwitterionique : la phosphatidylcholine (PC). La phosphatidyléthanolamine (PE) est un autre motif conférant un caractère zwitterionique aux glycérophospholipides du fait de la charge positive portée par l'amine et la charge négative du phosphate (Figure 63).

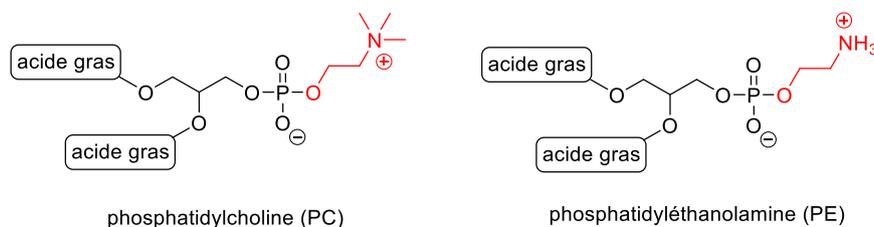


Figure 63 : Structure des glycérophospholipides zwitterioniques constitutifs de la membrane biologique

La tête hydrophile peut également être anionique comme le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS) le phosphatidylinositol (PI) et où la seule charge présente est la charge négative du phosphate (Figure 64).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

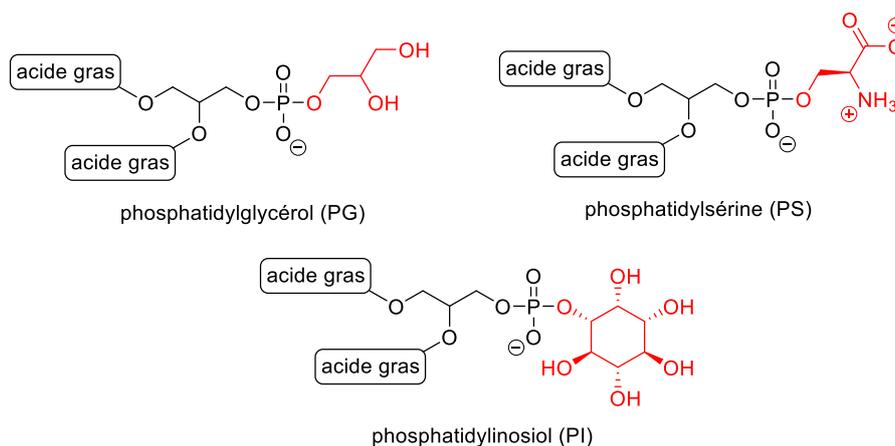


Figure 64 : Structure des glycérophospholipides anioniques constitutifs de la membrane biologique

Les différents acides gras liés au glycérol par un lien ester pour former les glycérophospholipides apportent énormément de diversité à la membrane. Par exemple, la membrane des érythrocytes contient au moins 21 espèces différentes de PC, constituées de divers acides gras estérifiés en position C<sub>1</sub> (R<sub>1</sub>) ou C<sub>2</sub> (R<sub>2</sub>) du glycérol. Ces chaînes très hydrophobes diffèrent par leur nombre d'atomes de carbone mais également par la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons C=C de configuration Z (Figure 65). Du fait des interactions hydrophobes entre les chaînes grasses des phospholipides, ces différences confèrent des propriétés particulières à la membrane. La dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) présente ainsi des interactions de Van der Waals relativement fortes entre les chaînes palmitoyles de deux lipides consécutifs. Cette propriété permet à une membrane constituée de DPPC d'adopter un comportement de type « gel » à température ambiante, à savoir une faible fluidité et peu de mouvement dans la membrane.<sup>140</sup> En revanche, la palmitoyloléoylphosphatidylcholine (POPC) présente une interaction bien moins importante entre une chaîne palmitoyle et une chaîne oléoyle, ce qui entraîne un comportement plus fluide à température ambiante.<sup>140</sup> De même, la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons C=C de configuration Z influe fortement sur la conformation adoptée par le lipide dans la membrane, ce qui modifiera l'empilement des lipides et donc les propriétés de la bicouche lipidique.

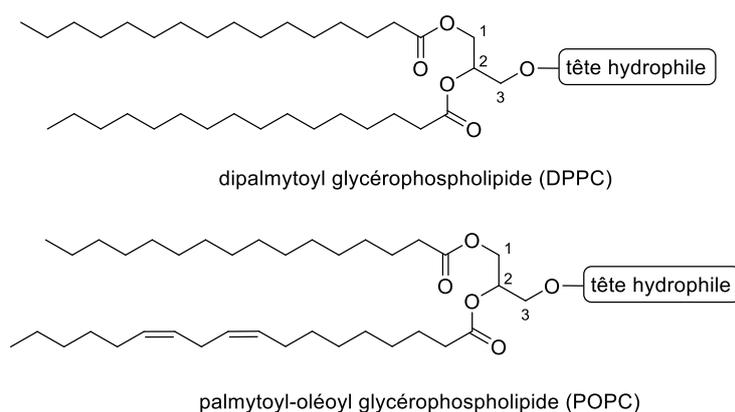


Figure 65 : Différentes structures de chaînes grasses constituant les glycérophospholipides

D'autres lipides composent la membrane et lui confèrent différentes propriétés (Figure 66). Par exemple, le cholestérol affaiblit les interactions de Van der Waals entre les chaînes grasses, empêchant ainsi le phénomène de ségrégation des lipides dans la membrane.<sup>140</sup> Il est ainsi un constituant majeur

<sup>140</sup> Goodman, S. R. In *Medical Cell Biology*; Goodman, S. R., Ed.; Elsevier, 2007; pp 27–57.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

de la membrane biologique qui permet de maintenir une certaine fluidité bien qu'il ne participe pas à l'auto-assemblage.

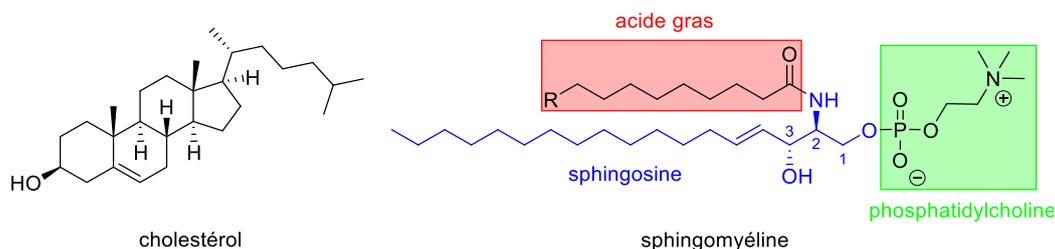


Figure 66 : Structures des autres lipides constitutifs de la membrane biologique

Les sphingomyélines (SM) sont d'autres constituants majeurs de la membrane biologique. Contrairement aux glycérophospholipides, les sphingomyélines ne sont pas formées à partir d'un motif glycérol mais d'une sphingosine, qui est acylée par un acide gras sur la fonction amine et phosphorylée sur la fonction alcool en position 1 (Figure 66). Les sphingomyélines et le cholestérol sont impliqués dans la formation de « radeaux lipidiques » dans la membrane cellulaire. Ces micro-domaines sont enrichis en protéines membranaires et présentent une rigidité plus importante que le reste de la membrane. La diminution du taux de cholestérol et de sphingomyéline entraîne la « destruction » de ces domaines et une diminution des fonctions normales de la membrane.<sup>140</sup>

Enfin, les protéines constituent une part importante de la membrane biologique (entre 50 et 70 % en masse). Ces protéines membranaires, qui représentent environ 25 % des protéines cellulaires chez *E.coli*, sont classées en trois catégories et remplissent divers rôles dans le fonctionnement de la cellule (Figure 61).<sup>139</sup> On distingue ainsi les protéines intégrales ou protéines transmembranaires qui contiennent une ou plusieurs régions très hydrophobes s'insérant dans la bicouche lipidique, adoptant souvent une conformation en hélice  $\alpha$ . Ces protéines traversent la membrane biologique de manière à exposer une de ses extrémités sur la surface externe et l'autre sur la surface interne. Les protéines permettant la pénétration cellulaire, comme les transporteurs membranaires et canaux ioniques, sont des exemples de telles protéines. De même, certains récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs), et les protéines d'adhésion cellulaire comme les intégrines ou les cadhérines, sont également classés dans la catégorie des protéines intégrales.

Les protéines périphériques sont une deuxième catégorie de protéines membranaires. Elles sont associées à une seule face de la membrane à travers des interactions électrostatiques ou liaisons hydrogène avec des protéines intégrales ou les têtes hydrophiles de lipides. Elles ont généralement pour fonction le soutien cellulaire ou la transmission de messages chimiques comme la protéine G.

Enfin, les protéines à ancrage lipidique sont attachées à la membrane grâce à une liaison covalente formée avec un lipide. Cette ancre lipidique peut être un acide gras, une chaîne isoprénique ou un glycosylphosphatidylinositol. Ces protéines sont particulièrement présentes dans les « radeaux lipidiques » formés par le cholestérol et les sphingolipides dans la membrane.

### 1.2. Les différentes membranes biologiques

Si les différentes membranes biologiques sont constituées des mêmes éléments de base, à savoir des lipides et des protéines, elles diffèrent selon leur composition et présentent plusieurs spécificités. Ainsi, les membranes biologiques bactériennes sont globalement plus riches en phospholipides

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

anioniques notamment les PS et PI que les membranes d'eucaryotes, et contiennent beaucoup moins de stérols (environ deux fois moins).<sup>141</sup>

Au sein d'une même espèce, on distingue également plusieurs compositions membranaires entre les différents tissus ou cellules. Les membranes cellulaires présentes dans le cerveau sont ainsi particulièrement riches en PS alors que les cellules du cœur ou des poumons possèdent des niveaux importants de PG et de SM.<sup>139</sup>

De même, les différentes membranes constitutives de la cellule présentent, elles-aussi, des caractéristiques particulières (Figure 67). Chez les mammifères, la membrane plasmique est particulièrement riche en cholestérol avec presque autant de cholestérol que de phospholipides. Cette membrane séparant le milieu intracellulaire de l'extracellulaire présente également un taux de SM plus important (environ 30 %) que le reste des éléments constitutifs de la cellule (réticulum endoplasmique, mitochondrie, Golgi ou encore les endosomes).<sup>141</sup>

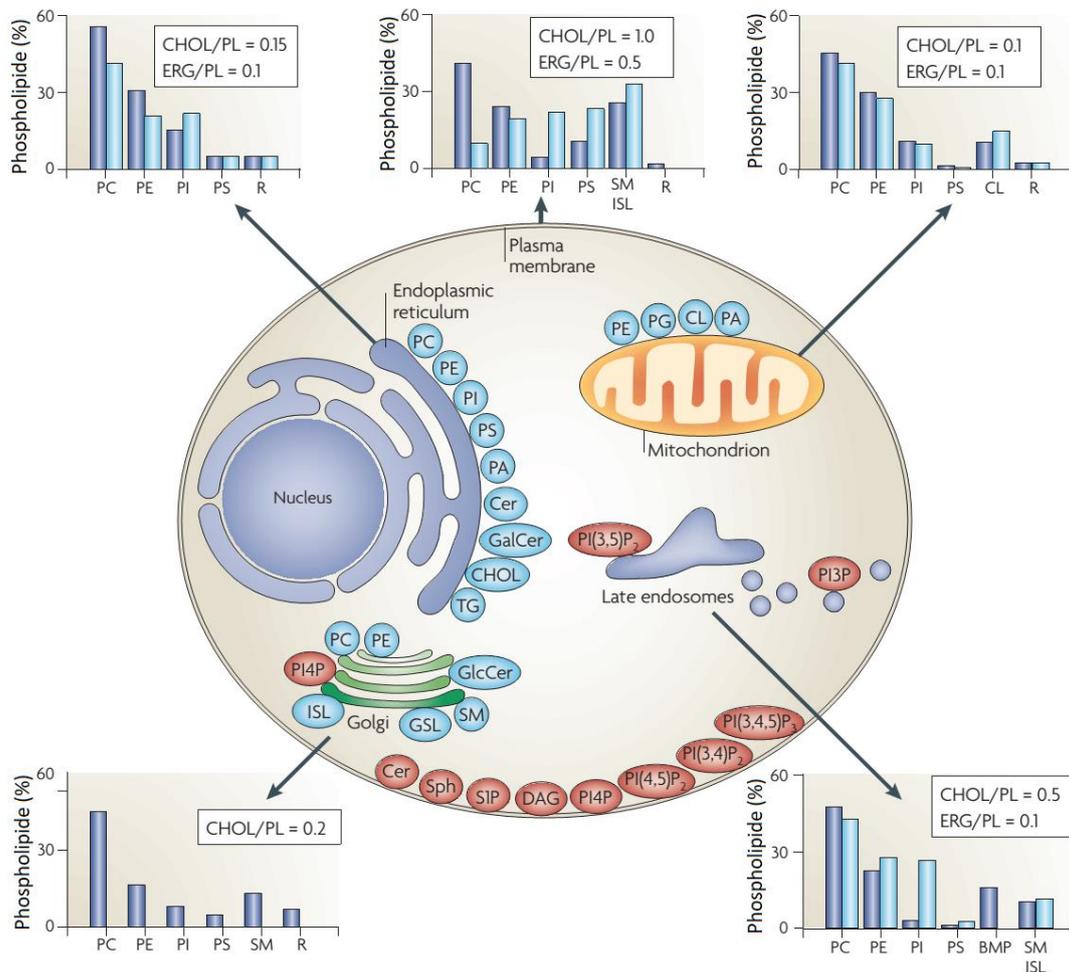


Figure 67 : Compositions lipidiques des différentes membranes cellulaires<sup>141</sup>

La composition lipidique des différentes membranes est exprimé en pourcentage des phospholipides (PL) pour les mammifères (bleu) et les levures (bleu clair). Le niveau de stérols est exprimé par le ratio de cholestérol (CHOL) pour les mammifères et d'ergostérol (ERG) pour les levures.

PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidyléthanolamine ; PI = phosphatidylinositol ; PS = phosphatidylsérine ; PA = acide phosphatidique ; SM = sphingomyéline ; CL = cardioline ; BMP = bis(monoacylglycéro)phosphate ; PG = phosphatidylinositol

<sup>141</sup> van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (2), 112–124.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Les cardiolipines (CL) sont des bisphospholipides uniquement présents dans la membrane interne des mitochondries et qui en constituent environ 20 % (Figure 68). Les CL sont supposées fonctionner comme des « pièges à protons » nécessaires à l'activité énergétique de la mitochondrie.

De même, si la composition des endosomes précoces est très similaire à celle de la membrane plasmique, leur maturation en endosomes tardifs entraîne une diminution du taux de stérols et de PS et une augmentation drastique de bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP, Figure 68).<sup>142</sup> Le BMP participe au mécanisme de formation de vésicules, au processus de fusion et à l'hydrolyse des sphingolipides.<sup>143</sup>

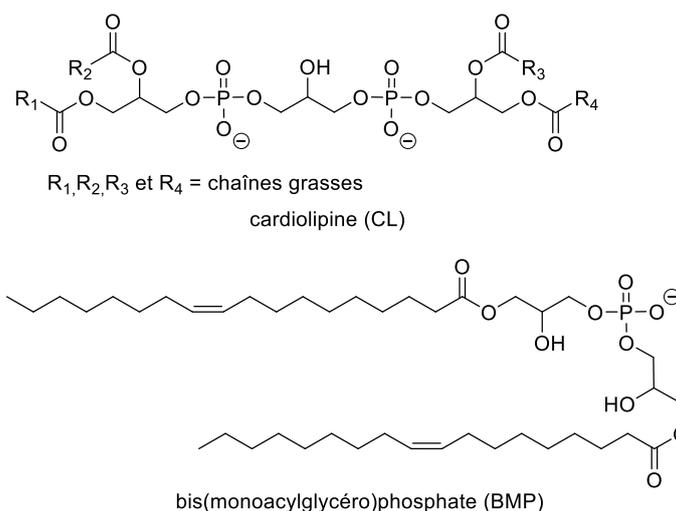


Figure 68 : Structure des cardiolipines (CL) et du bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP)

Enfin, les compositions lipidiques des deux feuillet de la membrane sont diverses. En effet, outre les glycoprotéines et glycolipides uniquement présents sur le feuillet externe, la répartition des phospholipides au sein d'une même membrane est différente. Les sphingolipides comme les sphingomyélines sont ainsi plus présents (jusqu'à 90 %) dans le feuillet externe de la membrane alors que les phospholipides anioniques se trouvent principalement (PG) voire exclusivement (PS) dans la membrane intracellulaire de nombreuses cellules.

### 1.3. La pénétration membranaire

La membrane biologique, et particulièrement la membrane plasmique, est ainsi une séparation de nature hydrophobe entre deux compartiments aqueux. Cette barrière permet ainsi de protéger les constituants cellulaires, mais elle est également capable de transmettre certains composés nécessaires à l'activité cellulaire, par différents transports.

De petites molécules neutres comme le dioxyde de carbone, le dioxygène, l'éthanol ou le glycérol, sont ainsi capables de traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Ce phénomène vient du fait qu'un composé en solution a tendance à se déplacer des zones de plus fortes concentrations vers les zones de plus faibles concentrations. La diffusion d'un tel composé est dépendante de la taille de la vésicule formée par la membrane, mais également de son coefficient de partage entre le milieu aqueux et l'environnement hydrophobe constitué par la bicouche lipidique.<sup>140</sup>

<sup>142</sup> Kobayashi, T.; Beuchat, M.-H.; Chevallier, J.; Makino, A.; Mayran, N.; Escola, J.-M.; Lebrand, C.; Cosson, P.; Kobayashi, T.; Gruenberg, J. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (35), 32157–32164.

<sup>143</sup> Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N. S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; Parton, R. G.; Vilbois, F.; Gruenberg, J. *Science* **2004**, 303 (5657), 531–534.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Néanmoins, certaines molécules, du fait de leur hydrophilie ou de leur taille, ne possèdent pas un coefficient de partage suffisant pour permettre une pénétration cellulaire efficace par simple diffusion. Ces molécules pénètrent alors grâce à un processus nommé diffusion facilitée, par l'action de protéines membranaires appelées transporteurs ou perméase. Le glucose, par exemple, est un composé essentiel pour le développement cellulaire. Cette molécule étant trop hydrophile et de taille trop importante pour pénétrer dans les cellules, son transport est réalisé par un transporteur du glucose. L'association du glucose avec la partie extracellulaire de cette protéine membranaire entraîne un changement conformationnel permettant la pénétration de la molécule. Une fois le passage effectué, le transporteur retrouve sa conformation initiale (Figure 69).<sup>139</sup>

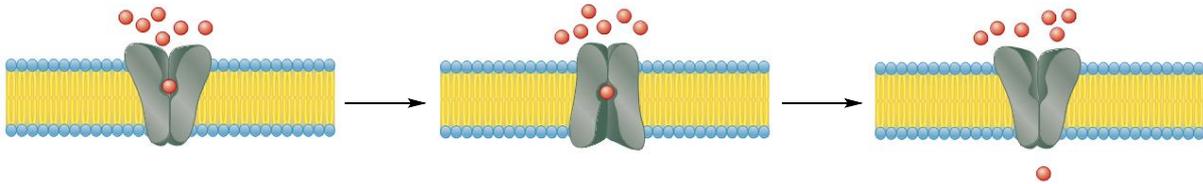


Figure 69 : Mécanisme de pénétration cellulaire par les transporteurs<sup>139</sup>

Le transport membranaire par simple diffusion ou par l'action des transporteurs est classé dans la catégorie des transports passifs, c'est-à-dire qui peuvent se réaliser sans apport énergétique particulier. Ils diffèrent ainsi des transports dits actifs, qui eux consomment de l'énergie, généralement par l'action d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP), de la lumière ou par un gradient en concentration ionique. Ce transport est également basé sur l'utilisation de protéines membranaires et est divisé en trois types de transport actif, qui diffèrent par le nombre et le sens du transport des molécules (Figure 70). On distingue ainsi le transport actif de type uniport qui correspond au passage d'une seule molécule à travers la membrane. Le transport de type symport implique le passage de deux molécules dans le même sens de diffusion, alors que le transport de type antiport correspond à un transport de deux molécules dans des sens opposés.

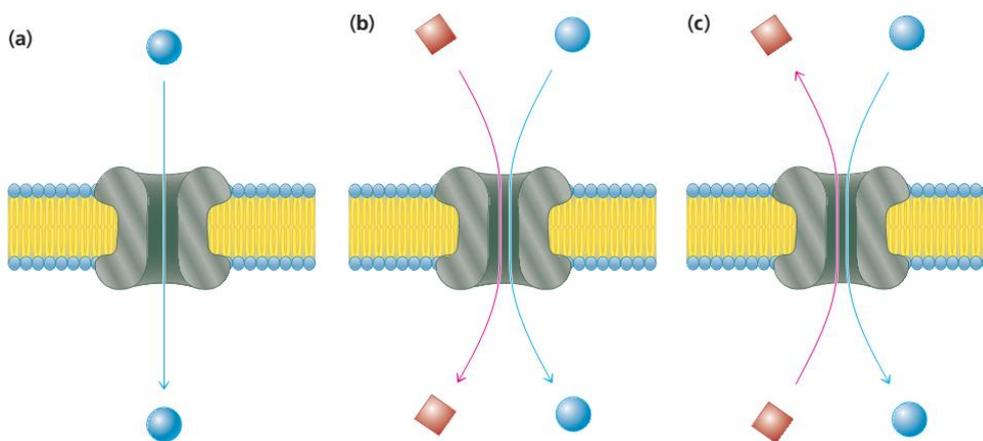


Figure 70 : Différents types de transports actifs :<sup>139</sup> uniport (a), symport (b) et antiport (c)

Les membres les plus importants de la famille des transports actifs sont certainement les ATPases. Ces protéines membranaires permettent, grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (transport actif primaire), de transporter des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane. Les gradients en concentration de ces ions, notamment les ions  $\text{Na}^+$ , permettent ensuite à d'autres molécules de pénétrer dans la cellule par l'action des transports actifs secondaires.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La Na/K-ATPase est ainsi capable de faire traverser les ions  $\text{Na}^+$  dans le sens inverse de son gradient de concentration grâce à un antiport avec l'ion  $\text{K}^+$  et l'hydrolyse de l'ATP en ADP (Figure 71). La partie extracellulaire de la Na/K-ATPase possède des sites d'interaction pour deux ions  $\text{K}^+$  et sa partie intracellulaire des sites d'interaction pour trois ions  $\text{Na}^+$ . La phosphorylation de la région intracellulaire par l'ATP va entraîner un changement conformationnel de la protéine, la transformant d'une forme capable de transporter les ions  $\text{K}^+$  en une forme capable de transporter les ions  $\text{Na}^+$ . L'interaction d'ions  $\text{K}^+$  avec la partie extracellulaire permet ensuite l'hydrolyse du phosphate et le retour de la protéine dans sa conformation d'origine, transportant préférentiellement les ions  $\text{K}^+$ .<sup>140</sup>

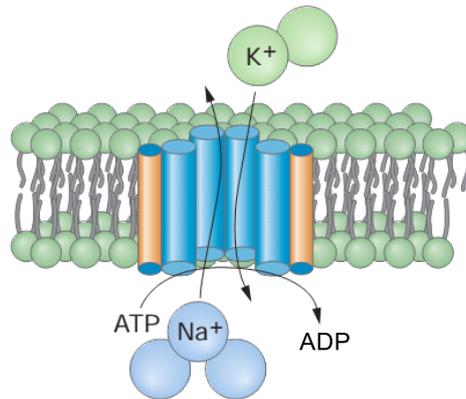


Figure 71 : Fonctionnement de la Na/K-ATPase<sup>140</sup>

La Na/K-ATPase est également la source d'énergie principale permettant le transport actif secondaire. Ainsi, dans les cellules intestinales, le transport des ions  $\text{Na}^+$  dans le sens inverse de leur gradient de concentration permet de fournir l'énergie nécessaire au transport du glucose afin de rétablir le niveau d'ions  $\text{Na}^+$  dans le milieu intracellulaire à l'aide d'un symport.<sup>139</sup>

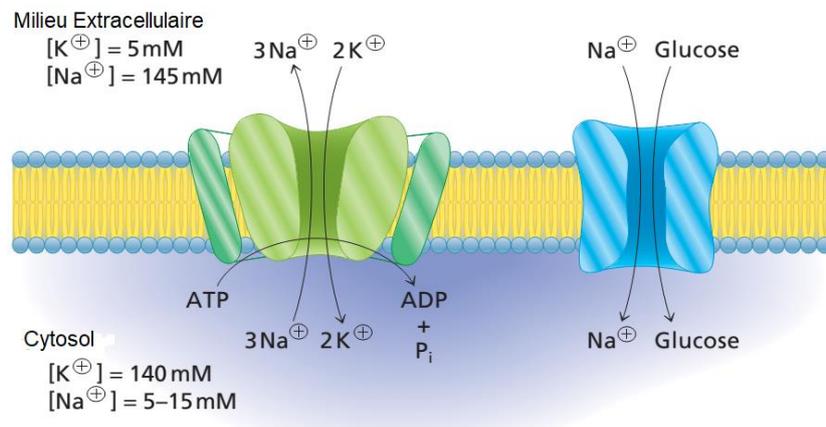


Figure 72 : Fonctionnement du transport actif du glucose dans les cellules intestinales<sup>139</sup>

Les canaux ioniques ou récepteurs ionotropes sont également des protéines membranaires capables de transporter efficacement des ions à travers la membrane plasmique. Ces transporteurs forment des canaux ou pores à travers la membrane dont l'environnement aqueux permet le passage de composés selon un gradient de concentration et le potentiel électrique de la membrane dans le cas des ions. Ces protéines possèdent généralement plusieurs domaines transmembranaires qui s'organisent de manière à exposer les résidus hydrophiles vers le canal aqueux et les résidus hydrophobes vers la bicouche lipidique. Les canaux ioniques existent sous au moins deux conformations : une forme « ouverte » stable mais éphémère et une forme « fermée » très stable.<sup>140</sup> Différents stimuli contrôlent l'ouverture et

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

la fermeture des canaux comme des signaux électriques, des déformations cellulaires ou encore des interactions avec des ligands.

Ainsi, le récepteur à l'acétylcholine est un récepteur ionotrope permettant le transport de petits cations uniquement ( $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ ). L'association de deux acétylcholines avec la partie extracellulaire de la protéine induit un changement de conformation qui « ouvre » brièvement (environ 1 ms) le canal ionique et permet le passage des cations selon leur gradient de concentration et le potentiel électrique. Une fois le canal refermé, l'acétylcholine se dissocie de la protéine qui retourne dans sa conformation « fermée » d'origine (Figure 73).<sup>140</sup>

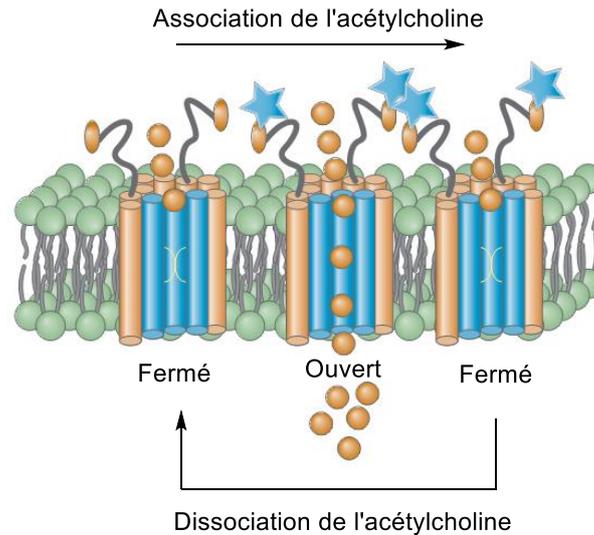


Figure 73 : Fonctionnement du récepteur ionotrope de l'acétylcholine<sup>140</sup>

Enfin, l'endocytose est une des voies privilégiées pour la pénétration cellulaire ou la dégradation de nombreux composés impliqués dans des processus physiologiques. Il existe plusieurs types d'endocytose, certains étant spécifiques à un type de cellules ou à un tissu, mais tous correspondent à la formation de vésicules intracellulaires à partir de la membrane plasmique et permettent l'internalisation de molécules présentes dans le milieu extracellulaire. On distingue ainsi la phagocytose qui correspond à la formation actine-dépendante de vésicules larges ( $> 1 \mu m$ ) par les macrophages et les neutrophiles et qui est principalement utilisée pour éliminer des particules de taille importante comme des bactéries. Les autres types d'endocytose sont divisés en deux grandes catégories suivant l'implication ou non de la clathrine, une protéine d'enveloppe : les endocytoses clathrine-dépendantes et les endocytoses clathrine-indépendantes. La macropinocytose est une endocytose clathrine-indépendante durant laquelle la membrane plasmique s'étend jusqu'à fusionner de manière à englober un volume de liquide extracellulaire dans une vésicule. Ce type d'endocytose n'est pas spécifique de certains composés (saccharides, peptides, etc) mais plutôt d'un milieu. Certaines endocytoses clathrine-indépendantes ont également lieu autour des « radeaux lipidiques » formés dans les sites de la membrane riches en cholestérol et en sphingomyéline.

L'endocytose est un évènement très fréquent dans la membrane cellulaire puisque chez les mammifères, environ la moitié de la membrane plasmique est internalisée chaque heure, grâce à la formation de vésicules clathrine-dépendante dans la plupart des cas. Lors de la formation de ces vésicules, les composés extracellulaires sont internalisés sous deux formes : en tant que composé soluble (pinocytose) ou lié à un récepteur présent au site d'endocytose (endocytose à récepteur).<sup>140</sup> Les endocytoses à récepteurs sont beaucoup plus efficaces puisque les composés à internaliser sont « concentrés » autour de la membrane grâce à l'interaction avec les récepteurs.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

L'internalisation d'un composé par endocytose à récepteur est un processus effectué en plusieurs étapes (Figure 74). Après interaction entre le composé extracellulaire, aussi appelé ligand, et un récepteur membranaire, une protéine appelée AP-2 (pour *adaptator protein 2*) va se fixer sur la partie intracellulaire du récepteur. Dans un deuxième temps, la protéine d'enveloppe clathrine va se lier à la AP-2 préalablement installée sur le récepteur. Les récepteurs s'associent alors entre eux pour former des puits recouverts de clathrine, où la membrane plasmique va commencer à se déformer. Il est important de noter que tous les récepteurs ne se comportent pas de manière identique à cette étape. En effet, certains récepteurs sont constamment associés au niveau des puits recouverts de clathrine alors que d'autres ne vont s'agréger qu'une fois l'interaction ligand/récepteur effectuée. La déformation de la membrane plasmique va alors entraîner la formation d'une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine, présentant la partie « extracellulaire » du récepteur associée au ligand dans le milieu intravésiculaire. La clathrine et AP-2 se dissocient alors des récepteurs pour donner des vésicules non-enveloppées qui vont fusionner soit entre elles pour donner un endosome précoce, soit directement avec un endosome précoce déjà formé. Le milieu intravésiculaire des endosomes précoces est légèrement acide du fait de la présence des ATPases permettant le transport de protons du cytosol vers l'endosome. Cette acidité permet généralement de dissocier le complexe ligand/récepteur libérant le composé dans l'endosome alors que le récepteur reste logé dans la membrane. Cette étape est primordiale puisque de nombreux récepteurs membranaires entraînant une endocytose sont ainsi recyclés vers la membrane plasmique, où ils pourront, à nouveau, initier une internalisation.

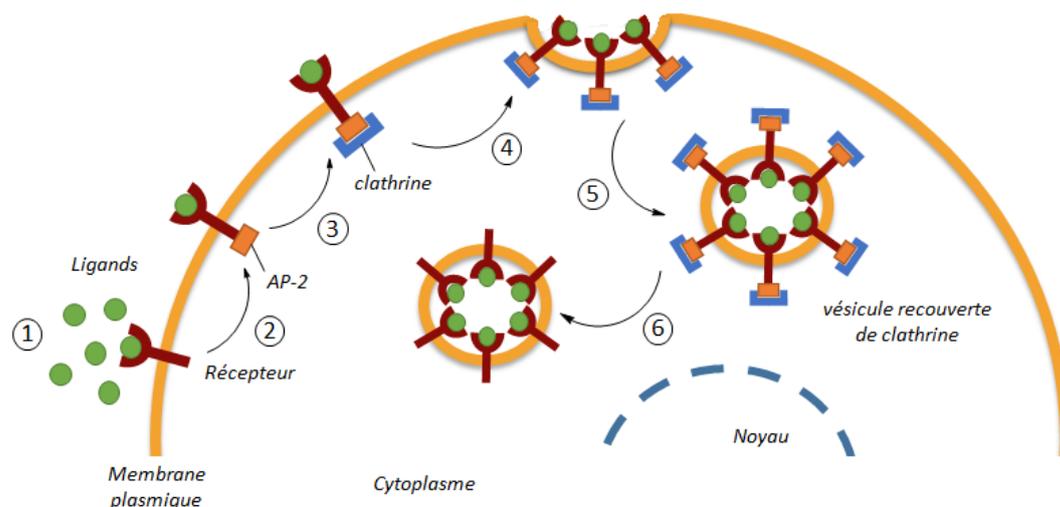


Figure 74 : Processus d'internalisation d'un composé par endocytose à récepteur

(1) Interaction ligand/récepteur ; (2) Association de la protéine AP-2 au récepteur ; (3) Association de la clathrine à la AP-2 ; (4) Formation de puits recouverts de clathrine ; (5) Invagination de la membrane et formation de vésicules recouvertes de clathrine ; (6) Dissociation de la clathrine et AP-2 suivie de la fusion des vésicules entre elles ou avec un endosome précoce

### 2. Les peptides membranotropes

L'une des plus grandes limitations de la chimie thérapeutique est la faible capacité de certains composés (petites molécules hydrophiles, peptides, protéines, oligonucléotides, *etc.*) à traverser la membrane plasmique afin d'atteindre leur cible. Différentes stratégies ont été mises en place afin d'améliorer la délivrance intracellulaire de ces composés. Il est ainsi possible d'utiliser des prodrogues en conjuguant la molécule d'intérêt avec des motifs reconnus par les transporteurs. Certaines prodrogues glucosylées profitent ainsi du transporteur Glut-1 pour traverser la membrane

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

plasmique.<sup>144,145</sup> Une autre stratégie consiste à utiliser la pénétration cellulaire par endocytose de type phagocytose, pinocytose ou à récepteur. L'inconvénient de cette stratégie est que le composé d'intérêt risque d'être « bloqué » dans les endosomes et donc de ne pas atteindre sa cible qui est généralement intracellulaire, voire intranucléaire. C'est pourquoi certains composés ont été développés afin d'assurer la déstabilisation de la membrane due à leur protonation au pH acide de l'endosome, entraînant alors la libération du composé thérapeutique de l'endosome. Ainsi, la chloroquine est une molécule qui a beaucoup été utilisée dans des stratégies de vectorisation (Figure 75).<sup>146</sup> Ce composé d'abord développé comme agent antipaludique, est capable de se protoner dans le milieu acide de l'endosome. Ceci prévient la dégradation enzymatique du principe actif mais déstabilise également la membrane endosomale et entraîne sa libération dans le cytosol.

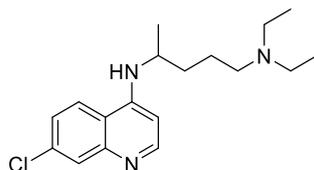


Figure 75 : Structure de la chloroquine

Depuis une trentaine d'années, de nombreux peptides sont développés pour leur activité membranaire. Ces séquences sont capables d'interagir avec certains constituants de la membrane plasmique et de permettre la pénétration cellulaire. Bien que ces séquences soient nombreuses, leur mécanisme est encore discuté aujourd'hui et plusieurs comportements peuvent être observés : pénétration par endocytose, formation de pores, translocation directe, etc (Figure 76). Certaines séquences possèdent des résidus sensibles au pH acide de l'endosome et ne deviennent membranotropes que dans ces conditions. Cette propriété en fait d'excellents candidats pour favoriser le relargage de composés des endosomes vers le cytosol.

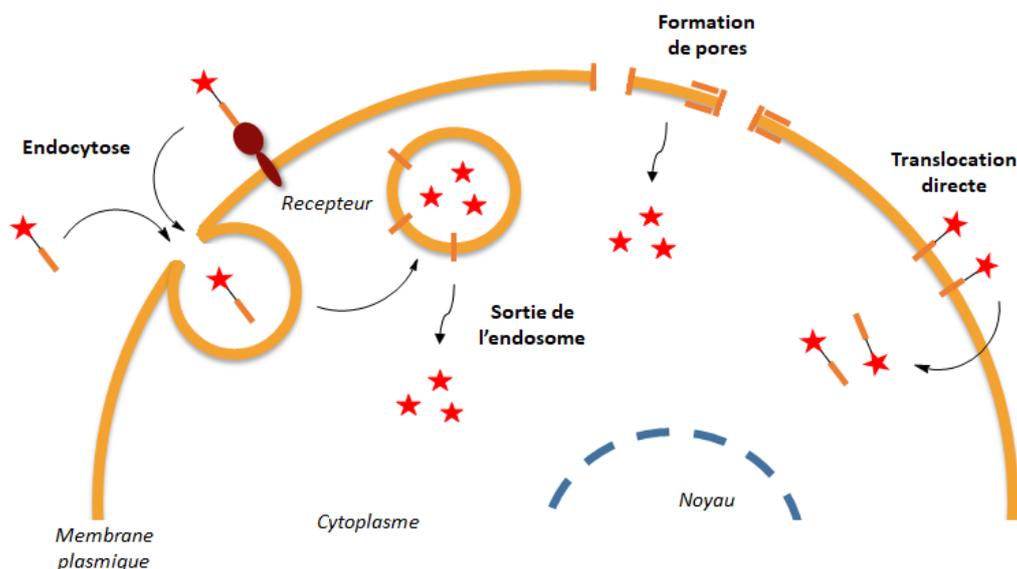


Figure 76 : Mécanismes de pénétration cellulaire des peptides membranotropes

<sup>144</sup> Scherrmann, J.-M.; Svensson, C. K.; Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92–102.

<sup>145</sup> Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (5), 767–771.

<sup>146</sup> Tietz, P. S.; Yamazaki, K.; LaRusso, N. F. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40* (6), 1419–1421.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

### 2.1. Peptides de pénétration cellulaire (CPPs)

Les peptides de pénétration cellulaire (CPPs pour *cell-penetrating peptides*) sont de courtes séquences (environ 15-30 résidus) de nature cationique ou amphipathique (Tableau 5).<sup>147,148</sup> Ces peptides sont aussi appelés PTDs pour *protein-transduction domains* du fait de leur découverte découlant de l'observation que certaines protéines, principalement des facteurs de transcription (des protéines capables d'initier ou de réguler la transcription d'un gène), étaient capables de traverser les membranes cellulaires. Les CPPs ou PTDs sont depuis très étudiés et utilisés pour délivrer des composés thérapeutiques qui ne sont normalement pas capables de traverser efficacement la membrane plasmique comme des nucléosides, des peptides, des protéines ou encore des oligonucléotides.<sup>149</sup>

Peptides	Origine	Séquence
Peptides dérivés de PTDs		
Tat(47-57)	Protéine VIH-Tat	YGRKKRRQRRPPQ
Pénétratine	Homéodomaine Antennapedia	RQIKIWFQNRRMKWKK
Transportane	Galanine-mastoparane	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKI
VP-22	Protéine structurale HSV-1	DAATATRGRSAASRPTEPRAPAR-SASRPRRPVD
Peptides amphipathiques		
MPG	VIH gp41-SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
Pep-1	Motif riche en Trp-SV40 NLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
MAP	Synthétique	KALAKALAKALA
SAP	Motif riche en Pro	VRLPPPVRLLPPPVRLLPP
PPTG1	Chimérique	GLFRALLRLLRSLWRLLLR
RL <sub>9</sub>	Synthétique	RRWWRRWRR
RW <sub>9</sub>	Synthétique	RLLRRLRR
Peptides cationiques		
Oligoarginine	Synthétique	R <sub>8</sub> ou R <sub>9</sub>
hCT (9-32)	Calcitonine humaine	LGTYTQDFNKTFFPQTAIGVGA
SynB	Protéoglycane	RGGRLSYSRRRFSTSTG
pVEC	VE murine-cadhérine	LLIILRRRIRKQAHASK
CADY	Synthétique	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA

Tableau 5 : Exemples des principaux CPPs<sup>149</sup>

La première observation de pénétration cellulaire des PTDs a été réalisée par Frankel et Pabo en 1988 qui ont montré que la protéine Tat (pour *trans-activator of transcription*) du virus VIH-1 était capable

<sup>147</sup> Komin, A.; Russell, L. M.; Hristova, K. A.; Searson, P. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 52–64.

<sup>148</sup> Bechara, C.; Sagan, S. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702.

<sup>149</sup> Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195–206.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

de traverser la membrane cellulaire et de pénétrer dans le noyau.<sup>150</sup> En 1998, l'équipe de Lebleu a identifié la séquence peptidique minimale de Tat nécessaire à la pénétration cellulaire, correspondant aux résidus 47 à 57 (YGRKKRRQRRR).<sup>151</sup> De nombreuses études ont ensuite montré le potentiel de la séquence VIH-Tat(47-57) comme agent de pénétration cellulaire en réalisant des conjugués avec des molécules d'intérêt thérapeutique comme des protéines, peptides et siRNA.<sup>152,153</sup>

En 1991, l'équipe de Prochiantz a montré que l'homéodomaine du *Drosophila Antennapedia* était internalisé par les cellules neuronales.<sup>154</sup> Cette découverte a ensuite permis d'identifier le premier CPP en 1994 : un 16-mer dérivé de l'hélice tertiaire de l'homéodomaine appelé pénétratine (RQIKIYFQNRMKWKK).<sup>155</sup> Tout comme le Tat, la pénétratine a été appliquée à divers cargo (peptides, siRNA, liposomes) pour ses propriétés de pénétration cellulaire.<sup>156</sup>

Un autre CPP issu d'un PTD est le transportane (GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKI). Ce peptide dérivé du fragment *N*-terminal du neuropeptide galanine, a permis, en association avec le peptide mastoparane du venin de guêpe, de réaliser les premières avancées dans l'utilisation de CPPs pour la délivrance *in vivo* de peptides, protéines<sup>152</sup> et d'acides nucléiques peptidiques (PNA pour *peptide-nucleic acids*).<sup>157</sup>

En plus des CPPs dérivés de séquences naturelles de PTDs, certaines séquences synthétiques montrant un caractère amphipathique se sont révélées capables de traverser la membrane plasmique. Ces peptides synthétiques ou chimériques comportent une région très hydrophobe et une partie cationique, généralement composée de résidus arginine ou lysine. Les peptides MPG<sup>158</sup> et Pep-1<sup>159</sup> ont ainsi été utilisés par Heitz et Divita pour réaliser les premiers conjugués non covalents pour la délivrance de peptides et de protéines. MPG et Pep-1 sont des peptides amphipathiques constitués de séquences conjuguées. La première est un motif riche en résidus lysine dérivés du signal de localisation nucléaire (*NLS pour nuclear localization sequence*) de l'antigène T de la protéine SV40 (KKKRKV). La seconde correspond à la partie hydrophobe *N*-terminale (peptide de fusion) de la protéine gp41 du VIH (GALFLGFLGAAGSTMGA) pour MPG, et à une séquence riche en résidus tryptophane (KETWWETWTEW) pour Pep-1.

Considérant la présence de résidus cationiques dans les CPPs découverts grâce aux PTDs, un certain nombre de séquences polycationiques ont été développées. Les oligoarginines, R<sub>8</sub> ou R<sub>9</sub>, ont ainsi été étudiées par Wender et Futaki.<sup>160,161</sup> Ces groupes ont mis en évidence la capacité de ces séquences à délivrer des composés dans le milieu intracellulaire et ont proposé l'hypothèse d'un mécanisme impliquant des liaisons hydrogène entre les groupements guanidinium des résidus arginine et les

<sup>150</sup> Frankel, A. D.; Pabo, C. O.; Paskalis, H.; Pavlakis, G. N.; Popovic, M.; Arya, S.; Gallo, R. C.; Haseltine, W. A.; Debouck, C.; Gallo, R. C.; Wong-Staal, F. *Cell* **1988**, 55 (6), 1189–1193.

<sup>151</sup> Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (25), 16010–16017.

<sup>152</sup> Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. *Science* **1999**, 285, 1569–1572.

<sup>153</sup> Snyder, E. L.; Dowdy, S. F. *Expert Opin. on Drug Delivery* **2005**, 2 (1), 43–51.

<sup>154</sup> Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 1864–1868.

<sup>155</sup> Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269 (14), 10444–10450.

<sup>156</sup> Joliot, A.; Prochiantz, A. *Nat. Cell Biol.* **2004**, 6 (3), 189–196.

<sup>157</sup> Pooga, M.; Soomets, U.; Hällbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J.-X.; Xu, X.-J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Langel, Ü. *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16 (9), 857–861.

<sup>158</sup> Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25 (14), 2730–2736.

<sup>159</sup> Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19 (12), 1173–1176.

<sup>160</sup> Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (24), 13003–13008.

<sup>161</sup> Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (8), 5836–5840.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

groupements phosphate des phospholipides constitutifs de la membrane. Sur le même principe, des séquences amphipathiques ont été étudiées, comportant des résidus leucine (RL<sub>9</sub>, RLLRRLRR) ou des résidus tryptophane (RW<sub>9</sub>, RRWRRWRR).<sup>162</sup> Si les peptides R<sub>9</sub> et RW<sub>9</sub> se sont montrés capables de pénétrer dans des cellules cancéreuses (CHO pour *Chinese Hamster Ovarian cells*) à 4°C et 37°C, RL<sub>9</sub> n'a pas été internalisé dans ces mêmes conditions.<sup>163</sup> Par ailleurs, une étude a montré l'importance des résidus tryptophane pour la pénétration cellulaire puisque leur remplacement par des résidus phénylalanine a diminué grandement leur internalisation.<sup>164</sup>

Encore aujourd'hui, le mécanisme de pénétration cellulaire des CPPs n'est pas complètement connu. Ce constat est principalement dû à l'existence de plusieurs observations contradictoires selon la nature du CPP (amphipathique, cationique), le potentiel cargo qu'il délivre, la composition de la membrane cellulaire ou du modèle utilisé, ainsi que la concentration en peptide. Bien qu'il reste difficile d'établir un mécanisme d'action global, il est généralement admis que ces séquences présentant une région chargée positivement, de par leur structure primaire ou leur structure secondaire, entrent initialement en contact avec les glycosaminoglycanes (GAGs) chargés négativement, principalement les sulfates d'héparane (HS) ce qui constitue une première approche entraînant l'accumulation de peptide au contact de la membrane cellulaire.<sup>165,166</sup> De nombreuses études font alors état d'une internalisation des CPPs cationiques par divers types d'endocytose : macropinocytose,<sup>167,168</sup> endocytoses clathrine- ou cavéoline-dépendantes.<sup>169,170</sup>

Les modes d'action des CPPs sont néanmoins multiples. En effet, leurs interactions avec les phospholipides de la membrane et leur tendance à adopter une structure secondaire au contact de celle-ci, leur permet d'en modifier l'intégrité. Ils sont ainsi capables de pénétrer directement dans le cytosol, non pas par endocytose mais par translocation directe, s'effectuant par déstabilisation de la membrane (pores transitoires) ou par formation de micelles inverses dans la bicouche lipidique.<sup>171</sup>

Ce comportement est fortement dépendant de la concentration en peptide aux abords de la membrane. En effet, il a été montré que, à forte concentration, la pénétératine était capable de traverser la membrane plasmique à la fois par endocytose et par translocation directe. En revanche, seule l'internalisation par translocation directe est observée à faible concentration.<sup>172</sup> Si l'internalisation à forte concentration semble liée à une endocytose suite à l'accumulation du peptide aux abords de la membrane cellulaire par interaction avec les GAGs, cette observation permet d'expliquer la pénétration cellulaire des CPPs même à faible concentration et à basse température.<sup>173</sup>

<sup>162</sup> Walrant, A.; Correia, I.; Jiao, C.; Lequin, O.; Bent, E. H.; Goasdoué, N.; Lacombe, C.; Chassaing, G.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808* (1), 382–393.

<sup>163</sup> Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (27), 4244–4247.

<sup>164</sup> Jobin, M. L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848* (2), 593–602.

<sup>165</sup> Ziegler, A.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2008**, *94* (6), 2142–2149.

<sup>166</sup> Ziegler, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2011**, *50* (21), 4650–4664.

<sup>167</sup> Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310–315.

<sup>168</sup> Kaplan, I. M.; Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. *J. Control. Release* **2005**, *102* (1), 247–253.

<sup>169</sup> Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (15), 15300–15306.

<sup>170</sup> Ziegler, A.; Nervi, P.; Dürrenberger, M.; Seelig, J. *Biochemistry* **2005**, *44* (1), 138–148.

<sup>171</sup> Di Pisa, M.; Chassaing, G.; Swiecicki, J. M. *Biochemistry* **2015**, *54* (2), 194–207.

<sup>172</sup> Jiao, C. Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (49), 33957–33965.

<sup>173</sup> Alves, I. D.; Jiao, C. Y.; Aubry, S.; Aussedat, B.; Burlina, F.; Chassaing, G.; Sagan, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (12), 2231–2239.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Des études de plusieurs CPPs (Tat, RW<sub>9</sub> et R<sub>9</sub>) sur des liposomes de type vésicules larges unilamellaires (LUVs pour *large unilamellar vesicles*) ont montré que ces séquences cationiques sont capables de s'internaliser dans le milieu intravésiculaire de LUVs de DOPG.<sup>174</sup> Les auteurs ont par ailleurs montré que cette internalisation pouvait être corrélée à la propension des lipides du feuillet externe à migrer vers le feuillet interne. Ce mouvement, aussi appelé *flip-flop*, est naturellement possible dans la membrane plasmique mais nécessite la présence de protéines membranaires pour s'effectuer. Même si les phospholipides anioniques (PG, PI, PS) sont plus présents dans le feuillet interne de la membrane plasmique et puisque les peptides sont capables de recruter les lipides lors de l'interaction,<sup>175,176</sup> cette étude permet d'envisager un mécanisme de translocation directe par micelles inverses, totalement indépendant de l'endocytose (Figure 77).

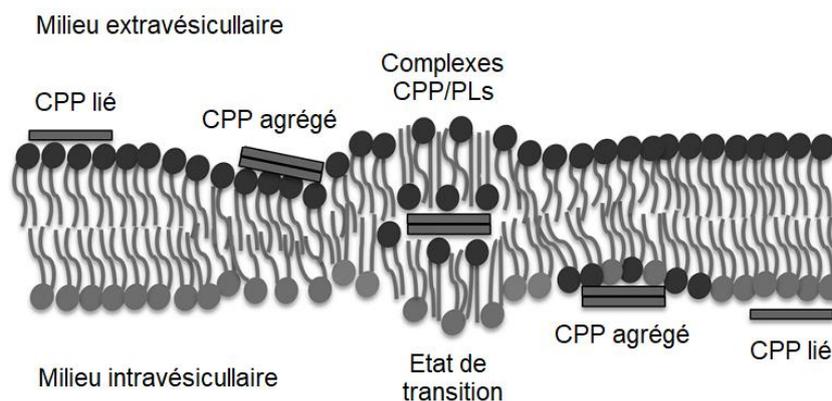


Figure 77 : Mécanisme de pénétration des CPPs par micelles inverses<sup>174</sup>

Ainsi, les petites séquences cationiques ou amphipathiques appelées CPPs sont capables de traverser la membrane plasmique afin de délivrer une molécule d'intérêt dans le milieu intracellulaire. Leur mécanisme d'action, par endocytose ou translocation directe, reste mal connu mais semble dépendre fortement de la nature de la séquence, de la nature du cargo, du type de cellule étudiée ainsi que de la concentration en peptide près de la membrane. Si cette activité en tant qu'agents de pénétration cellulaire fait des CPPs des outils intéressants pour la vectorisation, leur principal défaut reste leur faible stabilité plasmatique et leur manque de sélectivité quant aux cellules affectées, faisant de leur utilisation *in vivo* un défi majeur.

### 2.2. Peptides antimicrobiens (AMPs)

Les peptides antimicrobiens (AMPs pour *antimicrobial peptides*) sont une autre famille de peptides membranotropes. Ces peptides, de nature amphipathique, sont l'une des principales défenses non spécifiques de l'organisme capables de neutraliser un grand nombre de microbes. Isolés d'animaux ou de plantes, ces peptides sont nombreux à être étudiés pour leur potentiel thérapeutique (Tableau 6). Ces séquences présentent plusieurs propriétés communes : elles sont généralement amphipathiques, présentant une charge globale positive mais comportant des régions hydrophobes ; elles peuvent être linéaires adoptant des conformations en hélice  $\alpha$  ou structure  $\beta$ , ou cycliques avec la présence d'un ou plusieurs ponts disulfures.

<sup>174</sup> Swiecicki, J.-M.; Bartsch, A.; Tailhades, J.; Di Pisa, M.; Heller, B.; Chassaing, G.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Lavielle, S. *ChemBioChem* **2014**, *15* (6), 884–891.

<sup>175</sup> Alves, I. D.; Correia, I.; Jiao, C. Y.; Sachon, E.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Tollin, G.; Chassaing, G. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (3), 200–209.

<sup>176</sup> Alves, I. D.; Bechara, C.; Walrant, A.; Zaltsman, Y.; Jiao, C. Y.; Sagan, S. *PLoS One* **2011**, *6* (9), e24096.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Les AMPs sont capables de déstabiliser la membrane plasmique par la formation de pores entraînant la lyse des cellules soit en inhibant les fonctions normalement remplies par la membrane et indispensables au fonctionnement cellulaire, soit en agissant directement sur une cible intracellulaire.<sup>177</sup> Différentes études ont montré que ces séquences cationiques étaient capables d'interagir avec les constituants anioniques de la membrane plasmique, comme les phospholipides ou les protéoglycanes. Ces composés étant plus présents dans la membrane bactérienne, cette propriété explique la capacité de certains AMPs à agir préférentiellement sur les microbes. Par ailleurs, plusieurs AMPs sont actuellement en phase clinique pour des traitements d'infections bactériennes, virales, ou des cancers.<sup>178</sup>

Peptide	Séquence
Cécropine A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVVGQATQIAK
Dermaseptine 1	ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAANTISQGTQ
Magainine 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Magainine 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
Mélicitine	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKA
Histatine 1	DS*HEKRHHGYRRKFHEKHSHKEFPFYGDYGSNYLYDN
Gramicidine A	HCO-V <sub>g</sub> AIA <sub>v</sub> V <sub>v</sub> WIWIWIW-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
Tachyplesine	KWCFRVCYRGICYRRCR
BMAP-28	GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRI
HNP-1 (β-défensine)	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
Lactoferricine B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF
Alaméthicine	Ac-UPUAUAUQUVUGLUPVUUGQF <sub>ol</sub>
Harzianine HK VI	Ac-UNIIUPLLUPL <sub>ol</sub>
Pardaxine	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQE

Tableau 6 : Exemples d'AMPs connus et de leur séquence<sup>179,180</sup>

acides aminés série D notés en minuscule ; \* = phosphosérine ; U = acide aminoisobutyrique ; L<sub>ol</sub> = leucinol ; F<sub>ol</sub> = phénylalaninol

Différents mécanismes d'action ont été identifiés quant à l'activité membranotropique de ces peptides. Bien que tous les mécanismes proposés impliquent la formation de pores dans la membrane, on distingue deux modes de fonctionnement principaux : le « carpet-model » et le « barrel-stave model ».

<sup>177</sup> Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 491–511.

<sup>178</sup> Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 1–12.

<sup>179</sup> Andreu, D.; Rivas, L. *Biopolymers* **1998**, *47*, 415–433.

<sup>180</sup> Hoskin, D. W.; Ramamoorthy, A. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2008**, *1778* (2), 357–375.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Dans le « barrel-stave model », les AMPs s'agrègent en solution ou au contact de la membrane, adoptant une conformation en hélice  $\alpha$  ou structure  $\beta$  de manière à mettre les résidus hydrophobes en interaction avec les chaînes grasses des phospholipides de la membrane. L'AMP s'insère ainsi dans la bicouche lipidique tout en formant un pore sous la forme d'un canal aqueux (Figure 78, A).<sup>181</sup>

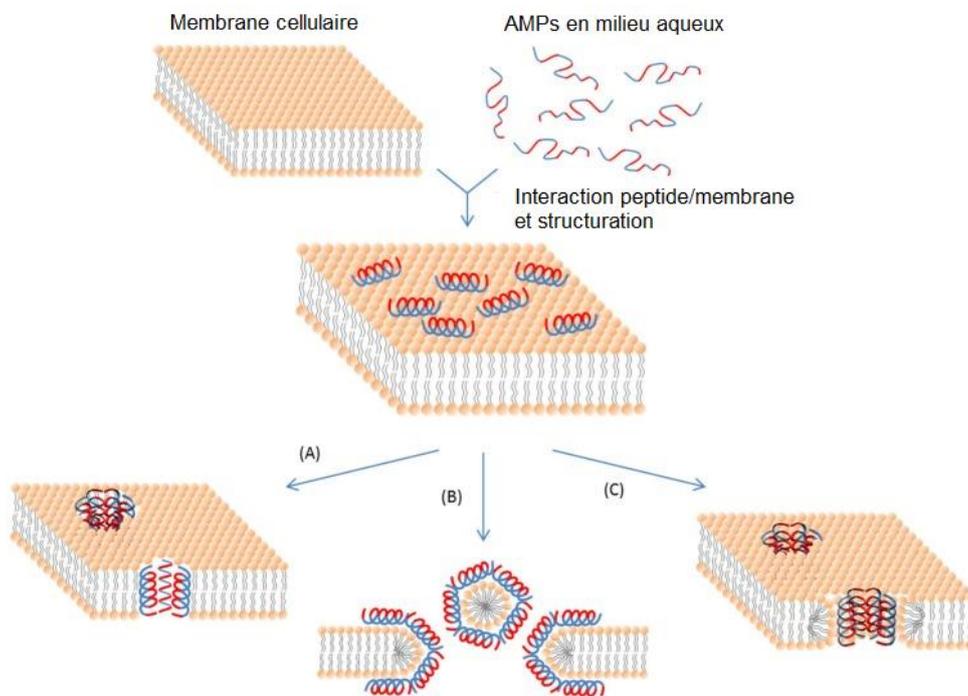


Figure 78 : Mécanismes d'action principaux des AMPs : (A) « barrel-stave model » ; (B) « carpet model » ; (C) modèle des pores toroïdaux<sup>182</sup>

Les AMPs agissant *via* le « barrel-stave model » remplissent généralement plusieurs critères : (i) ils sont de nature hydrophobe puisque leur mécanisme est régi par des interactions hydrophobes avec les phospholipides de la membrane, (ii) ils sont capables de s'auto-associer au contact de la membrane et d'adopter des structures  $\beta$  ou hélices  $\alpha$ , (iii) une fois insérés dans la membrane, ils sont capables de recruter d'autres séquences peptidiques de manière à élargir le pore formé.<sup>181</sup>

Le mécanisme « carpet-model » est bien plus représenté chez les AMPs. En effet, contrairement au « barrel-stave model », ce mode de fonctionnement ne requiert pas d'interaction entre les peptides et la formation d'agrégats, d'insertion dans la partie hydrophobe de la membrane, ou une structuration spécifique, ce qui explique qu'un grand nombre de séquences ont des activités antimicrobiennes sans pour autant entraîner la formation de canaux aqueux dans la membrane. Le « carpet-model » implique initialement une interaction électrostatique entre le peptide globalement cationique et la membrane chargée négativement de manière à « tapisser » la face extracellulaire. Les peptides s'orientent alors de manière à mettre en interaction leur partie hydrophobe vers les lipides et leur partie hydrophile vers le groupement phosphate. Après avoir atteint une concentration critique en peptide associé à la membrane, ces derniers perméabilisent ou désintègrent la membrane en modifiant sa courbure (Figure 78, B) à la manière d'un détergent.<sup>181</sup>

Ce processus pourrait également faire intervenir la formation de pores transitoires décrits dans le modèle des pores toroïdaux. Ce dernier est relativement similaire au « barrel-stave model » dans la

<sup>181</sup> Shai, Y. *Biopolymers* **2002**, 66 (4), 236–248.

<sup>182</sup> Bahar, A. A.; Ren, D. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (12), 1543–1575.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

mesure où l'interaction peptide/lipide entraîne la formation de pores. Néanmoins, dans le cas des pores toroïdaux, les AMPs interagissent avec les phosphates des phospholipides, les forçant à se courber sur eux-mêmes de manière à exposer leur partie hydrophile vers le pore en formation (Figure 78, C). Une autre différence fondamentale avec le « barrel-stave model » est qu'à l'issue de la formation du pore, une partie du peptide se trouve sur le feuillet interne de la membrane.

Il existe également un autre mode d'action des AMPs appelé modèle type détergent où les séquences peptidiques s'intercalent entre les lipides constitutifs de la membrane et se comportent comme des détergents. Ainsi, à faible concentration, la structure de la membrane n'est que peu modifiée. En revanche, à partir d'une certaine concentration, les peptides entraînent l'ouverture temporaire de la membrane et, à terme, sa dégradation. Bien souvent, le « carpet-model » est assimilé à un cas particulier du modèle type détergent dans la mesure où, à forte concentration en peptides, ces derniers modifient l'intégrité de la membrane.

Bien que le mécanisme d'action des AMPs entraîne généralement la lyse de la cellule, certaines séquences sont capables de perméabiliser suffisamment la membrane pour permettre leur pénétration dans le milieu intracellulaire afin d'atteindre d'autres cibles.<sup>183,184</sup> Ce comportement entraînant une translocation sans modification permanente de l'intégrité de la membrane, il pourrait être associé à celui des CPPs. Du fait de ces propriétés, certains AMPs ont d'ailleurs servi de précurseurs pour la préparation de CPPs chimériques.<sup>185</sup> Par ailleurs, des études ont montré que la Magainine 2<sup>184</sup> et la Buforine 2<sup>186</sup> étaient capables de pénétrer dans le milieu intracellulaire par la formation de pores toroïdaux transitoires.

### 2.3. Peptides pH-sensibles

Parmi les peptides membranotropes, certains exercent spécifiquement leur activité à pH acide (Tableau 7).<sup>187</sup> Leur action s'effectue ainsi principalement dans l'endosome où le pH est légèrement plus faible que le pH physiologique (environ 5 au lieu de 7). Ces peptides pH-sensibles sont généralement amphipathiques et sont capables de déstabiliser la membrane endosomale de deux manières différentes : en se structurant et en s'insérant dans la bicouche lipidique et en la perméabilisant en captant des protons.

Peptide	Séquence
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA
HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG
pHLIP	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLALLLVDDEGT
polyHis	H <sub>n</sub>

Tableau 7 : Exemples de peptides membranotropes pH-sensibles

Certaines séquences sont ainsi riches en résidus acides tels que des acides glutamiques ou aspartiques, en résidus basiques comme les lysines ou en résidus hydrophobes. De tels peptides sont assez

<sup>183</sup> Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R. E. W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (38), 35714–35722.

<sup>184</sup> Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, 34 (19), 6521–6526.

<sup>185</sup> Henriques, S. T.; Melo, M. N.; Castanho, M. A. R. B. *Biochem. J.* **2006**, 399 (1), 1–7.

<sup>186</sup> Kobayashi, S.; Chikushi, A.; Tougu, S.; Imura, Y.; Nishida, M.; Yano, Y.; Matsuzaki, K. *Biochemistry* **2004**, 43 (49), 15610–15616.

<sup>187</sup> Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. *J. Control. Release* **2011**, 151 (3), 220–228.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

hydrophiles et peu structurés au pH physiologique mais changent complètement de comportement une fois que le milieu de l'endosome atteint un pH acide. En effet, la protonation des fonctions carboxylate ou amine des résidus diminue l'hydrophilie du peptide et lui permet de se structurer, généralement sous forme d'hélice  $\alpha$ , grâce à la création de nouvelles liaisons hydrogène. Le peptide peut alors s'insérer dans la membrane endosomale et la déstabiliser de la même façon qu'un AMP.

Le peptide modèle GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) a été étudié pour son caractère amphipathique et sa dépendance au pH, similaire à celle de certaines protéines entraînant la pénétration cellulaire (protéines de fusion). Cette séquence, riche en acide glutamique, est globalement anionique à pH neutre et la répulsion électrostatique entre les groupements carboxylate empêche le peptide d'adopter une structure en hélice  $\alpha$ . Lors de la diminution du pH dans l'endosome, la protonation des résidus acide glutamique permet d'augmenter l'hydrophobie du peptide et entraîne la formation d'hélice  $\alpha$ , lui permettant de s'insérer dans la membrane endosomale.<sup>188</sup> Cette insertion permet la formation de pores, probablement selon le « barrel-stave model » du fait de la forte hydrophobie du peptide, et donc la libération du contenu de l'endosome. Afin de former des complexes capables de délivrer des oligonucléotides dans le cytosol, des analogues cationiques de GALA, comme le KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA), ont été synthétisés. La séquence de ce dernier correspond à celle du GALA dans laquelle la plupart des résidus acide glutamique ont été remplacés par des résidus lysine. Le peptide ainsi obtenu n'est donc plus anionique mais cationique à pH neutre. S'il ne gagne pas réellement d'hydrophobie à pH acide, la protonation des fonctions amine lui permet d'adopter une structure en hélice  $\alpha$  et de s'insérer dans la membrane endosomale.

D'autres peptides sont capables de perméabiliser la membrane endosomale grâce à un mécanisme appelé « éponge à protons ». Ces peptides sont généralement riches en résidus basiques capables de se protoner au pH acide de l'endosome. Cette protonation entraîne un flux accru de protons et de molécules d'eau du cytosol vers l'endosome ce qui entraîne, à terme, la rupture de la membrane endosomale et le relargage du contenu de la vésicule. Les poly-histidines (polyHis) sont certainement les peptides les plus représentatifs de cette famille. En effet, le pKa de l'imidazole d'une histidine étant de 6,15, ces composés sont capables de se protoner uniquement dans le milieu acide des endosomes. Le recrutement des protons, des ions chlorures et de molécules d'eau du cytosol vers l'endosome entraîne finalement la destruction de la membrane.<sup>189</sup>

### 3. Les peptides de fusion du VHC

Les peptides de fusion sont un autre type de peptides membranotropes relativement peu étudié. Ces séquences très hydrophobes sont comprises dans les protéines de fusion virales et sont capables de s'insérer dans la membrane cellulaire lors du processus de fusion. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de peptides de fusion du VHC, sélectionnés en se basant sur la littérature, comme agents de pénétration cellulaire.

#### 3.1. Les protéines de fusion E1 et E2

Les virus enveloppés infectent les cellules selon un processus faisant intervenir une fusion membranaire. Lors de l'infection, la fusion permet le relargage du contenu de la particule virale (protéines/enzymes, ARN) dans le cytoplasme, afin de réaliser la réplication du génome viral et la formation de virions. Cette étape, caractérisée par la fusion de la membrane virale et de la membrane

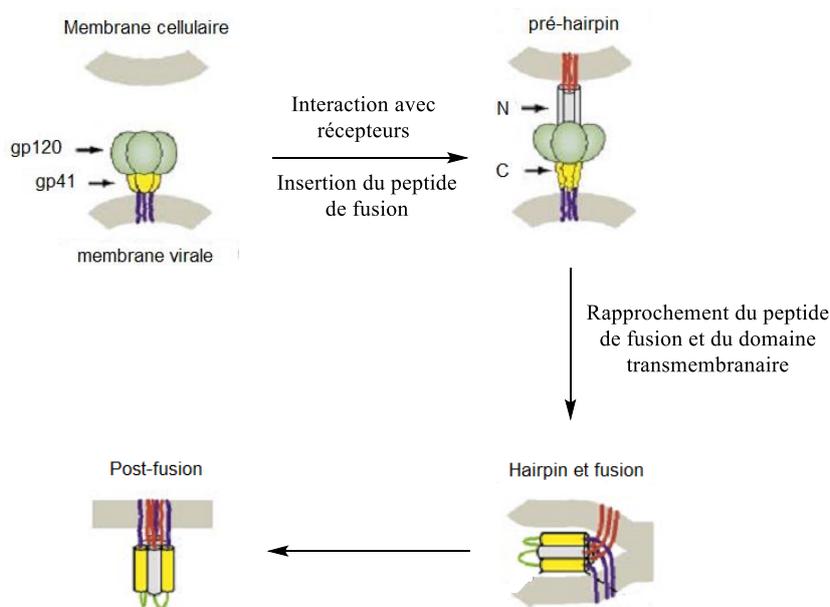
<sup>188</sup> Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (7), 967–985.

<sup>189</sup> Pack, D. W.; Putnam, D.; Langer, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67* (2), 217–223.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

cellulaire, peut être réalisée soit directement sur la membrane plasmique, soit sur la membrane endosomale après internalisation du virus par endocytose. La fusion est réalisée par l'intermédiaire de protéines virales membranaires présentes à la surface des virus enveloppés, appelées protéines de fusion (FPs). Sous l'action de certains stimuli comme le pH acide de l'endosome ou des interactions protéines/protéines initiées par la reconnaissance de certains récepteurs cellulaires, les FPs vont s'agréger et/ou subir un changement conformationnel permettant l'exposition d'une séquence très hydrophobe appelée peptide de fusion. Ce dernier est capable de s'insérer dans la membrane cellulaire de manière à la rapprocher de la membrane virale, afin d'entraîner, à terme, leur fusion.<sup>190</sup>

Les FPs sont généralement classées en deux groupes selon leur architecture et leur mode de fonctionnement : les protéines de fusion de classe I et les protéines de fusion de classe II. Les protéines de fusion de classe I, incluant la protéine hémagglutinine du virus *influenza* et la protéine gp41 du VIH, sont des homotrimères avec de nombreux segments adoptant des structures en hélice  $\alpha$  et formant une « tige » perpendiculaire à la membrane virale. L'une des propriétés caractéristiques des FPs de classe I est la présence d'homotrimères avant et après le processus de fusion. Durant le processus de fusion, ces FPs s'insèrent, grâce au peptide de fusion, dans la membrane cellulaire sous la forme d'une « tige ». Elles se re-structurent alors de manière à regrouper le peptide de fusion et le domaine transmembranaire de la protéine, adoptant ainsi une conformation en « épingle » ou *hairpin*. Ce changement permet ensuite de rapprocher les membranes cellulaire et virale de manière à déclencher la fusion (Figure 79).<sup>191</sup>



**Figure 79 : Processus de fusion impliquant la protéine de fusion de classe I gp41 du VIH (peptide fusion en rouge et domaine transmembranaire en violet, N correspond au domaine N-terminal et C au C-terminal)<sup>191</sup>**

Les protéines de fusion de classe II, incluant les protéines des alphavirus et des flavivirus, diffèrent des protéines de classe I non seulement par leur structure mais également par leur comportement pré- et post-fusion. Ces protéines prennent une forme allongée avec trois domaines globulaires, riches en feuillettes  $\beta$ . Elles sont ainsi divisées en trois différents domaines (Figure 80) : le premier (domaine I) est un « tonneau  $\beta$  » contenant la partie N-terminale de la protéine et deux jonctions le liant au domaine II, composé de plusieurs brins  $\beta$ . Le peptide de fusion est contenu dans une de ces jonctions,

<sup>190</sup> Kielian, M. *Virology* **2006**, 344 (1), 38–47.

<sup>191</sup> Eckert, D. M.; Kim, P. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70 (1), 777–810.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

formant une boucle liant les brins  $\beta$  c et d (aussi appelée boucle cd). Les domaines I et II sont séparés par une région charnière, très flexible, permettant à la protéine d'adopter différentes conformations selon l'étape du processus de fusion. Le domaine I est également lié au domaine III, qui est défini par un « tonneau  $\beta$  » stabilisé par trois ponts disulfures. Enfin, le domaine III est suivi d'une « tige » faisant le lien avec la partie transmembranaire virale.

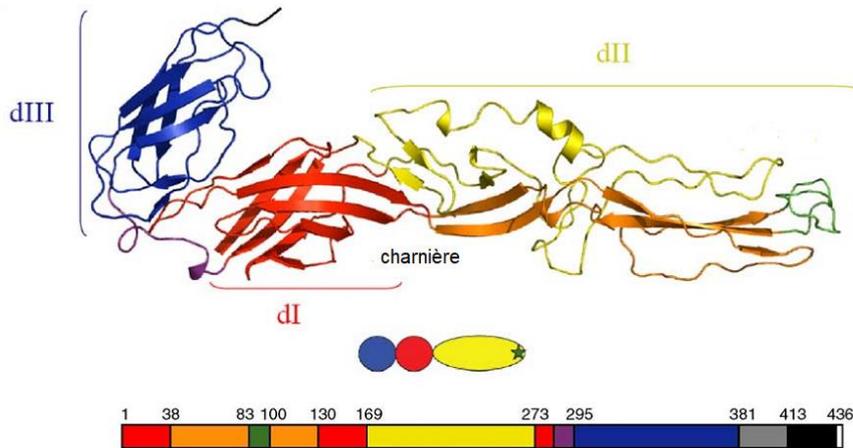


Figure 80 : Exemple d'une structure pré-fusion d'une FP de classe II (protéine E1 du virus de la forêt de Semliki)<sup>190</sup>  
En rouge : domaine I ; en jaune : domaine II ; en vert : boucle cd ; en bleu : domaine III ; en noir : région transmembranaire.

Contrairement aux FP de classe I, les protéines de classe II existent sous la forme d'homo- ou hétérodimères (avec une autre protéine transmembranaire virale) avant le processus de fusion. Lors de la fusion, la déstabilisation du dimère permet de libérer la protéine de fusion qui s'oriente alors perpendiculairement à la membrane virale. Le peptide de fusion situé à l'extrémité de la protéine peut ensuite s'insérer dans la membrane cellulaire. La protéine de fusion forme alors un homotrimère puis, en milieu acide, ce dernier subit un changement conformationnel permettant la formation de l'« épingle » et donc le rapprochement des membranes virales et cellulaire entraînant la fusion (Figure 81).<sup>190</sup>

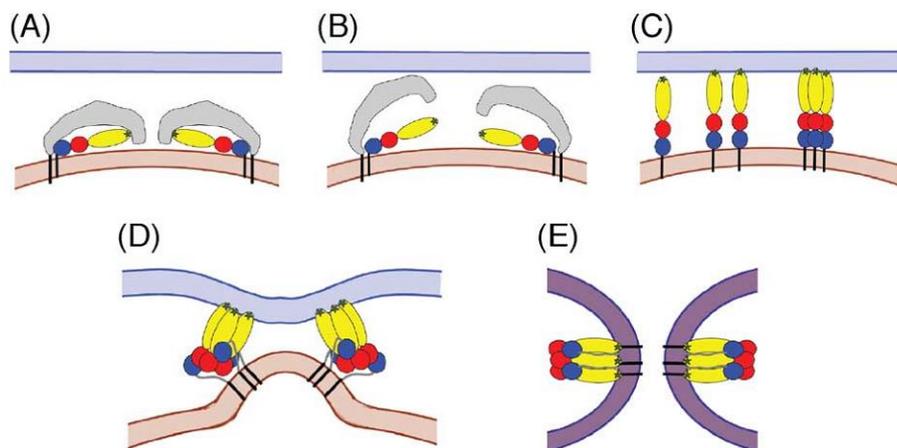
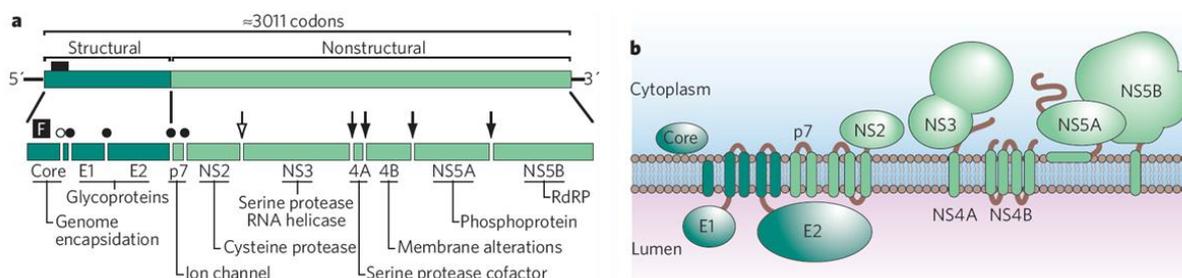


Figure 81 : Modèle du processus de fusion induit par la protéine E1 du virus de la forêt de Semliki.  
(A) Dimère pré-fusion entre la protéine E1 (domaine I en rouge, II en jaune et III en bleu) et la protéine E2 (gris) ; (B) Dissociation du dimère à pH acide exposant le peptide de fusion (étoile verte) ; (C) Insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire et trimérisation de la protéine E1 ; (D) Restructuration du trimère de manière à former une « épingle » rapprochant le peptide de fusion et la région transmembranaire et entraînant la fusion ; (E) Configuration post-fusion.<sup>190</sup>

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Comme expliqué en introduction, le virus de l'hépatite C (VHC) possède plusieurs protéines non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) et des protéines structurales (C, E1, E2 et p7). Ces protéines sont obtenues après découpage de la polyprotéine codée par l'ARN viral, sous l'action des peptidases et protéases (Figure 82a).<sup>192</sup> Les glycoprotéines E1 et E2 sont ainsi des protéines transmembranaires comportant une région *N*-terminale extracellulaire importante et un court domaine transmembranaire très hydrophobe du côté *C*-terminal (Figure 82b).



**Figure 82 : (a) Structure de la polyprotéine virale et sites d'action des peptidases (cercles) et des protéases (flèches) ; (b) Structures des différentes protéines dans la membrane virale<sup>192</sup>**

Plusieurs études ont montré que les protéines E1 et E2 du VHC étaient capables de s'associer sous la forme d'hétérodimères responsables de la reconnaissance de certains récepteurs membranaires des cellules touchées. Ces interactions avec les récepteurs entraînent l'internalisation du virus par endocytose clathrine-dépendante,<sup>193</sup> puis les protéines E1 et E2 permettent alors la fusion des membranes virale et endosomale grâce au pH acide de l'endosome.<sup>194</sup>

En se basant sur ces observations ainsi que des comparaisons avec des protéines de fusion provenant de virus de la même famille (le virus de la méningo-encéphalite à tiques) et des modélisations structurales,<sup>195</sup> il a été proposé que les protéines E1 et E2 étaient des protéines de fusion de classe II du VHC. De nombreuses études ont montré, par mutagenèse ou co-expression des protéines, que la formation du dimère E1/E2 était indispensable pour le processus de fusion. De plus, il est généralement admis que la protéine E2 est impliquée dans la reconnaissance cellulaire,<sup>196</sup> alors que E1 joue un rôle dans le processus de fusion.<sup>195</sup>

### 3.2. Sélection des séquences étudiées

De nombreuses études ont été menées sur les protéines de fusion E1 et E2 depuis une vingtaine d'années, afin d'essayer d'identifier le peptide de fusion du VHC. En se basant sur des modélisations structurales, des comparaisons de séquences, des études d'hydrophobie et de fusion sur des liposomes comme modèles de membrane cellulaire, différentes séquences des protéines E1 et E2 ont été identifiées comme étant impliquées dans le processus de fusion et donc pouvant être potentiellement le peptide de fusion du VHC (Tableau 8).

<sup>192</sup> Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. *Nature* **2005**, *436* (7053), 933–938.

<sup>193</sup> Meertens, L.; Bertaux, C.; Dragic, T. *J. Virol.* **2006**, *80* (23), 11571–11578.

<sup>194</sup> Vieyres, G.; Thomas, X.; Duverlie, G.; Patel, A. H.; Dubuisson, J. *J. Virol.* **2010**, *84* (19), 10159–10168.

<sup>195</sup> Garry, R. F.; Dash, S. *Virology* **2003**, *307* (2), 255–265.

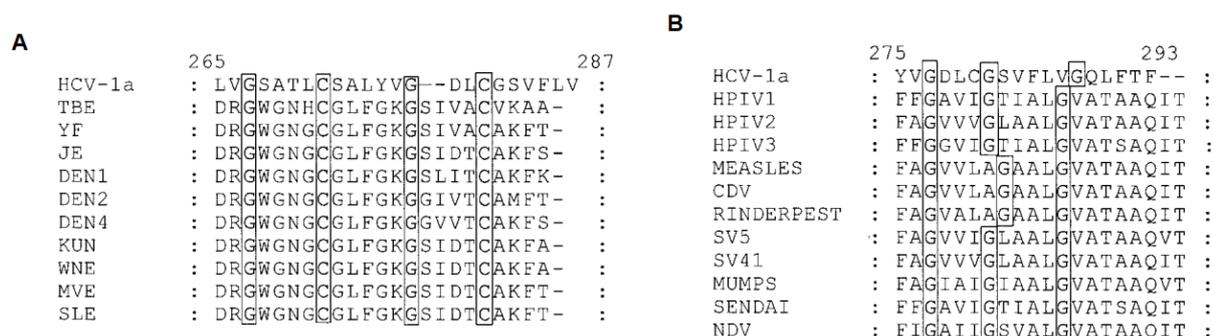
<sup>196</sup> Drummer, H. E.; Boo, I.; Maerz, A. L.; Pountourios, P. *J. Virol.* **2006**, *80* (16), 7844–7853.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Séquence	Protéine	Domaine
<sup>264</sup> LLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQ <sup>290</sup> L	E1	Ecto
<sup>272</sup> CSALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRHWTQD <sup>304</sup> C	E1	Ecto
<sup>284</sup> VFLV <sup>288</sup> G	E1	Ecto
<sup>330</sup> AALVVAQLLRIPQAIMD <sup>347</sup> M	E1	pTMD
<sup>418</sup> GWHINRTALNCND <sup>432</sup> S	E2	Ecto
<sup>430</sup> NDSLYTGWLAGLFYHHKFN <sup>449</sup> S	E2	Ecto
<sup>495</sup> GIVPAKSVCGPVYCFTPSVV <sup>515</sup> V	E2	Ecto
<sup>543</sup> RPPLGNWFGCTWMNSTG <sup>560</sup> F	E2	Ecto
<sup>593</sup> TYQRCGSGPWVTPRCLVDYAYRL <sup>616</sup> W	E2	Ecto
<sup>675</sup> TQLSILPCSFSTMPALSTGLIHLHQ <sup>699</sup> N	E2	pTMD

**Tableau 8 : Différentes séquences de E1 et E2 identifiées comme potentiels peptides de fusion**  
pTMD = domaine pré-transmembranaire (*pre-transmembrane domain*) ; la numérotation des résidus correspond à celle de la polyprotéine virale.

Ainsi, Flint *et al.* ont proposé, en 1999, l'existence d'un peptide de fusion potentiel dans une région très hydrophobe de la protéine E1. En effet, en comparant les séquences des protéines de fusion E1 et E2 avec celles des flavivirus, il a été possible de montrer de nombreuses similitudes entre la séquence <sup>265</sup>LVGSATLCSALYVGDLCGSVFL<sup>287</sup>V de E1 et des séquences de potentiels peptides de fusion de virus de même famille (Figure 83A).<sup>197</sup> Notamment, la <sup>267</sup>Gly, la <sup>272</sup>Cys, la <sup>278</sup>Gly et la <sup>281</sup>Cys se sont révélées fortement conservées au sein des flavivirus. De plus, la comparaison de cette séquence de la protéine E1 avec les peptides de fusion des paramyxovirus a montré un enchaînement similaire de résidus, notamment les glycines, connues pour jouer un rôle capital dans la structure des peptides de fusion de ces virus (Figure 83B).



**Figure 83 : Comparaison des séquences de VHC E1 avec les flavivirus (A) ; avec les paramyxovirus (B)**<sup>197</sup>  
TBE : virus de la méningo-encéphalite à tiques ; YF : fièvre jaune ; JE : virus de l'encéphalite japonaise ; DEN : virus de la dengue ; KUN : virus de Kunjin ; WNE : virus du Nil occidental ; MVE : virus de l'encéphalite de la Murray valley ; SLE : virus de l'encéphalite de St. Louis ; HPIV : virus *parainfluenza* humain ; CDV : virus de la maladie de Carré ; SV : virus simien ; NDV : virus de la maladie de Newcastle.

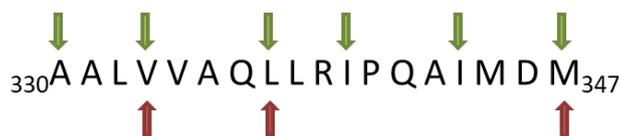
<sup>197</sup> Flint, M.; Thomas, J. M.; Maidens, C. M.; Shotton, C.; Levy, S.; Barclay, W. S.; McKeating, J. A. *J. Virol.* **1999**, 73 (8), 6782–6790.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Enfin, il est intéressant de noter que le résidu <sup>279</sup>Asp est extrêmement conservé au sein des différents génotypes du VHC, et également présent dans certains peptides de fusion supposés des flavivirus. L'activité fusogénique des protéines E1 et E2 du VHC étant dépendante du pH, la présence d'un résidu acide dans cette séquence pourrait justifier son identification comme peptide de fusion.

Par la suite, Garry *et al.* ont réalisé des études de protéomique par modélisation sur les protéines E1 et E2 du VHC. La comparaison des séquences des protéines E1 et E2 avec celles de la protéine de fusion E du virus de la méningo-encéphalite à tiques (TBEV pour *tick-borne encephalitis virus*) et la protéine E2 du virus de la forêt de Semliki (SFV pour *Semliki-forest virus*) a permis d'identifier une région de E1 comprise dans celle proposée par Flint *et al.*, correspondant aux peptides de fusion des autres virus : <sup>272</sup>CSALYVGDL<sup>281</sup>C. En effet, cette étude a également montré la présence de certains résidus fortement conservés dans les protéines virales des flavivirus à savoir la <sup>278</sup>Gly et la <sup>281</sup>Cys. De plus, des modélisations structurales de la protéine E1 en se basant sur les similitudes avec la protéine E du TBEV, laissent penser que cette séquence serait comprise dans la boucle hydrophobe contenant généralement le peptide de fusion (boucle cd) chez les FPs de classe II.

Des expériences de mutagenèse menées par Drummer *et al.* ont montré que le motif <sup>284</sup>VFLV<sup>288</sup>G compris dans la séquence identifiée par Flint *et al.*, était primordial pour le processus de fusion. En effet, dans cette étude, des pseudo-particules virales modèles du VHC présentant différents mutants des protéines E1 et E2 ont été préparées.<sup>198</sup> Il a ainsi été montré qu'une mutation F285A<sup>i</sup> entraînait une réduction totale de la pénétration virale sans pour autant influencer sur l'expression des protéines, leur hétérodimérisation ou leur structuration. Les autres mutations effectuées, V277A, L286A, Y276A ou Y276R ont très peu modifié la pénétration virale montrant que, dans la séquence 265-285 identifiée par Flint *et al.*, le motif VFLVG et particulièrement la <sup>285</sup>Phe, sont d'une grande importance dans le processus de fusion. Cette étude a également démontré que la séquence pré-transmembranaire de E1 (330-347), AALVVAQLLRIPQAIMDM, présentait des résidus importants pour l'activité fusogénique. En effet, des substitutions de certains résidus en proline ou alanine (Figure 84) ont altéré l'entrée cellulaire du virus de manière significative.



**Figure 84 : Mutations en Pro (flèches verte) et en Ala (flèches rouge) apportées à la séquence pré-transmembranaire 330-347 de la protéine E1.**

Dans le même temps, Lavillette *et al.* ont montré grâce à des expériences de mutagenèse que des mutants, notamment ceux incorporant les modifications Y276F, G282A, G418A, G418D, W616A et W616F, étaient capables d'incorporer normalement le dimère E1/E2 et de se lier à la membrane cellulaire, mais présentaient des niveaux de pénétration virale très réduits (au moins 20 fois moins de pénétration que le type naturel).<sup>199</sup> Ces observations confirment que la séquence 265-285 pourrait être le peptide de fusion du VHC mais soulève également le potentiel des séquences 416-430 et 600-620 de la protéine E2.

<sup>198</sup> Drummer, H. E.; Boo, I.; Poubourios, P. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1144–1148.

<sup>199</sup> Lavillette, D.; Pecheur, E. I.; Donot, P.; Fresquet, J.; Molle, J.; Corbau, R.; Dreux, M.; Penin, F.; Cosset, F. L. *J. Virol.* **2007**, *81* (16), 8752–8765.

<sup>i</sup> Par convention, les mutations sont symbolisées par la position et la nature de l'acide aminé initial, ainsi que la nature de l'acide aminé intégré. Par exemple, la mutation F285A correspond à la substitution de la phénylalanine 285 par une alanine.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Enfin, Pérez-Berná *et al.* ont longuement étudié la séquence des protéines de fusion E1 et E2. Des peptides de 18 acides aminés couvrant les séquences complètes des protéines de fusion du VHC ont ainsi été préparées. Ces peptides, dont les séquences se recoupent, ont ensuite été étudiés en termes d'hydrophobie ainsi que leur capacité à induire la fusion ou l'hémifusion sur des liposomes comme modèles de membrane cellulaire.<sup>200</sup> L'étude de l'activité fusogénique de ces séquences en fonction des résidus les composant, a alors permis d'identifier clairement les régions les plus membranotropes des protéines (Figure 85). Ces régions confirment les études précédemment citées, notamment sur le potentiel des séquences 265-304 et 416-430.

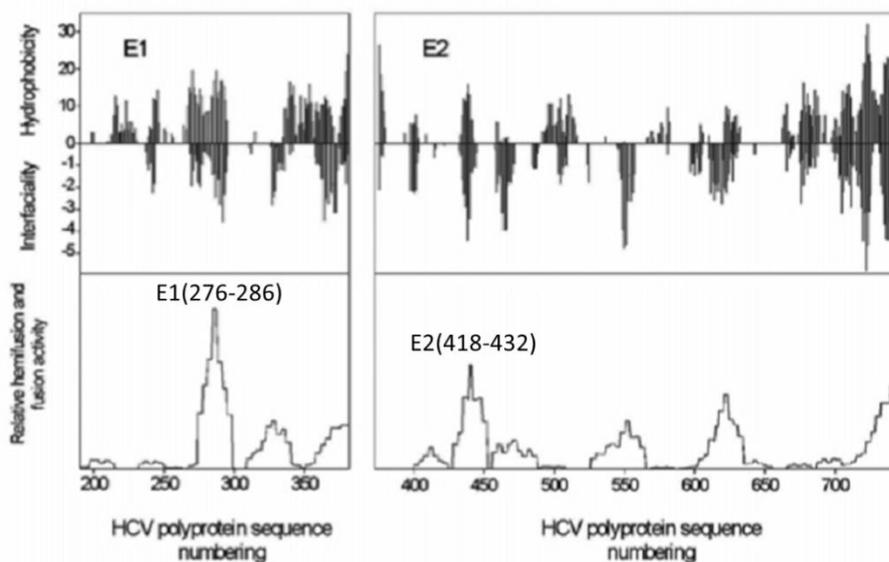


Figure 85 : Étude de l'hydrophobie et de l'activité fusogénique des séquences des protéines E1 et E2<sup>200</sup>

Cette étude identifie la région extracellulaire de la protéine E1 comme étant la plus membranotrope. Pérez-Berná *et al.* ont également confirmé cette observation en caractérisant l'interaction de la séquence (274-291) avec des liposomes comme modèles de membranes cellulaires par différentes méthodes notamment la spectrofluorescence et la RMN <sup>13</sup>P. Les résultats obtenus avec des vésicules de différentes compositions (PC, PS et acide L- $\alpha$ -phosphatidique) démontrent la capacité de cette séquence à interagir avec une bicouche lipidique par des interactions électrostatiques et hydrophobes, de s'adsorber à la surface membranaire et d'en modifier les propriétés physiques.<sup>201</sup>

Ainsi, les études de mutagenèse montrent l'importance des différentes séquences des protéines E1 et E2 quant au processus de fusion mis en jeu lors de l'infection virale. Trois régions ressortent principalement de ces investigations : la partie extracellulaire de E1 (265-304), la région pré-transmembranaire de E1 (330-347) et la partie extracellulaire de E2 (416-430 et 600-620). Néanmoins, ces études étant réalisées sur l'hétérodimère E1/E2, il est également possible que ces séquences soient impliquées dans le processus de fusion à un autre niveau que celui de l'insertion membranaire du peptide de fusion (interaction avec récepteurs, interaction protéine/protéine, changement conformationnel, *etc.*). Les travaux de Pérez-Berná apportent alors un éclairage différent, plus focalisé sur les séquences peptidiques que sur les protéines virales. D'après leurs observations, deux séquences

<sup>200</sup> Pérez-Berná, A. J.; Moreno, M. R.; Guillén, J.; Bernabeu, A.; Villalaín, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3755–3768.

<sup>201</sup> Pérez-Berná, A. J.; Pabst, G.; Lagner, P.; Villalaín, J. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788* (10), 2183–2193.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

semblent plus fusogéniques que les autres : la région extracellulaire de E1 (265-304) et celle de E2 (416-430).

Dans l'optique d'étudier le comportement de ces peptides et de chercher la séquence minimale qui permettrait une pénétration efficace de SRO91, il a été décidé de se concentrer principalement sur les régions les plus membranotropes des protéines E1 (HCV1 et HCV2, Tableau 9) et E2 (HCV4, Tableau 9).

Les différentes études présentées précédemment font état de l'importance du motif VFLVG dans l'activité membranotrope de la région extracellulaire de la protéine E1. Ce pentapeptide sera également synthétisé (HCV3, Tableau 9) afin de vérifier si cette courte séquence est suffisante pour l'activité membranaire.

Nom	Code	Séquence
VHC-E1(265-304)	HCV1	LVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQDC
VHC-E1(330-347)	HCV2	AALVVAQLLRIPQAIMDM
VHC-E1(284-288)	HCV3	VFLVG
VHC-E2(418-432)	HCV4	SWHINRTALNCNDS
[ <sup>272</sup> Ser, <sup>281</sup> Ser, <sup>304</sup> Ser] VHC-E1(265-304)	HCV5	LVGSATL <u>SS</u> ALYVGD <u>L</u> SGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQ <u>D</u> S
[ <sup>281</sup> Ser]VHC-E1(276-286)	HCV6	YVGD <u>L</u> SGSVFL
[ <sup>429</sup> Ser]VHC-E2(418-432)	HCV7	SWHINRTALN <u>S</u> NDS
VIH-Tat(47-57)	Tat	YGRKKRRQRRR

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des peptides étudiés

Cependant, la présence de plusieurs résidus cystéine (<sup>272</sup>Cys, <sup>281</sup>Cys, et <sup>304</sup>Cys) dans les séquences sélectionnées issues de la protéine E1, est incompatible avec les analyses envisagées (calorimétrie et ondes acoustiques de surface). En effet, la présence de tels résidus peut entraîner la formation de ponts disulfures, complexifiant l'étude d'interaction avec la membrane en augmentant le nombre d'espèces en présence. Ainsi, il a été décidé de remplacer ces résidus cystéine par des résidus sérine afin de s'affranchir de ces complications éventuelles tout en gardant le caractère donneur de liaisons hydrogène de l'acide aminé (résidus soulignés dans la séquence HCV5, Tableau 9). En effet, même si les travaux cités précédemment montrent l'importance des résidus <sup>272</sup>Cys et <sup>281</sup>Cys, une étude menée par Li *et al.*, a montré qu'ils n'étaient pas impliqués dans des ponts disulfures intra- ou inter-protéines.<sup>202</sup> De plus, afin de faciliter les synthèses et notamment les réactions de conjugaison ultérieures, la séquence HCV5 a été tronquée (HCV6, Tableau 9).

Pour la protéine E2, le même raisonnement a été appliqué à savoir le remplacement de la <sup>429</sup>Cys par un résidu sérine, donnant le peptide HCV7 à partir de la séquence HCV4 (Tableau 9). Il a également été choisi d'utiliser le peptide Tat comme référence dans cette étude du fait de la connaissance de son

<sup>202</sup> Li, H.-F.; Huang, C.-H.; Ai, L.-S.; Chuang, C.-K.; Chen, S. S. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 89.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

interaction avec des modèles de membranes tels que les liposomes et son utilisation fréquente pour la délivrance intracellulaire de composés d'intérêt. Pour toutes ces raisons, il a été décidé de synthétiser et d'étudier quatre séquences : HCV3, HCV6, HCV7 et la référence Tat (entrées grisées dans le Tableau 9).

Différentes fonctionnalisations ont ensuite été envisagées pour ces séquences. En effet, afin de « mimer » la position de ces peptides dans la séquence protéique, l'extrémité C-terminale des peptides libres (Série 0, Figure 86) a été amidifiée, tandis que leur extrémité N-terminale a été acylée par le motif acide 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridécane-succinamique (TTDS) très hydrophile. L'utilisation d'un tel espaceur permet non seulement d'apporter de l'hydrophilie à ces séquences hydrophobes et d'augmenter leur solubilité, mais également d'éloigner la séquence d'un potentiel cargo et éviter une interaction pouvant gêner la pénétration membranaire. De plus, la fonction amine du motif TTDS a été acétylée afin de simuler la présence d'un éventuel cargo (Série 1, Figure 86).

La Série 2 (Figure 86) est obtenue en introduisant, en position C-terminale, un résidu lysinamide fonctionnalisé par un acide lipoïque sur l'amine de la chaîne latérale. Ce dernier permettra la fixation des peptides sur une puce en or grâce au motif dithiolane. Ainsi les interactions de ces peptides avec des liposomes pourront être analysées par ondes acoustiques de surface.

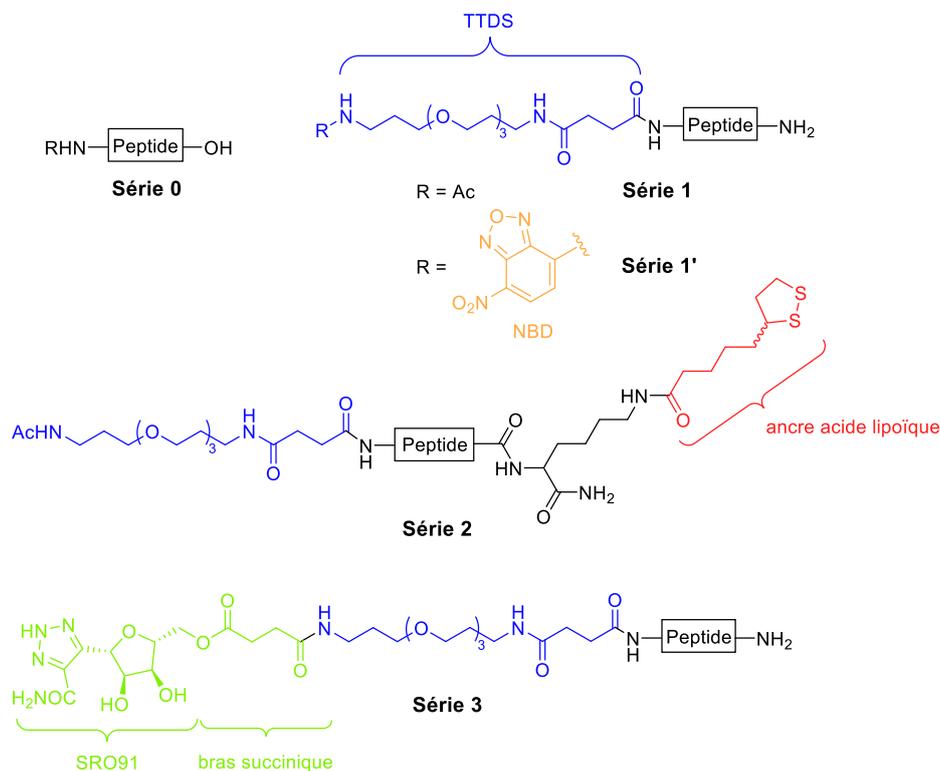


Figure 86 : Structure des différentes séries de peptides envisagées

Enfin, différentes conjugaisons ont été envisagées à la place du groupement acétyle des composés de la Série 1. La première, avec une molécule fluorescente, le 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD), permettrait d'obtenir des séquences marquées (Série 1', Figure 86) afin de réaliser des études d'internalisation des peptides dans des modèles de membrane cellulaire (spectrofluorescence) et dans des cellules (microscopie). La deuxième correspond à une conjugaison avec la molécule anti-VHC grâce à un bras succinique (composé **8**), pour donner des conjugués qui seront testés *in vitro* pour leur activité anti-VHC (Série 3, Figure 86).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

### 4. Synthèse des peptides d'intérêt et leurs conjugués

Tous les peptides étudiés ont été synthétisés sur support solide (SPPS pour *solid-phase peptide synthesis*). La SPPS a été développée par Merrifield dans les années 60, dans l'idée de réaliser des synthèses rapides sur support solide (une bille de résine, généralement un *co*-polymère polystyrène-*co*-polydivinylbenzène pouvant être fonctionnalisé) avec de meilleurs rendements que la synthèse en solution et permettant des traitements facilités.<sup>203</sup>

La SPPS fait intervenir des groupements protecteurs de deux types : des groupements dits temporaires comme les carbamates (Boc ou Fmoc) sur la fonction amine des acides aminés et des groupements permanents portés par les chaînes latérales. Afin d'éviter la formation de sous-produits (séquences de délétion ou croissance de la séquence peptidique sur des chaînes latérales), ces groupements protecteurs et le lien avec la résine doivent être orthogonaux, c'est-à-dire dégradés dans des conditions différentes (Schéma 51). Dans la stratégie dite Fmoc/*t*Bu, l'amine de chaque acide aminé est protégée par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) déprotégé en milieu basique (généralement de la pipéridine) alors que le lien avec la résine et les groupements protecteurs permanents (*t*Bu, Trt, Boc, Pbf, *etc.*) ne sont dégradés qu'en milieu acide (généralement une solution d'acide trifluoroacétique, TFA).<sup>204</sup> La synthèse du peptide ou élongation de la chaîne est alors effectuée par une succession de cycles comprenant une étape de déprotection de l'amine terminale protégée par un groupement Fmoc, puis un couplage avec un nouvel acide aminé en utilisant un activateur (composé permettant la formation d'un ester activé) et une base (Schéma 51).

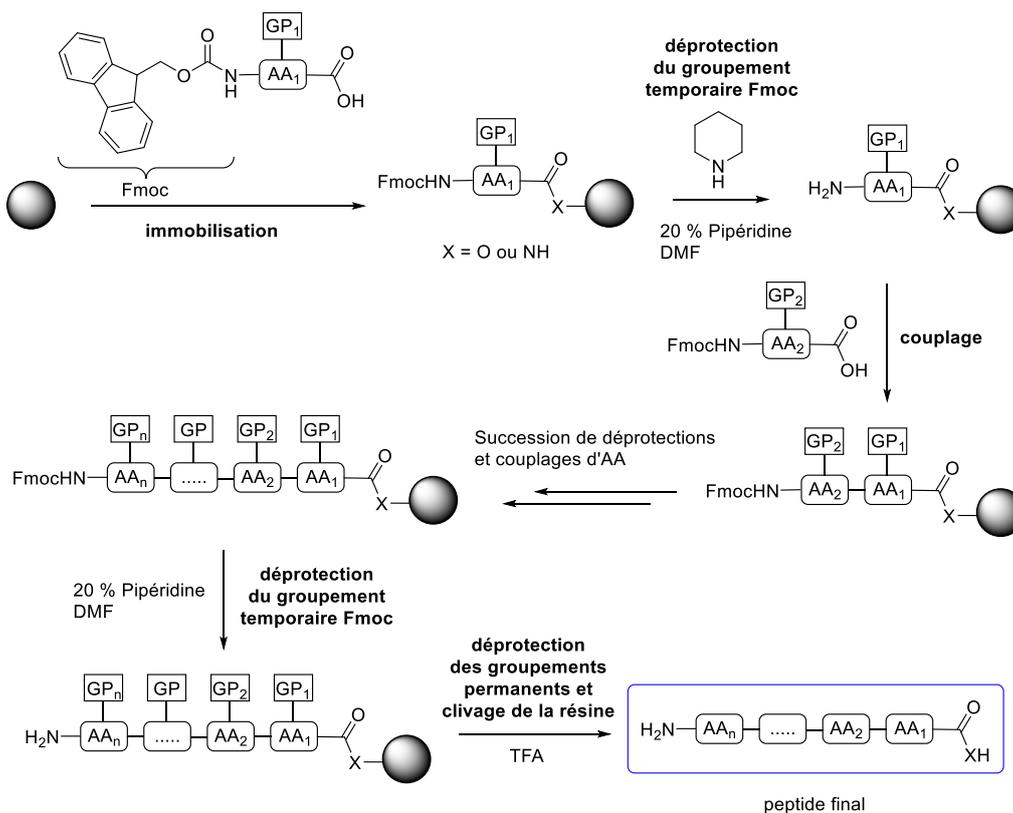


Schéma 51 : Schéma général d'une synthèse peptidique par SPPS suivant la stratégie Fmoc/*t*Bu

<sup>203</sup> Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.

<sup>204</sup> Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. In *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press, 1997; pp 19–94.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Lors de cette étude, les peptides ont été synthétisés par SPPS en suivant la stratégie Fmoc/*t*Bu. Les acides aminés ont ainsi été utilisés sous la forme *N*<sup>α</sup>-Fmoc protégée et portant des groupements acidolabiles sur les chaînes latérales. Les réactions de couplage en synthèse automatisée ont été réalisées dans des conditions classiques en utilisant le *N,N*'-diisopropylcarbodiimide (DIC, Figure 87) et l'éthyl(hydroxyimino)cyanoacétate (Oxyma pure®, Figure 87). En synthèse manuelle, l'hexafluorophosphate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HBTU) ou le tétrafluoroborate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (TBTU) ont été utilisés comme activateurs et la *N*-méthylmorpholine (NMM) ou la diisopropyléthylamine (DIPEA) comme bases (Figure 87).

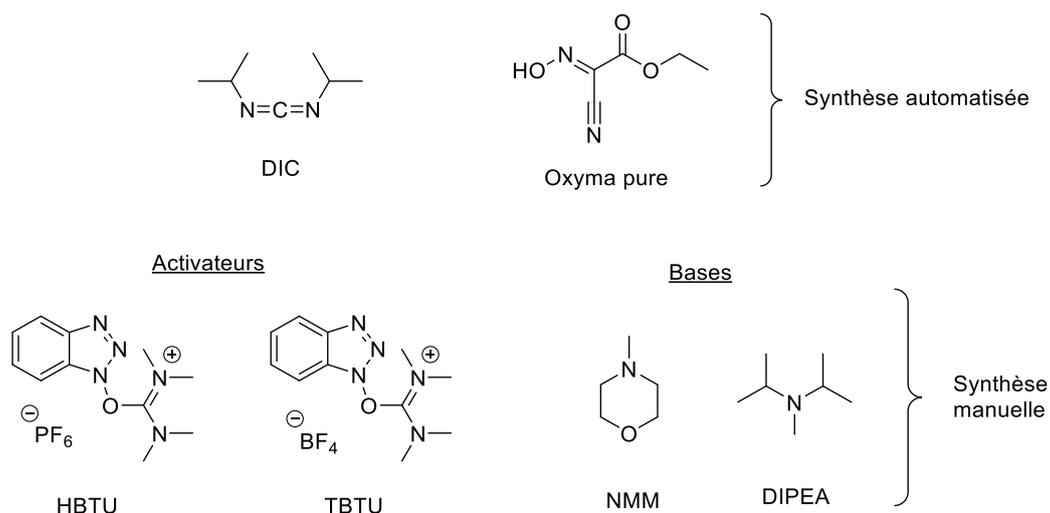


Figure 87 : Structures des agents de couplages utilisés pour la SPPS

Une résine Wang a été utilisée pour obtenir la fonction acide carboxylique C-terminale de la S0 alors que les peptides ont été synthétisés sur une résine Rink Amide dans le cas des autres séries. Toutes les modifications apportées à la séquence peptidique (pégylation, acétylation, couplage de l'acide lipoïque et conjugaison avec NBD ou SRO91) ont été réalisées après élongation de la chaîne et avant le clivage de la résine réalisé par traitement acide avec une solution de TFA. Les différents peptides bruts obtenus ont alors été analysés par chromatographie liquide à ultraperformance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) ou chromatographie liquide à haute performance couplée spectrométrie de masse (HPLC-MS). Les peptides ont ensuite été purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse (RP-HPLC). Les résultats de ces différentes synthèses sont récapitulés dans le Tableau 10.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Nom		Tat	HCV3	HCV6	HCV7
Séquence		YGRKKRRQRRR	VFLVG	YVGDLSGSVFL	SWHINRTALN\$NDS
Série 0	Rendement	38 %	45 %	32 %	32 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 95 %	> 95 %
Série 1	Rendement	15 %	11 %	10 %*	12 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 50 %**	> 95 %
Série 1'	Rendement	40 %	15 %	18 %	16 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 95 %	> 90 %
Série 1''	Rendement	-	-	-	9 %
	Pureté	-	-	-	> 95 %
Série 2	Rendement	14 %	2 %	-	-
	Pureté	> 95 %	> 85 %	-	-
Série 3	Rendement	55%	-	-	12 %
	Pureté	> 95 %	-	-	> 95 %

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des peptides synthétisés (pureté UV et rendement)

\* rendement calculé d'après la masse de produit brut et la pureté

\*\* pureté mesurée d'après le chromatogramme UV de la partie soluble

### 4.1. Synthèse des Séries 0 et 1

Les différents peptides libres de la Série 0 (S0) d'intérêt ont ainsi pu être synthétisés (Schéma 52) avec de bons rendements (entre 30 et 45 %) et une bonne pureté (> 95 %). Il est cependant important de signaler que, du fait de sa forte hydrophobie et sa courte séquence, HCV3 libre n'a pas pu être obtenu. La séquence a donc été pégylée avec un motif TTDS pour obtenir le peptide HCV3-S0 avec un rendement de 45 % et une pureté supérieure à 95 %.

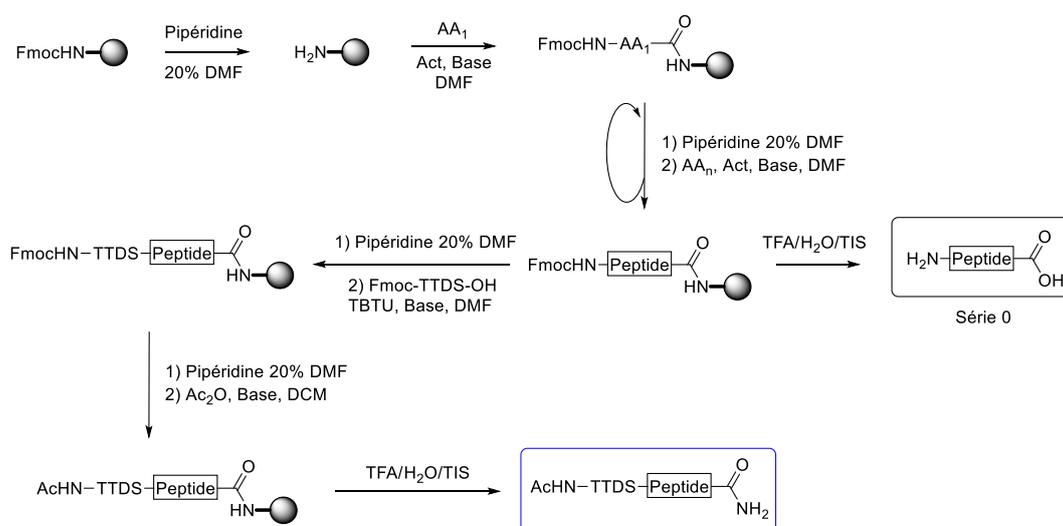


Schéma 52 : Schéma de synthèse des Séries 0 et 1 par SPPS

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La synthèse des peptides de fusion acétylés de la Série 1 (S1) a été réalisée en effectuant une acétylation en fin d'élongation de chaîne et après pégylation, en utilisant de l'anhydride acétique et une base (NMM ou DIPEA, Schéma 52). Cette synthèse s'est également révélée délicate. En effet, si le Tat et HCV7 sont suffisamment solubles pour être purifiés facilement sous leur forme acétylée, ce n'est pas le cas du peptide HCV3 et plus encore du peptide HCV6. En effet, HCV6-S1 forme un gel après clivage final rendant impossible les étapes de lavage précédant la purification par chromatographie. De plus, le peptide brut n'a pas pu être solubilisé dans un mélange eau/acétonitrile (H<sub>2</sub>O/ACN), compliquant ainsi la purification semi-préparative. Néanmoins, une partie solubilisée de HCV6-S1 a pu être analysée par HPLC-MS montrant la présence majoritaire du peptide attendu en solution (Figure 88).

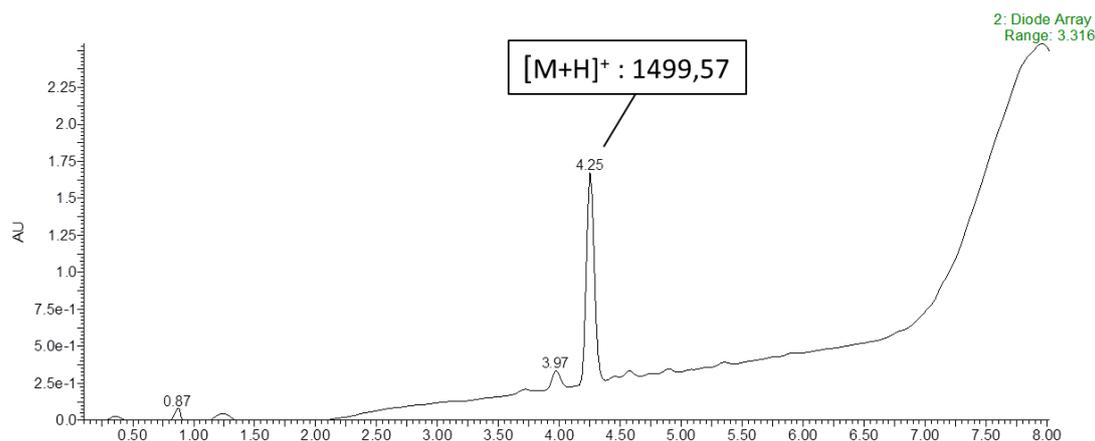


Figure 88 : Chromatogramme UV d'analyse HPLC-MS du peptide HCV6-S1 brut

Diverses tentatives de solubilisation ont alors été menées en utilisant des solvants organiques (MeOH, DMSO), des sels connus pour déstabiliser les interactions entre chaînes peptidiques (chlorure de guanidinium) ou encore différentes valeurs de pH (Tableau 11). Aucune de ces conditions n'a permis de solubiliser complètement le peptide sauf l'utilisation d'ultrasons dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 65/35, ou encore dans un tampon phosphate à pH = 12. Si la solubilisation à pH basique est certainement due à la présence d'un résidu acide aspartique dans la séquence, le recours aux ultrasons pour la solubilisation montre que ce peptide a tendance à s'aggréger.

Condition	Concentration massique en peptides (mg/mL)	Ultrasons	Chauffage (40°C)	Solubilité
H <sub>2</sub> O	0,1	Oui	Oui	Non
H <sub>2</sub> O/ACN 50/50	1	Oui	Non	<b>Oui</b>
H <sub>2</sub> O/ACN 65/35	1	Oui	Non	<b>Oui</b>
H <sub>2</sub> O/MeOH 80/20	0,1	Oui	Oui	Non
H <sub>2</sub> O/DMSO 50/50	1	Oui	Oui	Non
Chlorure de guanidinium 6M	0,3	Oui	Oui	Non
Tampon HEPES pH 7,4	1	Oui	Oui	Non
Tampon PBS pH 8	1	Oui	Non	Non
Tampon PBS pH 7,4	1	Oui	Non	Non
Tampon PBS pH 12	1	Non	Non	<b>Oui</b>

Tableau 11 : Conditions testées pour la solubilisation du peptide HCV6-S1

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La tendance à l'agrégation du peptide et l'utilisation du milieu fortement basique n'étant pas compatibles à la purification par RP-HPLC, HCV6-S1 a été purifié manuellement sur gel de silice en phase inverse, et a été obtenu avec une pureté moyenne de 50 % (calculée d'après le chromatogramme UV) et un rendement de 10 % (calculé d'après la masse de produit brut et la pureté UV). Même si la pureté du peptide obtenu n'est pas satisfaisante, cette technique a permis d'éliminer une partie conséquente des impuretés. En effet, l'analyse HPLC-MS, et notamment les spectres de masse du produit montrent une disparition de nombreux pics de masse ne correspondant pas au peptide attendu (Figure 89).

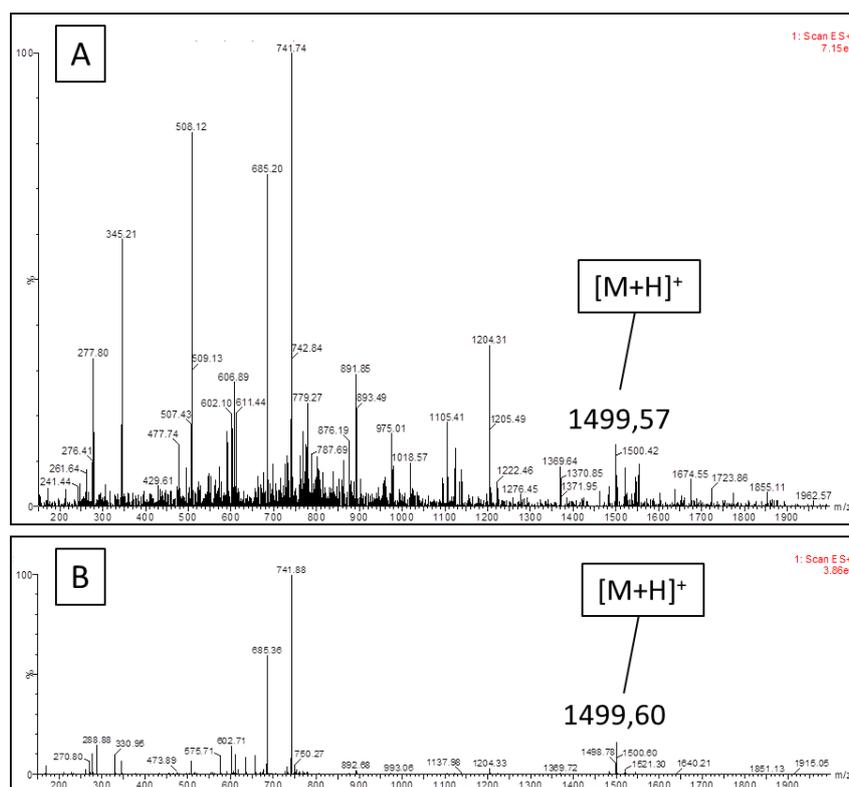


Figure 89 : Spectres de masse du peptide HCV6-S1 avant (A) et après (B) purification manuelle

### 4.2. Synthèse de la Série 2

Les séquences de la série 2 (S2) ont été préparées en introduisant un résidu lysine dont la fonction amine de la chaîne latérale est protégée par un groupement méthyltrityle (Mtt). Ce dernier est déprotégé sélectivement en fin d'élongation de chaîne par plusieurs lavages rapides utilisant une solution de TFA diluée dans le DCM. L'acide lipoïque est alors couplé sur la chaîne latérale en utilisant HBTU ou TBTU comme activateur et la NMM comme base, puis le peptide est clivé de la résine dans des conditions classiques (Schéma 53).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

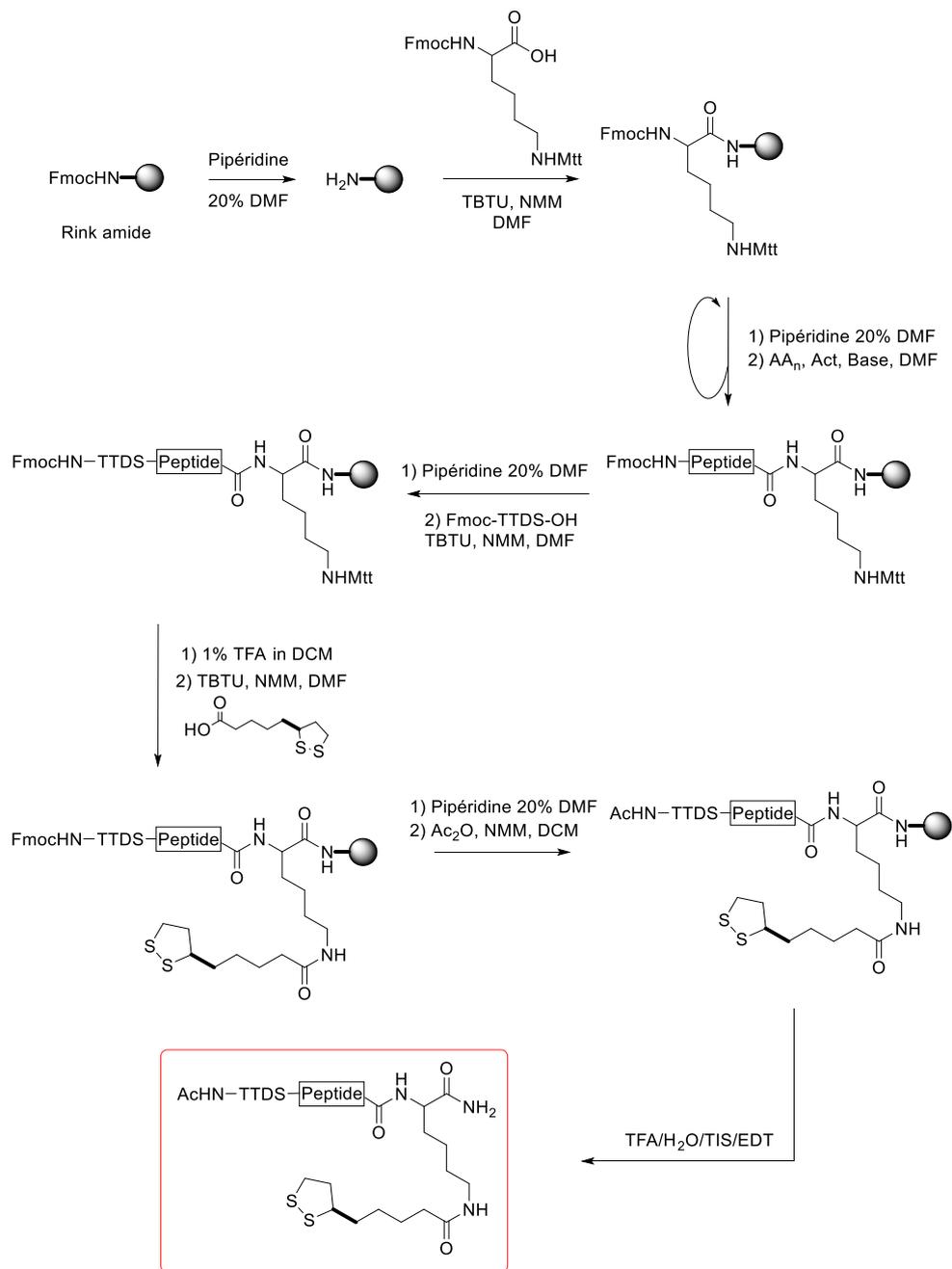


Schéma 53 : Schéma de synthèse des peptides de la Série 2 par SPPS

La synthèse de cette série a également soulevé un certain nombre de difficultés. En effet, les séquences de S2 ont tendance à s'oxyder du fait de la présence de l'acide lipoïque. Ainsi, lors de la synthèse de Tat-S2, le clivage par une solution d'acide trifluoroacétique, eau et triisopropylsilane (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 97/2/1 (v/v/v)) a donné un mélange entre le produit attendu et des produits de suroxydation correspondant aux masses M+16 et M+32 (Figure 90). En revanche, le clivage utilisant une solution contenant un agent réducteur, l'éthanedithiol (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT 95/1/2/2 (v/v/v/v)), a donné le peptide attendu majoritairement, en mélange avec les produits de suroxydation, mais également un produit de réduction du dithiolane présent dans l'acide lipoïque, correspondant à la masse M+2. L'utilisation de ce deuxième cocktail de clivage et une purification par RP-HPLC a permis d'obtenir le peptide avec une excellente pureté (supérieure à 95 %) et un rendement correct (14 %).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

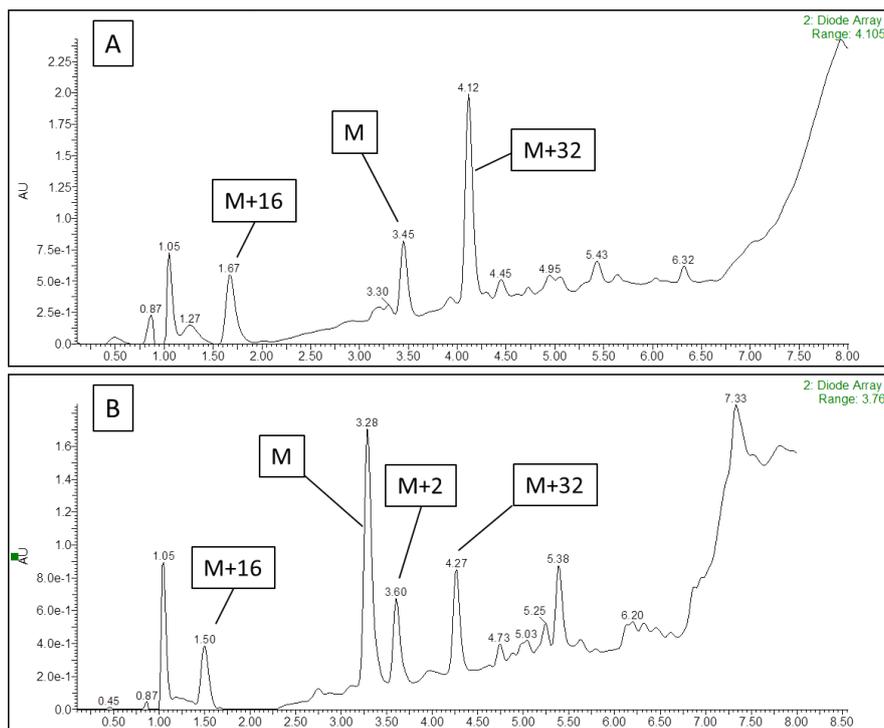


Figure 90 : Chromatogramme UV de TAT-S2 brut après clivage sans EDT (A) et avec EDT (B)  
M correspond à la masse du peptide attendu.

De même, lors de la synthèse de HCV3-S2, une analyse HPLC-MS après clivage du peptide par une solution TFA/TIS/H<sub>2</sub>O, a confirmé la présence du peptide attendu sous deux formes : la forme dithiolane ( $[M+H]^+ = 1193,48$  Da) et la forme réduite dithiol ( $[M+H]^+ = 1195,48$  Da). Le peptide a alors été ré-oxydé à l'air pendant 1h30 ne donnant que la forme dithiolane (Schéma 54).

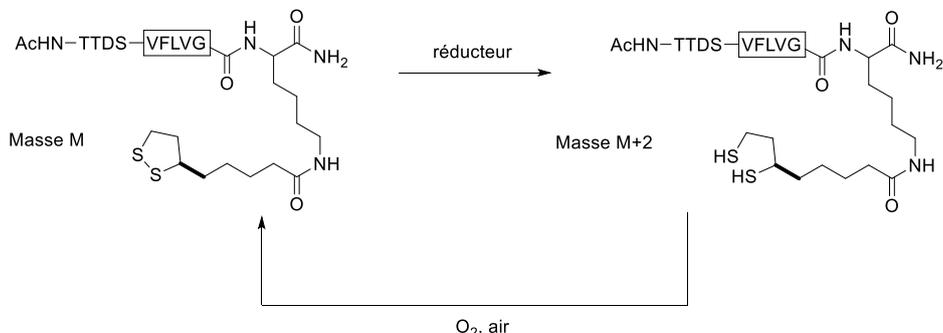


Schéma 54 : Formes dithiolane (gauche) et dithiol réduite (droite) obtenues après synthèse

Néanmoins, comme HCV6-S1, la séquence HCV3-S2 s'est révélée peu soluble dans des mélanges ACN/H<sub>2</sub>O. Une purification manuelle sur gel de silice en phase normale a tout de même permis d'obtenir le peptide avec une pureté correcte (supérieure à 85 %) mais un rendement très faible (2 %). Devant les difficultés de synthèse rencontrées, notamment la pureté de HCV3-S2 et son faible rendement, les peptides HCV6 et HCV7 n'ont pas été synthétisés en série 2 et les analyses d'ondes acoustiques de surface n'ont pas été réalisées.

### 4.3. Synthèse de la Série 3

Les peptides de la Série 3 (S3), conjugués avec le nucléoside SRO91, ont été obtenus en réalisant un couplage avec le composé **8** préalablement synthétisé. La fonction amine du motif TTDS est alors

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

mise en réaction avec la fonction acide carboxylique du composé **8** en présence de TBTU et NMM dans le DMF (Schéma 55). La déprotection finale par une solution acide de TFA permet non seulement de cliver les groupements protecteurs permanents ainsi que l'isopropylidène du nucléoside, mais également de séparer le peptide de la résine.

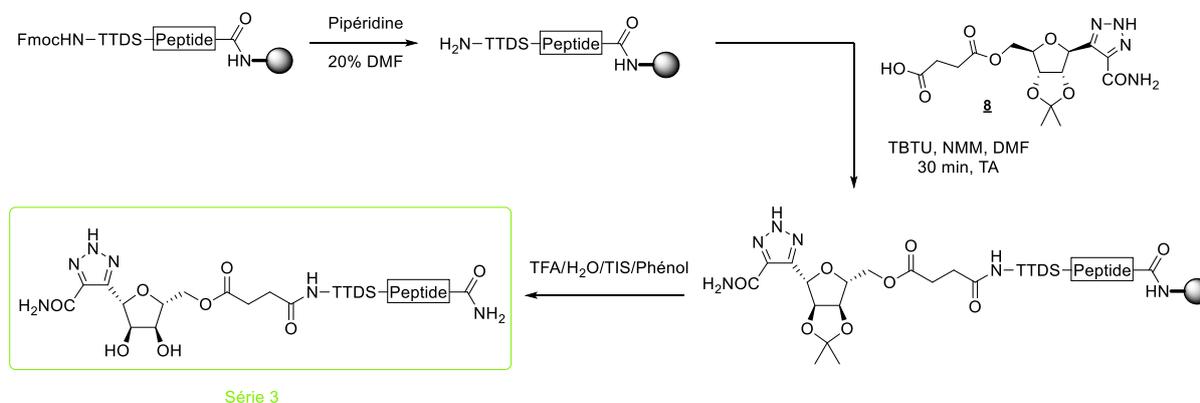


Schéma 55 : Schéma de synthèse des peptides de la Série 3 par SPPS

Compte tenu des problèmes rencontrés lors des synthèses, les séquences les plus hydrophobes (HCV3 et HCV6) n'ont pas été conjuguées au nucléoside du fait de leur faible solubilité. Ainsi seuls les conjugués TAT-S3 et HCV7-S3 ont été obtenus avec des puretés supérieures à 95 % et un rendement de 55 et 12 % respectivement.

### 4.4. Synthèse des Séries 1' et 1''

La conjugaison avec le fluorophore NBD devait initialement s'effectuer sur l'amine du motif TTDS des différentes séquences peptidiques. Pour cela, le peptide supporté est déprotégé par la pipéridine dans le DMF, puis mis en réaction avec le 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) en présence de base pendant une nuit (Schéma 56). Les peptides Tat-S1' et HCV7-S1' ont ainsi été synthétisés avec une pureté supérieure à 90 % et un rendement de 40 et 16 % respectivement.

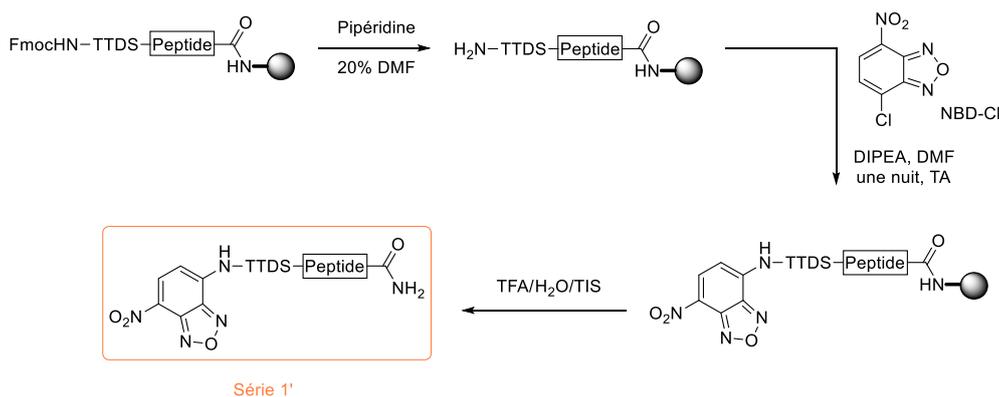


Schéma 56 : Première stratégie de synthèse des séquences de la Série 1' par SPPS

Néanmoins, au vu des difficultés rencontrées lors des synthèses impliquant les séquences HCV3 et HCV6 du fait de leur faible solubilité, ces dernières ont été fonctionnalisées par un résidu lysine à la suite du motif TTDS ; dont la fonction amine de la chaîne latérale sera conjuguée au fluorophore. De cette manière, la fonction amine de cet acide aminé restera libre et devrait apporter une meilleure solubilité en milieu aqueux. Pour la même raison, les synthèses de HCV3-S1' et HCV6-S1' ont été

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

réalisées sur une résine Wang, de manière à obtenir une fonction acide en position C-terminale, apportant plus de solubilité qu'une fonction amide. Pour réaliser cette conjugaison, le groupement protecteur du N<sup>e</sup> du résidu lysine devait être orthogonal au groupement Fmoc du N<sup>α</sup> et des autres groupements permanents. Nous avons choisi d'utiliser le groupement 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle (Dde) puisque ce dernier peut être déprotégé sélectivement par rapport au groupement Fmoc en utilisant une solution de chlorure d'hydroxylammonium et d'imidazole (Schéma 57).<sup>205</sup>

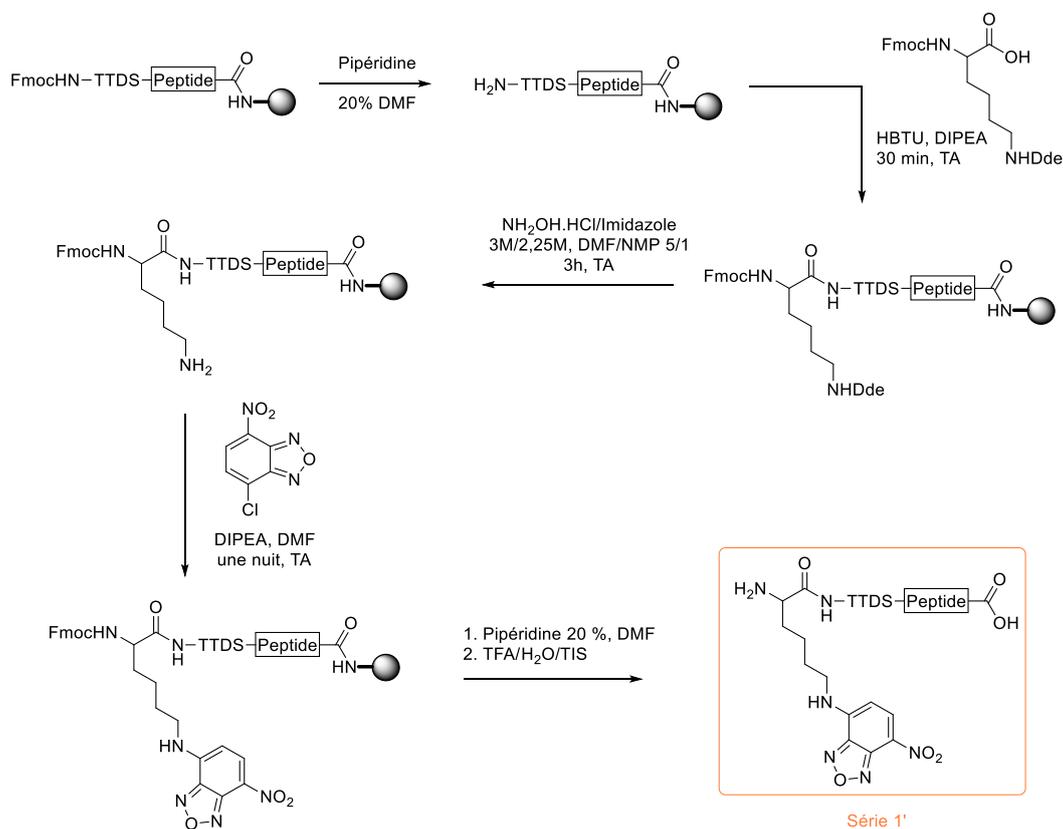


Schéma 57 : Deuxième stratégie de synthèse des peptides de la Série 1' par SPPS

La déprotection du groupement Dde en utilisant une solution NH<sub>2</sub>OH.HCl/imidazole (3M/2,25M) dans un mélange DMF/NMP (5/1) à température ambiante pendant 3h a ainsi permis, après déprotection finale, d'obtenir les peptides HCV3-S1' et HCV6-S1' avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement de 15 et 18 % respectivement.

Par la suite, les analyses par spectrofluorescence ont montré, notamment sur le peptide Tat, que le motif TTDS fausse les résultats d'internalisation dans des liposomes, voire gêne l'interaction peptide/membrane (*cf* Chapitre IV). Il a alors été décidé de synthétiser ces conjugués sans l'espaceur TTDS. Etant donné l'hydrophobie importante des séquences étudiées, le fluorophore a été couplé sur une chaîne latérale d'un résidu lysine introduit en position N-terminale. A nouveau, la présence d'une fonction amine libre devrait pallier la perte du motif oligoglycol pour des raisons de solubilité. Néanmoins, du fait des difficultés de synthèse et de purification rencontrées avec HCV3 et HCV6, cette nouvelle structure (Série 1'', S1'') n'a été appliquée qu'à HCV7. Le conjugué HCV7-S1'' a ainsi été synthétisé en utilisant une lysine dont la chaîne latérale est protégée par un groupement Dde, et les

<sup>205</sup> Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. *Org. Lett.* **2004**, *7*, 1127–1129.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

conditions décrites précédemment, avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement de 9 % (Figure 91).

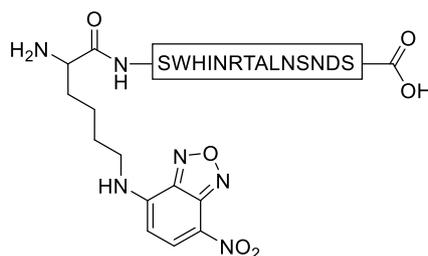


Figure 91: Structure du peptide HCV7-S1''

### 5. Conclusion sur la synthèse des peptides de fusion du VHC

Ainsi, les différentes séquences étudiées (Tat, HCV3, HCV6 et HCV7) ont pu être synthétisées et fonctionnalisées par différents motifs. Si les séquences libres (Série 0) n'ont pas soulevé de problèmes majeurs, la présence d'un groupement acétyle en position *N*-terminal et une fonction amide en *C*-terminal de la Série 1 diminue grandement la solubilité de ces séquences hydrophobes. Les études d'interaction avec les liposomes (calorimétrie, spectrofluorescence et microscopie) s'effectuant dans un tampon aqueux, les peptides de la Série 1 ne pourront pas être utilisés à des concentrations suffisantes pour permettre une analyse pertinente.

La synthèse des peptides de la Série 2 s'est également révélée délicate du fait de problèmes de suroxydation des produits, mais aussi de solubilité. De fait, les peptides HCV6-S2 et HCV7-S2 n'ont pas été synthétisés et les analyses d'ondes acoustiques de surface (SAW) ne seront pas réalisées.

La conjugaison avec le nucléoside SRO91 s'est révélée efficace. Néanmoins, compte tenu des difficultés rencontrées lors des autres synthèses, seules les séquences les plus solubles ont été conjuguées (Tat et HCV7). Les peptides Tat-S3 et HCV7-S3 ainsi obtenus devront être testés pour leur activité anti-VHC.

Enfin, si les séquences Tat et HCV7 relativement solubles ont été conjuguées au fluorophore NBD par simple couplage en position *N*-terminale, les séquences HCV3 et HCV6 ont nécessité la fonctionnalisation de la chaîne latérale d'un résidu Lys introduit en position *N*-terminale. Les analyses par spectrofluorescence montrant que le motif TTDS introduit pour apporter de la solubilité n'était pas pertinent, une nouvelle structure du peptide HCV7 (HCV7-S1'') a été préparée afin de réaliser des essais d'internalisation sur des liposomes comme modèles de membranes cellulaires.



## **Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane**



## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

### Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Afin de caractériser l'interaction entre les séquences HCV3, HCV6 et HCV7 sélectionnées et des membranes, différentes analyses ont été envisagées, toutes utilisant des liposomes de différentes compositions comme modèles. Des études de calorimétrie permettront ainsi de vérifier l'existence d'une telle interaction et d'essayer de la quantifier. De plus, la spectrofluorimétrie et la microscopie à épifluorescence permettront d'étudier le comportement des peptides au contact des membranes et éventuellement d'émettre une hypothèse quant à leur mécanisme d'action. Cette étude permettra ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de ces peptides, assez peu étudiés dans la littérature, et de vérifier leur potentielle utilisation en tant qu'agents de pénétration cellulaire dans une stratégie de vectorisation.

Afin d'étudier l'interaction de la séquence « seule » avec la membrane, nous avons décidé de n'utiliser que les peptides de la Série 0 en calorimétrie et ceux des Séries 1' et 1'' dans les études de spectrofluorescence et microscopie à épifluorescence (Figure 92).

Peptide	Séquence
HCV3	VFLVG
HCV6	YVGDLGSGVFL
HCV7	SWHINRTALNSNDS
Tat	YGRKKRRQRRR

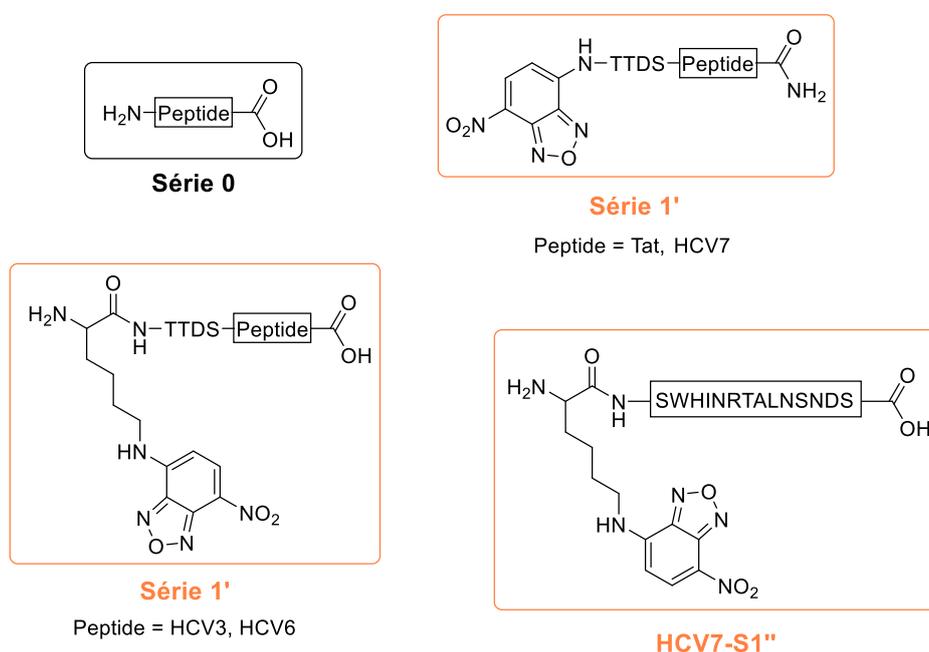


Figure 92 : Séquences et structures utilisées pour les études d'interactions peptide/membrane

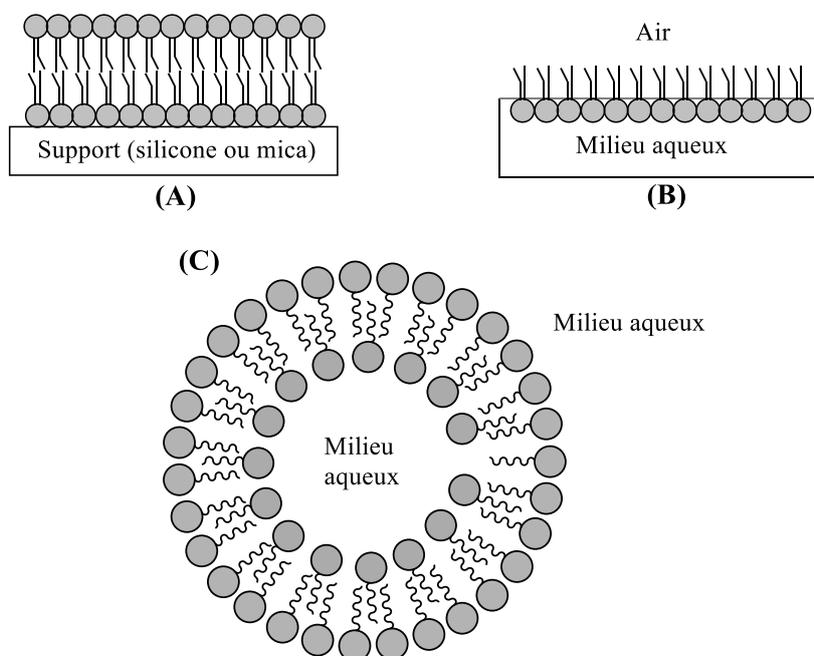
#### 1. Liposomes comme modèles de membrane cellulaire

Comme expliqué précédemment (*cf* chapitre II), la membrane biologique est un système complexe, composé de divers éléments tels que des lipides, des protéines et des oligosaccharides. Outre sa composition, la complexité de la membrane biologique provient aussi de sa structure et des

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

phénomènes dynamiques qu'elle subit. En 1972, Singer et Nicholson ont ainsi proposé le modèle de « mosaïque fluide » pour décrire la structure membranaire.<sup>206</sup> Ce modèle est basé sur l'hypothèse selon laquelle les lipides et les protéines composant la membrane cellulaire, diffusent librement dans celle-ci. La diversité de la structure membranaire et le comportement dynamique de ses constituants rend l'étude biophysique de ses interactions avec différents composés, agents thérapeutiques ou vecteurs, difficile à appréhender. De fait, plusieurs membranes artificielles, ont été développées comme modèles de membranes cellulaires, particulièrement les modèles utilisant des lipides. En effet, les lipides sont des molécules amphiphiles capables, en milieu aqueux, de s'auto-assembler grâce à des liaisons hydrophobes, de manière à mettre en interaction leur chaînes grasses. Les structures ainsi formées, appelées bicouches lipidiques, peuvent être assimilées à un modèle simplifié de la membrane cellulaire. Quoique leur composition soit moins diverse (principalement des glycérophospholipides), les propriétés dynamiques y sont conservées. Les bicouches lipidiques ont ainsi été utilisées afin de modéliser l'interaction de certains composés thérapeutiques ou vecteurs avec une membrane en termes d'activité, de toxicité ou encore de mécanisme de pénétration cellulaire.<sup>207</sup>

On distingue trois principaux types de modèles de membranes cellulaires : les bicouches lipidiques supportées, les monocouches lipidiques et les liposomes (Figure 93).



**Figure 93 : Différents modèles lipidiques de membrane cellulaire**  
(A) Bicouche lipidique supportée ; (B) monocouche lipidique ; (C) liposomes.

Les liposomes sont des vésicules composées d'une bicouche lipidique séparant deux milieux aqueux et constituent un très bon modèle de membrane biologique. En effet, outre la composition lipidique et les propriétés dynamiques de la membrane, la courbure de cette dernière peut être importante pour divers phénomènes comme l'interaction avec les lipides ou l'internalisation.

Diverses propriétés caractérisent la bicouche lipidique des liposomes. En effet, selon sa composition, la membrane peut présenter des interactions fortes entre les chaînes grasses, donnant un caractère ordonné et rigide à l'empilement de lipides (état solide ordonné  $S_o$  ou  $L_\beta$ , « phase gel »). A l'inverse,

<sup>206</sup> Singer, S. J.; Nicholson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720–731.

<sup>207</sup> Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1264–1276.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

certaines composés comme le cholestérol, déstabilisent les interactions entre les chaînes grasses et permettent ainsi plus de mouvements dans la membrane (état liquide désordonné  $L_d/L_\alpha$  ou ordonné  $L_o$ , « phase fluide »). Une même membrane peut également exister sous plusieurs phases selon la température. Ainsi, à basse température la membrane existe à l'état gel  $S_o$ , où l'empilement des lipides est très ordonné et ces derniers présentent très peu de mouvements. Avec l'augmentation de la température, les interactions entre les lipides composant la bicouche s'affaiblissent et la membrane adopte un état fluide  $L_d$ , beaucoup plus sujet aux mouvements des lipides. Le passage d'une phase à l'autre s'effectue à une température particulière, dépendante des différents constituants de la membrane (phospholipides, Chol, SM), appelée température de transition de phase  $T_m$ . A une température proche de la  $T_m$ , les lipides adoptent, au sein d'une même membrane, des comportements différents avec des domaines en phase gel et des domaines en phase fluide (Figure 94).<sup>141,208</sup> La séparation de ces deux domaines constitue un défaut de phase, particulièrement important pour la pénétration de certains composés ou la fusion membranaire.

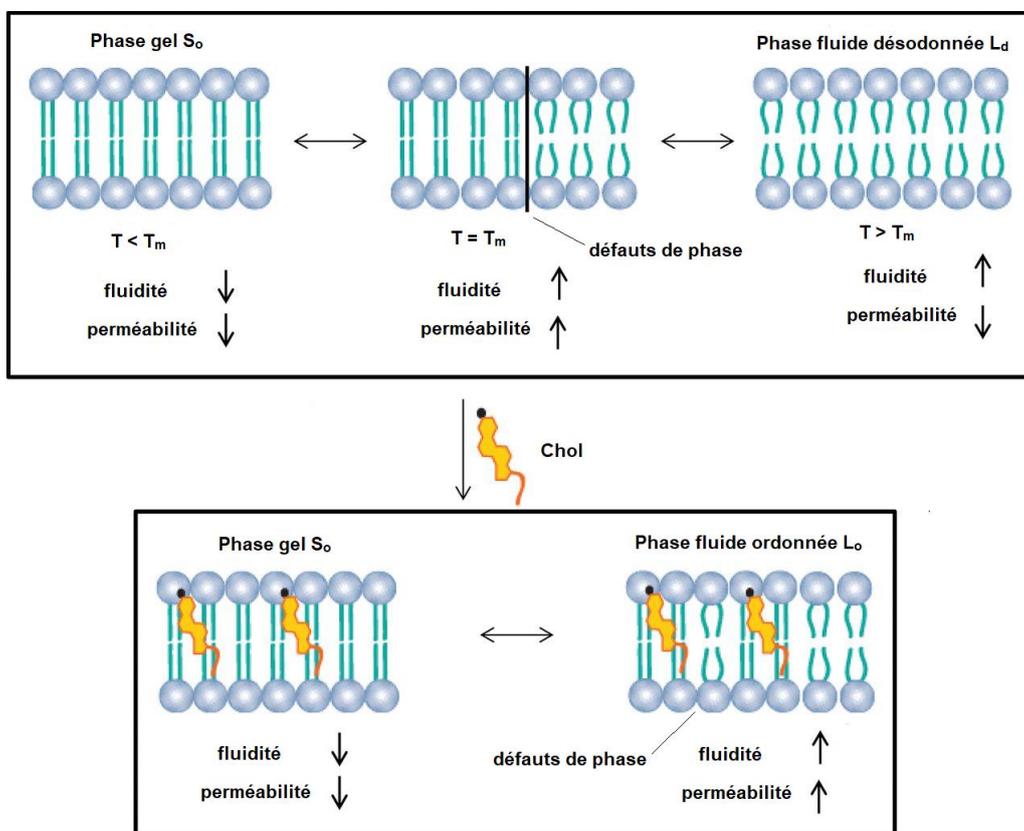


Figure 94 : Différentes phase et transitions d'une bicouche lipidique<sup>208</sup>

Certains phospholipides permettent à la membrane d'exister sous une autre phase, appelée phase « ondulée » ou *ripple-phase*,  $P_\beta$ . Dans cet état, la courbure de la membrane est alternée, lui conférant un caractère ondulé. Comme pour une température proche de la  $T_m$ , la bicouche lipidique présente alors à la fois des domaines où les lipides adoptent un comportement gel et des domaines fluides, la frontière entre ces domaines formant des défauts de phase. Le passage de la phase gel à la *ripple-phase* est défini par la température de pré-transition de phase,  $T_{pre}$ .

Comme expliqué précédemment, ces différentes phases et les transitions de l'une à l'autre dépendent des interactions entre les lipides constitutifs de la membrane, plus précisément entre leurs chaînes

<sup>208</sup> Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R. L.; Neves, N. M. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140459.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

grasses qui définissent l'empilement lipidique. Chaque lipide, selon la nature de ses chaînes grasses (insaturations et nombre de carbones) et de ses têtes hydrophiles, est impliqué dans des interactions plus ou moins fortes et donc une température de transition  $T_m$  plus ou moins importante.

Outre les propriétés physiques de leur membrane, les liposomes diffèrent également selon leur lamellarité (nombre de bicouches lipidiques) et leur taille, paramètres qui dépendent généralement de leur méthode de préparation.<sup>209</sup> On distingue ainsi les vésicules unilamellaires (ULVs pour *unilamellar vesicles*) constituées d'une unique bicouche lipidique, les vésicules multilamellaires (MLVs pour *multilamellar vesicles*) présentant plusieurs bicouches lipidiques concentriques, et les vésicules multivésiculaires (MVVs pour *multivesicular vesicles*) où plusieurs vésicules sont imbriquées les unes dans les autres (Figure 95). Au sein des ULVs, on distingue également plusieurs types de vésicule selon leur taille : les vésicules unilamellaires géantes (GUVs pour *giant unilamellar vesicles*) mesurant plus de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, les vésicules unilamellaires larges (LUVs pour *large unilamellar vesicles*) avec un diamètre entre 100 et 200 nm, et les petites vésicules unilamellaires (SUVs pour *small unilamellar vesicles*) de taille inférieure à 50 nm.

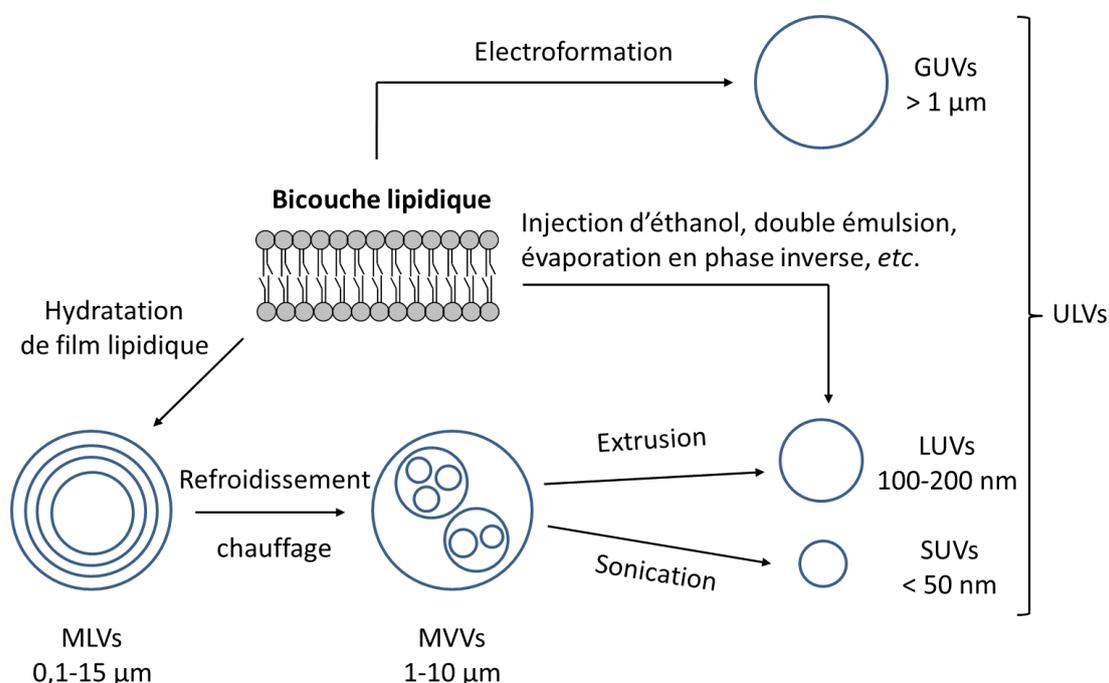


Figure 95 : Différents types de liposomes et leur méthode de préparation

Ces différents types de liposomes sont préparés par diverses méthodes. Les GUVs sont ainsi préparées par hydratation puis électroformation à partir d'un film lipidique. D'autres techniques, notamment l'injection d'éthanol ou l'évaporation des lipides en phase inverse permettent d'obtenir des LUVs à partir de lipides en solution. Néanmoins, la méthode généralement employée pour l'obtention de liposomes consiste à préparer une solution de MLVs par hydratation d'un film lipidique à une température supérieure à la  $T_m$ , éventuellement suivie d'une autre transformation. L'extrusion de ces solutions hétérogènes à travers des membranes de 100 ou 200 nm permet ainsi d'obtenir des LUVs alors que l'utilisation de la sonication permet d'accéder à des vésicules plus petites, les SUVs.<sup>209</sup>

<sup>209</sup> Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, 1 (2), 147–168.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Pour des raisons de stabilité des vésicules, nous avons décidé d'utiliser des MLVs et des LUVs comme modèles de membrane. Les interactions entre les peptides des séries 0 et 1' et des liposomes ont ainsi été étudiées par différentes méthodes : des analyses en calorimétrie afin de les mettre en évidence, de les caractériser et de les quantifier, ainsi que des analyses par spectrofluorescence pour déterminer le comportement de ces séquences au contact de la membrane (internalisation et fusion).

Dans cette étude, les lipides utilisés étaient ainsi principalement des dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) et dioléoylphosphatidylglycérol (DOPG), correspondant à une basse température de transition pour étudier le comportement de la membrane en phase fluide, ou des dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) dont la transition s'effectue autour de la température ambiante, pour étudier le comportement des membranes à la  $T_m$  (Figure 96).

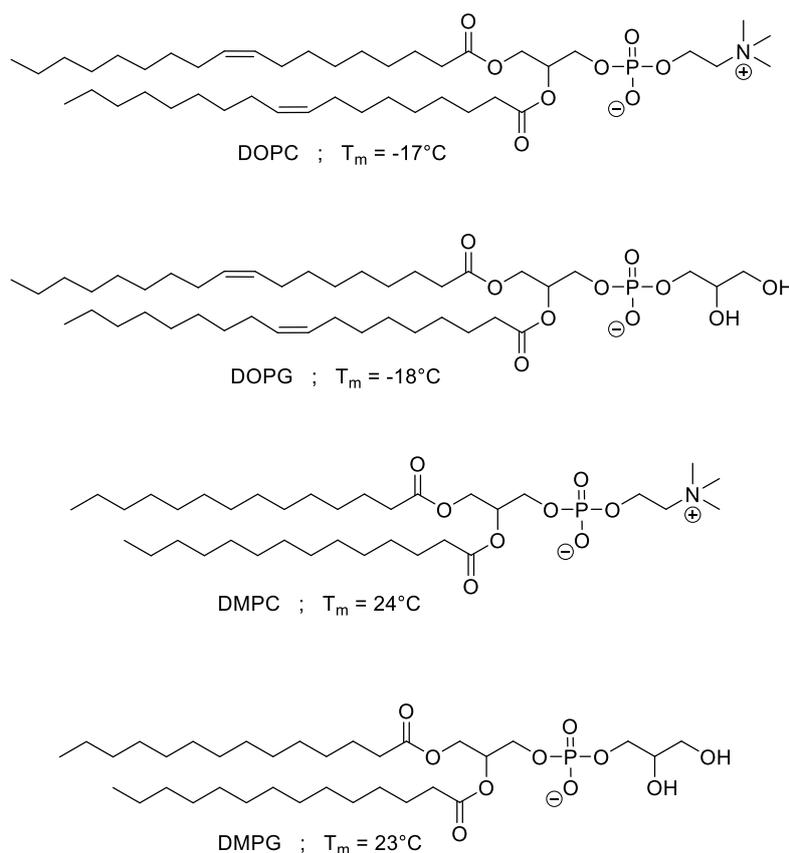


Figure 96 : Structure des différents lipides utilisés dans l'étude de l'interaction peptide/membrane

Enfin, pour permettre une visualisation du comportement des peptides, les séquences conjuguées au fluorophore NBD (S1') ont été étudiées par microscopie à épifluorescence avec des MLVs et des cellules épithéliales.

## 2. Analyse par calorimétrie

### 2.1. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour *differential scanning calorimetry*) est une technique de calorimétrie permettant de mesurer les paramètres thermodynamiques (température et enthalpie) de certaines transformations. Cette technique est généralement utilisée pour caractériser les changements d'état de certains matériaux (fusion, cristallisation, transition vitreuse). Pour cela, le calorimètre mesure les différences des échanges de chaleur (flux thermique) lors d'un balayage en

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

température, entre une cellule d'analyse contenant le composé d'intérêt et une cellule de référence (Figure 97).

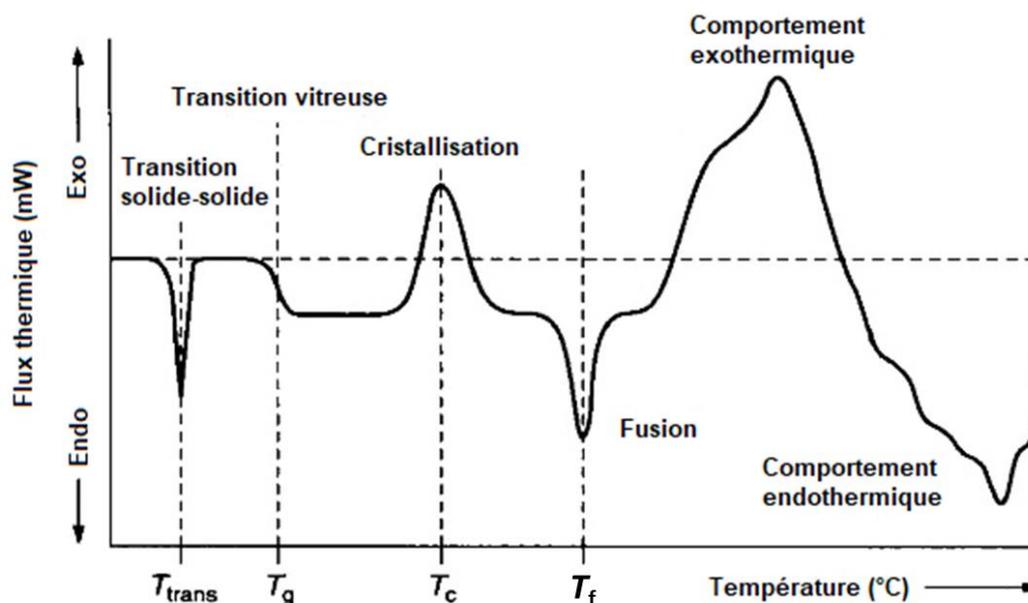


Figure 97 : Thermogramme présentant les différentes transitions observable par DSC lors d'un cycle de chauffage

Comme expliqué précédemment, les phospholipides s'auto-assemblent en milieu aqueux pour former des vésicules constituées d'une bicouche lipidique. Cette membrane peut exister sous deux formes : une phase « gel », très ordonnée, où les lipides interagissent fortement entre eux et subissent très peu de mouvement et une phase « fluide » à plus haute température. La transition entre la phase gel et la phase fluide est une transformation endothermique et s'effectue à une température appelée la température de transition  $T_m$ . Comme tout changement d'état, cette transition peut être visualisée par DSC lors d'un balayage en température. Lors de l'ajout de peptide à la solution de liposomes, l'interaction peptide/lipide va potentiellement modifier les propriétés de la membrane et donc la température de transition.

Cette technique a ainsi été utilisée pour mettre en évidence des interactions peptide/lipide dans plusieurs études.<sup>162,210,211</sup> Dans le cas des peptides de fusion du VHC, nous avons choisi de travailler avec des lipides DMPC et DMPG. En effet, même si les chaînes grasses dimyristoyles (DM) sont peu représentées dans la membrane cellulaire comparées aux chaînes dioleoyles (DO) ou palmitoyloleoyles (PO), les lipides DMPC et DMPG ont une température de transition proche de la température ambiante (24 et 23°C respectivement). L'analyse s'effectuant en solution aqueuse, l'utilisation de chaînes DO ou PO est délicate puisque l'eau subit un changement d'état (cristallisation) à leur température de transition (autour de -18 et -2°C respectivement) gênant la visualisation de la température  $T_m$ . Enfin, si les lipides PC sont les constituants majeurs de la membrane cellulaire eucaryote, les lipides anioniques comme PS et plus particulièrement PG sont peu présents. Leur utilisation permet néanmoins de modéliser la présence d'éléments anioniques sur la membrane.

<sup>210</sup> Davies, S. M.; Epand, R. F.; Bradshaw, J. P.; Epand, R. M. *Biochemistry* **1998**, 37 (16), 5720–5729.

<sup>211</sup> Joanne, P.; Galanth, C.; Goasdoué, N.; Nicolas, P.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; El Amri, C.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, 1788 (9), 1772–1781.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

### 2.2. Résultats des analyses DSC

Afin de caractériser uniquement l'interaction peptide/lipide, seules les séquences de la Série 0 ont été testées. Pour cela, différentes solutions de MLVs (DMPC ou DMPG) ont été soumises à des cycles de refroidissement et de chauffage entre 40 et 5°C. Ces analyses ont été effectuées en utilisant la même concentration en lipides mais des concentrations en peptides différentes de manière à étudier des ratios peptides/lipides (P/L) de plus en plus importants.

Le peptide Tat-S0, utilisé comme référence dans cette étude, est connu pour ses interactions fortes avec les lipides anioniques.<sup>170,212,213,214</sup> Les différents thermogrammes obtenus avec des MLVs de DMPG lors des phases de refroidissement (Figure 98) montrent une diminution de la température de transition dès le ratio P/L de 1/25. Cette diminution montre non seulement l'existence d'une interaction peptide/lipide mais également que le peptide Tat a tendance à « fluidifier » la membrane puisqu'il est nécessaire de lui fournir moins d'énergie pour passer d'un état gel à un état fluide.

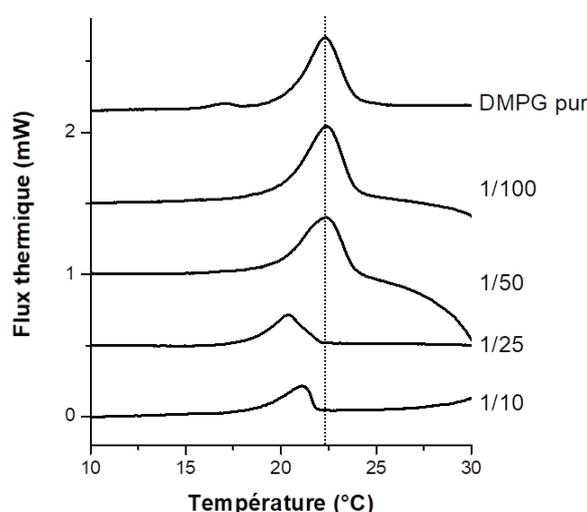


Figure 98 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction Tat-S0/DMPG par DSC en phase de refroidissement

Par comparaison, le peptide HCV3-S0 s'est montré moins actif sur les lipides anioniques DMPG. En effet, il a été nécessaire d'atteindre un ratio P/L de 1/5 pour observer une modification de la T<sub>m</sub> (Figure 99) avec une augmentation à 24,5°C. Comme précédemment, cette augmentation rend compte d'une modification des propriétés de la membrane sous la forme d'une « rigidification » puisqu'il est nécessaire de fournir plus d'énergie pour passer d'un état gel à un état fluide. On observe également une forte diminution du signal pour les ratios P/L 1/5 et 1/1. Si un précipité est apparu pour le ratio 1/1 et explique cette diminution, ce n'est pas le cas du ratio 1/5. Cette observation rend compte de la capacité du peptide à perturber les interactions entre les chaînes grasses des phospholipides et à modifier leur empilement. Compte tenu de la nature de HCV3-S0, comportant une séquence peptidique très hydrophobe et un motif TTDS très hydrophile, l'hypothèse d'un comportement type détergent pourrait expliquer ce phénomène puisque la quantité de lipides subissant la transition de phase, diminue lors de la décomposition de la membrane.

<sup>212</sup> Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 103–116.

<sup>213</sup> Ziegler, A.; Blatter, X. L.; Seelig, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9185–9194.

<sup>214</sup> Piantavigna, S.; McCubbin, G. A.; Boehnke, S.; Graham, B.; Spiccia, L.; Martin, L. L. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808* (7), 1811–1817.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

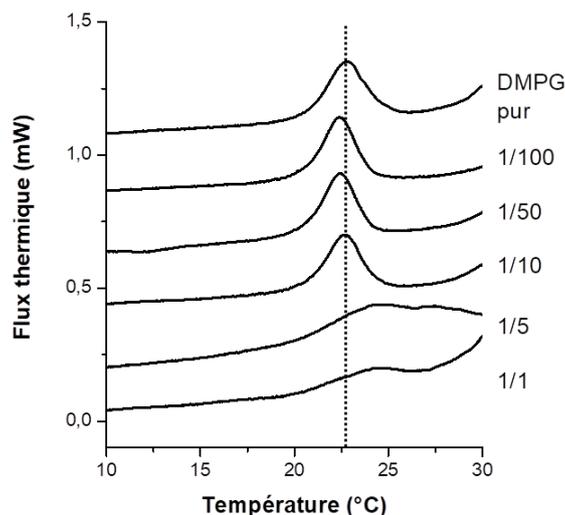


Figure 99 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction HCV3-S0/DMPG par DSC en phase de refroidissement

Le peptide HCV6-S0 a été difficile à étudier puisque sa faible solubilité a nécessité l'utilisation de solutions contenant 5 % de DMSO pour atteindre les concentrations permettant les analyses à hauts ratios P/L. Dans ces conditions, le peptide a montré une activité inattendue sur les lipides anioniques DMPG (Figure 100A) en raison de la présence d'un résidu acide aspartique lui conférant une charge négative à pH 7,4, pH de l'analyse. Une augmentation de la  $T_m$  a tout de même été observée dès le ratio 1/50 (24,6°C) avec également l'apparition d'un autre changement d'état à 26,7°C. Ces modifications de la membrane pouvant également provenir de la présence de DMSO dans la solution, le ratio 1/50 a également été testé sans DMSO (Figure 100B).

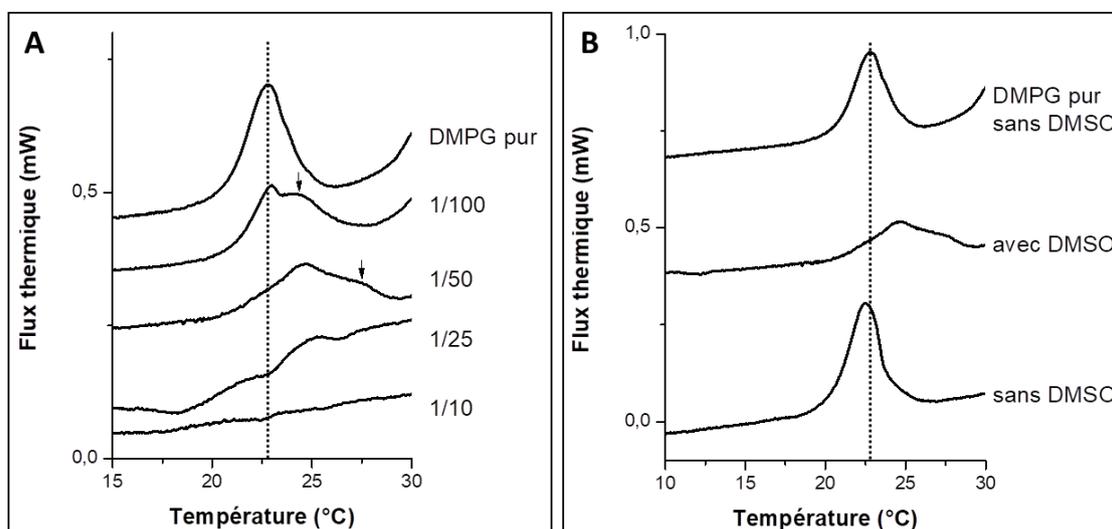


Figure 100 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction HCV6-S0/DMPG par DSC avec 5 % DMSO (A) et du ratio 1/50 sans DMSO (B) en phase de refroidissement  
Les flèches correspondent à l'apparition du deuxième changement d'état

Le thermogramme ainsi obtenu montre une seule transition beaucoup plus nette, avec une température très proche de celle des MLVs seules. Ce résultat montre donc que la modification de la membrane observée précédemment, provient du DMSO ou d'une action conjointe avec le peptide. Dans les conditions testées, il n'est donc pas possible de caractériser l'interaction HCV6-S0/DMPG puisque le peptide ne présente pas une solubilité suffisante pour atteindre un ratio 1/25 sans DMSO.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Le peptide HCV7-S0, quant à lui, s'est révélé capable d'interagir avec les lipides anioniques DMPG. En effet, les thermogrammes (Figure 101A) montrent une diminution de la température de transition jusqu'à 20°C pour un ratio P/L de 1/25 et 18,2°C pour 1/10. HCV7-S0 est donc capable d'interagir avec les lipides anioniques DMPG, certainement du fait de la présence d'un résidu arginine, cationique à pH 7,4. Comme pour Tat-S0, la diminution de la  $T_m$  rend compte d'une certaine fluidification de la membrane. Cette diminution étant plus marquée que pour Tat-S0, on peut raisonnablement penser que l'influence de HCV7-S0 sur les interactions lipide/lipide responsables de la fluidité de la membrane, est plus prononcée. De plus, on observe également la présence d'une seconde température de transition correspondant à la  $T_m$  des liposomes de DMPG seuls. Ce résultat laisse supposer que le peptide n'interagirait pas uniformément sur la membrane mais s'agrègerait de manière à former des domaines particuliers dans la bicouche lipidique, à la manière des « radeaux lipidiques ».

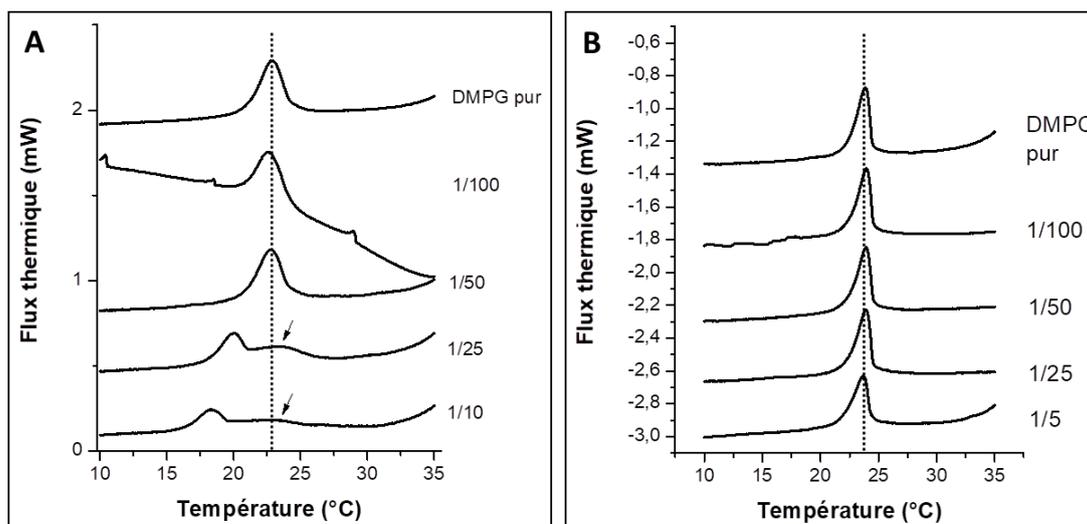


Figure 101 : Thermogrammes d'analyse DSC de l'interaction HCV7-S0/DMPG (A) et HCV7-S0/DMPC (B) en phase de refroidissement

Les flèches correspondent à l'apparition du deuxième changement d'état correspondant à la  $T_m$  des vésicules de DMPG seules

Des analyses ont également été effectuées avec les lipides zwitterioniques DMPC. Néanmoins, face aux problèmes de solubilité rencontrés avec les peptides HCV3-S0 et HCV6-S0, ces analyses n'ont été effectuées qu'avec la séquence HCV7-S0. Étonnamment, les thermogrammes montrent que le peptide n'a aucune influence sur les propriétés de la membrane, même à un ratio 1/5 et malgré le caractère très hydrophobe de cette séquence (Figure 101B). Il est tout de même important de souligner que ce résultat n'infirme pas l'existence d'une interaction HCV7-S0/DMPC, mais indique simplement que si cette interaction existe, elle ne modifie pas les propriétés de la membrane de manière significative.

Le peptide HCV7-S0 semble donc interagir préférentiellement sur les lipides anioniques DMPG, probablement à cause du résidu arginine présent dans la séquence. Afin de se rapprocher d'une composition lipidique moins riche en lipides anioniques, plus biologiquement pertinente, l'interaction de HCV7-S0 a été caractérisée avec des liposomes de composition DMPC/DMPG 9/1. Cette analyse a mené à la même conclusion, à savoir que le peptide n'a pas d'influence visible sur le comportement de ce type de membrane. Ce résultat montre que le ratio 9/1 entre lipides zwitterioniques et anioniques est insuffisant pour observer une modification de la membrane et donc que le peptide n'est, *a priori*, pas capable de ségréguer et/ou de recruter le DMPG du DMPC.

Ces analyses DSC montrent ainsi que les potentiels peptides de fusion sélectionnés HCV3 et HCV7 sont capables d'interagir avec des lipides et de modifier les propriétés de la membrane qu'ils

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

composent. Cette influence semble être plus importante avec HCV7-S0 et particulièrement sur les lipides anioniques DMPG. Ces analyses restant relativement qualitatives, il a été décidé d'utiliser une autre technique de calorimétrie, la titration calorimétrique isotherme, afin de quantifier les interactions peptide/membrane.

### 2.3. Principe de la titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ITC pour *isothermal titration calorimetry*) est une autre technique de calorimétrie largement employée dans des études d'interactions peptides/membrane. L'ITC consiste à titrer une solution d'un composé participant à une interaction, contenue dans une cellule d'analyse (généralement un récepteur ou une autre protéine), par une solution de l'autre composé impliqué dans cette interaction, contenue dans une seringue (le ligand, généralement une petite molécule ou peptide). L'addition répétée d'un volume connu de solution de ligand dans la solution de récepteur va entraîner une interaction et un dégagement (interaction exothermique) ou une consommation (interaction endothermique) d'énergie et donc de chaleur, faisant varier la température dans la cellule d'analyse. L'appareil fournit alors de l'énergie à la cellule d'analyse ou à la cellule de référence de manière à rétablir l'équilibre thermique (Figure 102A). Cette énergie va permettre de tracer la courbe d'évolution de l'énergie molaire de cette interaction en fonction du ratio molaire entre les composés en présence (Figure 102B). Cette courbe est généralement une sigmoïde où l'énergie diminue au fur et à mesure des injections jusqu'à atteindre un plateau correspondant à un phénomène de saturation (il n'existe alors plus de sites d'interaction disponibles sur le récepteur). Une modélisation utilisant un modèle d'interaction à un site permet ensuite de calculer les paramètres thermodynamiques de l'interaction : l'enthalpie de réaction ( $\Delta H$ , ordonnée du premier plateau), la stœchiométrie (N, abscisse du point d'inflexion) et la constante d'interaction (K, pente de la tangente au point d'inflexion).

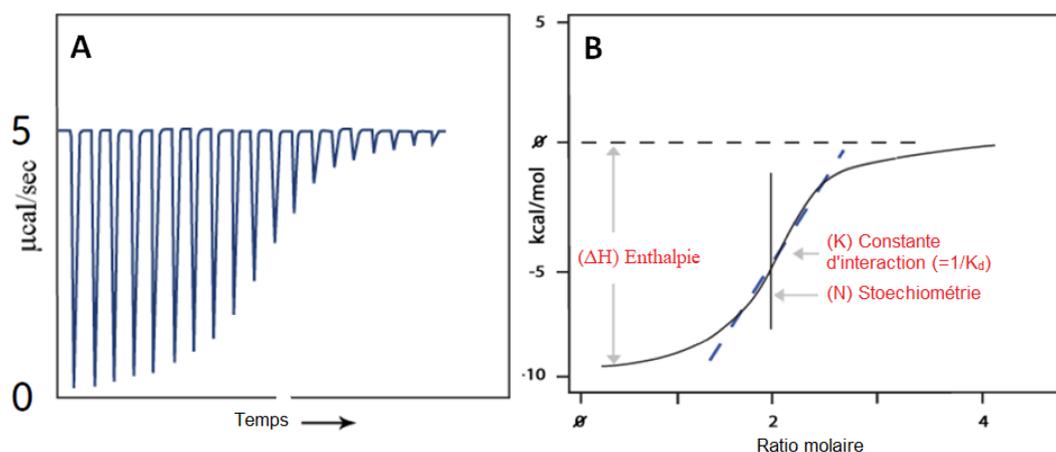


Figure 102 : Courbes d'analyses d'une expérience ITC

L'utilisation des liposomes en ITC peut paraître contre-intuitive. En effet, même si les liposomes peuvent être assimilés à des « récepteurs » dans une expérience d'ITC classique, leur concentration ne peut pas être connue, rendant impossible la détermination des paramètres thermodynamiques de l'interaction. Ce sont en fait les lipides qui sont considérés pour l'analyse d'interaction et puisque plusieurs lipides peuvent interagir avec une séquence peptidique, ces derniers sont assimilés à des ligands. Il existe ainsi deux types d'expériences ITC appliquées à l'interaction peptide/lipide, toutes deux donnant des informations différentes sur les caractéristiques thermodynamiques.<sup>212</sup> La première expérience consiste à injecter une solution de peptide dans la cellule d'analyse contenant une solution

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

de liposomes. La concentration en lipides étant bien plus importante que celle du peptide, la saturation, c'est-à-dire l'absence d'interaction du fait d'un défaut en espèce réactive libre, n'est jamais atteinte. Cette expérience, appelée « expérience inverse » ou P-to-L (pour *peptide-to-lipid*) présente ainsi une énergie échangée identique quelle que soit l'injection. La courbe obtenue est alors une droite dont l'ordonnée permet de déterminer l'enthalpie de réaction. La deuxième expérience, dite L-to-P (pour *lipid-to-peptide*), correspond à l'expérience classique, avec saturation des sites d'interaction sur la séquence peptidique. La courbe alors obtenue est bien une sigmoïde permettant de retrouver les paramètres thermodynamiques  $\Delta H$ , N, et K. La plupart des études portant sur l'analyse d'interactions peptide/lipide par ITC correspondent à des expériences de types L-to-P.

Ziegler et Seelig ont ainsi mis en évidence de nombreuses interactions peptide/lipide par ITC notamment entre l'octréotide, un analogue de la somatostatine, et des SUVs de POPG/POPC 75/25,<sup>215</sup> entre la cyclosporine A et des LUVs de POPC,<sup>216</sup> ou encore entre le peptide Tat et des SUVs ou LUVs de compositions croissantes en lipides anioniques POPG.<sup>213</sup> Il a ainsi été montré que l'interaction entre le Tat et une bicouche lipidique est d'autant plus forte que la teneur en lipide anionique est élevée. D'autres études ont également montré par ITC que des CPPs, comme RW<sub>9</sub>, sont capables de se lier fortement aux GAGs par des interactions électrostatiques.<sup>166</sup> Turner *et al.* ont également utilisé l'ITC pour caractériser l'interaction d'un peptide inhibiteur de fusion, le Cbz-D-Phe-L-Phe-Gly, et des LUVs de DOPC.<sup>217</sup> Reshetnyak *et al.* ont caractérisé l'interaction du peptide pH-sensible pHLIP avec des LUVs de POPC à différents pH.<sup>218</sup> Leurs résultats tendent à montrer l'influence du pH sur l'activité de ce peptide puisque son affinité pour la bicouche lipidique s'est révélée 10 à 20 fois supérieure à pH 5 qu'à pH 8. Plus récemment, Walrant *et al.* ont étudié l'interaction de peptides polycationiques (R<sub>9</sub>, RW<sub>9</sub> et RL<sub>9</sub>) avec des LUVs de distéaroylphosphatidylcholine (DSPC) et distéaroylphosphatidylglycerol (DSPG). Leurs conclusions corroborent les observations réalisées précédemment, à savoir que l'interaction électrostatique de ces peptides polycationiques est primordiale pour l'activité membranaire.<sup>162</sup>

### 2.4. Résultats des analyses ITC

Dans l'optique de caractériser et de quantifier les interactions de nos peptides avec des membranes lipidiques, nous avons effectué des expériences ITC dans les conditions décrites par Seelig en 1997.<sup>212</sup> Les peptides ont ainsi été engagés dans des expériences L-to-P dans un tampon Tris à pH 7,4 et à 25°C. Afin d'étudier l'importance des interactions électrostatiques pour nos séquences, les analyses ont initialement été effectuées avec des LUVs ou des MLVs de DOPC, DOPG ou un mélange de ces deux lipides.

Comme décrit par Seelig,<sup>213</sup> de part sa nature extrêmement cationique, le peptide Tat-S0 a montré une interaction particulièrement dépendante du ratio de lipides anioniques utilisé. Ainsi, aucune interaction n'a pu être observée sur des LUVs de DOPC, DOPC/DOPG 75/25 alors qu'une interaction exothermique a été caractérisée lors des expériences avec des LUVs de DOPG pur. La courbe ainsi obtenue est bien une sigmoïde (Figure 103) permettant de déterminer les paramètres thermodynamiques suivants :

<sup>215</sup> Beschiaschvili, G.; Seelig, J. *Biochemistry* **1992**, *31* (41), 10044–10053.

<sup>216</sup> Schote, U.; Ganz, P.; Fahr, A.; Seelig, J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (3), 856–867.

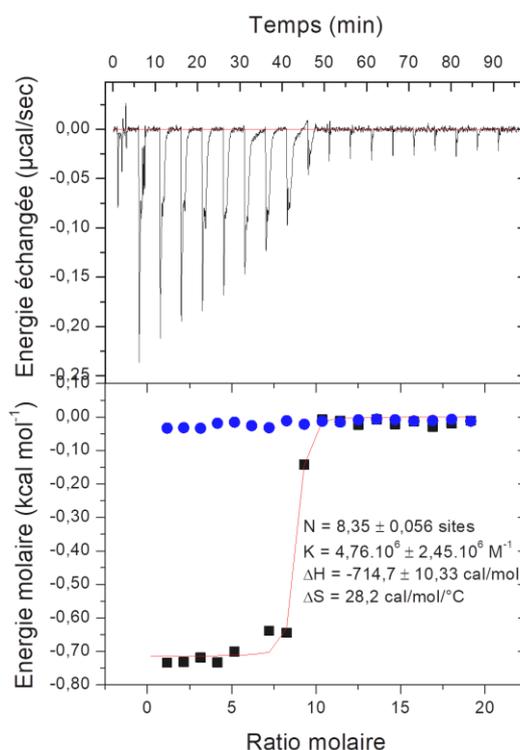
<sup>217</sup> Turner, D. C.; Straume, M.; Kasimova, M. R.; Gaber, B. P. *Biochemistry* **1995**, *34* (29), 9517–9525.

<sup>218</sup> Reshetnyak, Y. K.; Andreev, O. A.; Segala, M.; Markin, V. S.; Engelman, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (40), 15340–15345.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

$$\begin{aligned}N &= 8,35 \\K &= 4,76 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \\ \Delta H &= -714,7 \text{ cal/mol} \\ \Delta S &= 28,2 \text{ cal/mol/}^\circ\text{C}\end{aligned}$$

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature ( $N = 8,0$  ;  $K = 10^4 \text{ M}^{-1}$  ;  $\Delta H = -1\,200 \text{ cal/mol}$ ) ce qui valide notre méthode d'utilisation de cette technique.<sup>213</sup> Les valeurs de stœchiométrie et de constante d'interaction sont néanmoins légèrement supérieures à ce qui a déjà été décrit pour le peptide Tat-S0. Cela est certainement dû à l'utilisation de LUVs composées uniquement de lipides anioniques, facilitant l'approche du peptide par interactions électrostatiques, comparée à des vésicules composées d'un mélange lipides zwitterioniques/anioniques.



**Figure 103 : Courbe de titrage ITC pour l'analyse de l'interaction Tat-S0/DOPG**  
En bleu : analyse du blanc (lipides dans tampon) ; en noir analyse de l'interaction après soustraction du blanc.

Des expériences ITC avec les séquences Tat-S1' et Tat-S3 ont permis de mettre en évidence une éventuelle importance du cargo introduit en position *N*-terminale. Les résultats ainsi obtenus (Tableau 12) montrent clairement une influence relativement importante de la présence du nucléoside SRO91 (Série S3). En effet, dans ce cas, la constante et l'enthalpie d'interaction avec des LUVs de DOPG ont diminué d'un facteur 40 et 2,5 respectivement. En revanche, la stœchiométrie a augmenté, laissant penser que le nucléoside pourrait interagir avec les lipides de la membrane, probablement du fait de liaisons hydrogène avec les groupements phosphate des lipides. La présence du nucléoside pourrait également avoir une influence sur la structure secondaire du peptide. L'interaction peptide/membrane se trouverait donc changée ce qui expliquerait les modifications des paramètres thermodynamiques obtenus en ITC.

L'ajout du fluorophore NBD (Série S1') n'a eu que très peu d'influence sur la stœchiométrie et la constante d'interaction, et a entraîné une faible diminution de l'enthalpie. Ces résultats laissent penser

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

que la présence du fluorophore NBD en position *N*-terminale ne gêne pas les interactions électrostatiques du peptide avec une membrane, en tout cas pas pour la séquence Tat.

Peptide	Fonctionalisation en <i>N</i> -ter	N	K (M <sup>-1</sup> )	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)
Tat-S0	H-	8,35 ± 0,056	4,76.10 <sup>6</sup> ± 2,45.10 <sup>6</sup>	-714,7 ± 10,33	28,2
Tat-S1'	NBD-TTDS-	8,45 ± 0,058	1,1.10 <sup>6</sup> ± 4,44.10 <sup>5</sup>	-486,7 ± 6,299	26,0
Tat-S3	SRO91-TTDS-	10,6 ± 0,4	1,23.10 <sup>5</sup> ± 7,48.10 <sup>4</sup>	-287,4 ± 16,49	22,3

Tableau 12 : Tableau des résultats d'analyses ITC des peptides Tat avec des LUVs DOPG

Dans le cas des analyses réalisées avec le peptide HCV3-S0, il n'a pas été possible d'obtenir une sigmoïde avec cette séquence, et ce en testant plusieurs concentrations de peptide (entre 50 et 500 μM) avec des LUVs de DOPG (5 mM) ou de DOPC (5 mM). Quelles que soient les conditions utilisées, l'énergie échangée lors de l'expérience était très faible (Figure 104A), de l'ordre de l'énergie de dilution dégagée lors de l'expérience contrôle (lipides dans tampon). Les analyses DSC présentées précédemment montrent pourtant que le peptide HCV3-S0 a une action sur la membrane, potentiellement de type détergent. Le ratio P/L relativement élevé nécessaire à la visualisation de cet effet en DSC et l'impossibilité d'obtenir une sigmoïde en analyse ITC pourrait signifier l'existence d'une interaction très faible entre le peptide et les lipides.

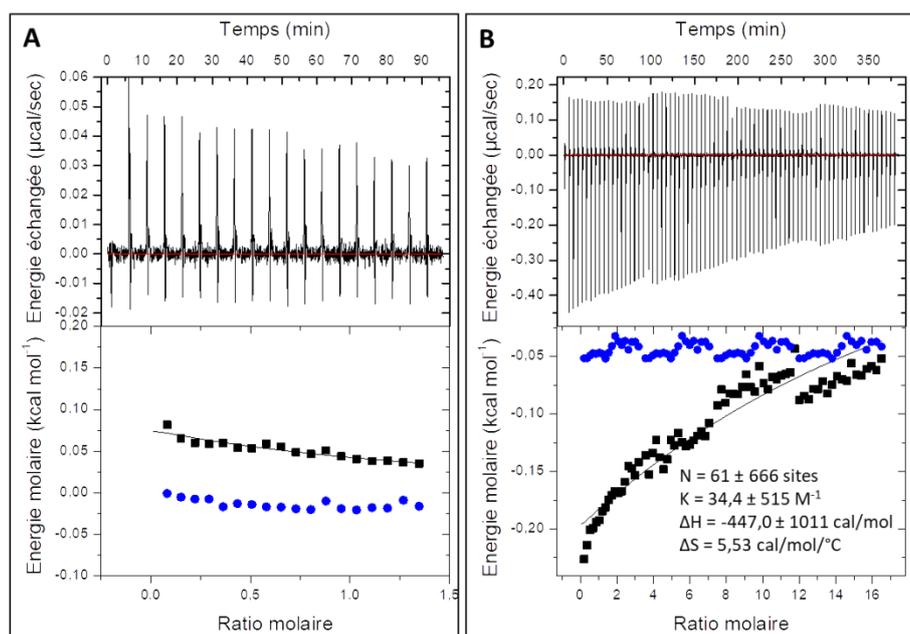


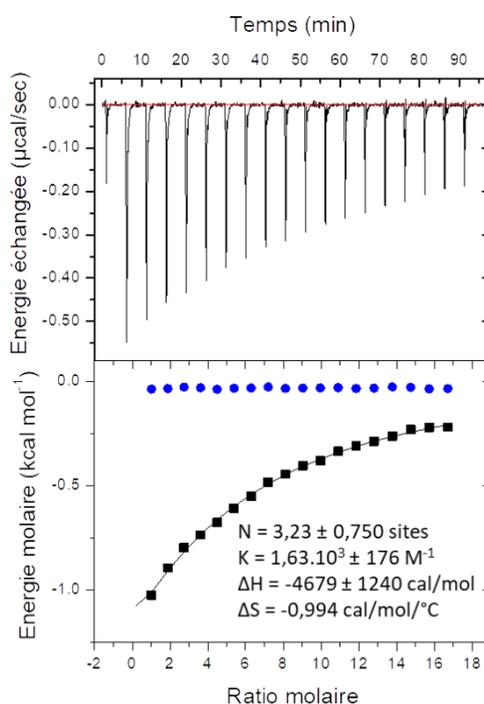
Figure 104 : Analyse par ITC des interactions HCV3-S0/DOPG (A) et HCV6-S0/DOPG (B)  
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Les analyses ITC avec HCV6-S0 ont mené à la même conclusion. En effet, aucune des expériences menées avec des LUVs de DOPG ou DOPC à différentes concentrations en peptide (entre 100 et 500 μM) n'ont permis d'obtenir une sigmoïde ou un signal exploitable. Dans l'éventualité de la présence d'une faible interaction, plusieurs seringues de DOPG ont même été ajoutées à la solution de peptide. Bien qu'une sigmoïde n'ait pas été obtenue, il est possible d'observer la diminution de l'énergie échangée lors de l'analyse, tendant vers un phénomène de saturation (Figure 104B). Néanmoins, la détermination des paramètres thermodynamiques par le modèle à un site d'interaction a donné des

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

valeurs totalement aberrantes. De plus, cette séquence étant très peu soluble, les solutions utilisées contenaient 5 % de DMSO pour permettre d'atteindre des concentrations d'analyse pertinentes. Il est donc possible que les résultats obtenus proviennent d'une action du DMSO sur la membrane ou d'un « buffer-mismatch » (analyse biaisée par l'énergie de dilution de tampon du fait de concentrations différentes dans la seringue et la cellule).

Dans le cas du peptide HCV7-S0, des analyses préliminaires ont d'abord été menées avec des MLVs de DOPC. Si les concentrations utilisées (57  $\mu\text{M}$  en peptide et 5 mM en lipide) n'ont pas permis d'obtenir une sigmoïde, il a été possible de déterminer des paramètres thermodynamiques grâce au modèle d'interaction à un site (Figure 105). Ces résultats correspondent à une stœchiométrie de 3 et une constante d'interaction de l'ordre de  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , ce qui est relativement moyen comparativement à l'interaction Tat-S0/DOPG. En revanche, l'enthalpie de réaction s'est révélée bien plus importante avec -4700 cal/mol contre -700 cal/mol pour l'interaction Tat-S0/DOPG.



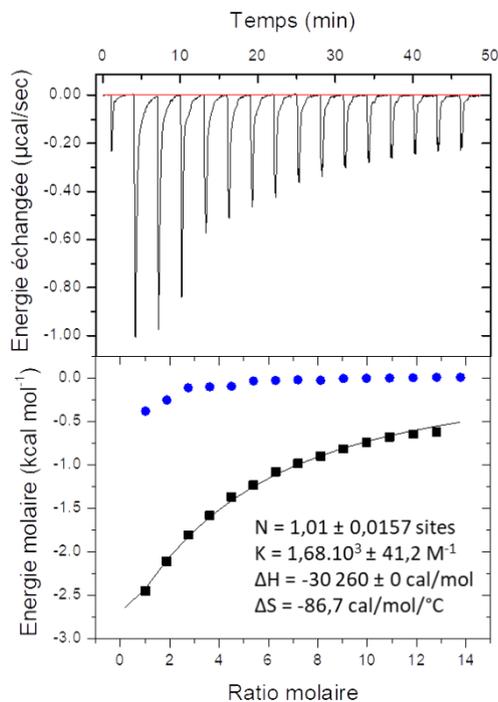
**Figure 105 : Analyse par ITC de l'interaction entre HCV7-S0 et des MLVs de DOPC**  
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Afin de reproduire ce résultat, d'autres analyses de cette interaction dans les mêmes conditions avec des MLVs de DOPC ont été réalisées. Cependant, ces expériences n'ont pas permis d'obtenir le même résultat puisque l'énergie échangée était alors très faible, du même ordre que l'énergie de dilution des lipides dans le tampon. De même, les analyses dans les mêmes conditions avec des LUVs de DOPC n'ont pas permis d'obtenir des résultats exploitables. Dans l'hypothèse où l'interaction dépendrait de la taille et de la lamellarité des vésicules, différentes concentrations en peptide (entre 50 et 150  $\mu\text{M}$ ) ont été testées mais ont mené à la même conclusion. On ne peut donc pas exclure que les paramètres thermodynamiques déterminés proviennent d'artéfacts dus à la forte hétérogénéité de la solution de MLVs.

Des résultats similaires ont été obtenus avec une solution de MLVs de DMPC/DMPG 9/1, composition plus pertinente biologiquement parlant et correspondant aux premières analyses d'internalisation par fluorescence présentées ci-après. Néanmoins, la détermination des paramètres

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

thermodynamiques s'est révélée délicate. En effet, il a été nécessaire de déterminer l'enthalpie d'interaction grâce à une expérience P-to-L de manière à utiliser cette valeur pour déterminer N et K par une modélisation non plus à 3 mais à 2 paramètres (Figure 106). De cette manière, l'interaction de HCV7-S0 a donné une stœchiométrie de 1 légèrement plus faible qu'avec des lipides DOPC et une constante d'interaction du même ordre, à savoir  $10^3 \text{ M}^{-1}$ .



**Figure 106 : Analyse par ITC de l'interaction entre HCV7-S0 et des MLVs de DMPC/DMPG 9/1**  
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Des expériences menées dans les mêmes conditions avec des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 n'ont pas permis de retrouver ces paramètres thermodynamiques, ce qui tend à confirmer la présence d'artéfacts lors de l'utilisation de solutions de MLVs, très hétérogènes.

Dans l'hypothèse où la composition à deux lipides de la membrane influencerait sur l'analyse et puisque la DSC a montré des résultats intéressants lors de l'analyse de l'interaction HCV7-S0/DMPG, cette configuration a également été testée en ITC avec des LUVs. Les résultats ainsi obtenus ont montré une énergie très faible, de l'ordre de l'énergie de dilution des lipides dans le tampon. Des analyses dans un tampon phosphate (PBS 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) n'ont pas permis d'améliorer ces résultats. De même, puisque les expériences ont été réalisées à une température proche de la température de transition des vésicules de DMPG (23°C), d'autres essais ont été réalisés à 30°C, dans l'optique de s'affranchir de possibles artéfacts dus au passage d'un état gel à un état fluide. Cependant, ces expériences n'ont pas non plus permis d'obtenir une énergie échangée suffisante pour être exploitable.

Ainsi, les expériences DSC ont permis de montrer que les peptides de fusion sélectionnés étaient capables d'interagir et de modifier le comportement de bicouches lipidiques utilisées comme modèles de membrane. Le peptide HCV7-S0 s'est d'ailleurs révélé particulièrement efficace sur les lipides anioniques DMPG. Néanmoins, il n'a pas été possible de quantifier correctement cette interaction avec des MLVs ou des LUVs de différentes compositions : zwitterioniques (DOPC, DMPC) ou anioniques (DOPG, DMPG). En effet, si des résultats intéressants ont pu être obtenus lors d'études préliminaires

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

sur des MLVs de DOPC, le comportement du peptide étudié n'a pas été retrouvé lors de la réalisation des triplicats et ce quelles que soient les conditions appliquées (concentrations, tampon, température).

Ce manque de reproductibilité pourrait provenir de l'utilisation de solutions MLVs en étude préliminaire, très hétérogènes et entraînant la visualisation d'artéfacts. Les analyses sur des LUVs, mieux définis en termes de taille et de lamellarité, n'ayant pas donné de résultats exploitables, l'interaction entre nos peptides et les lipides pourrait finalement être très faible, ce qui expliquerait que les différentes conditions testées n'ont pas permis de la caractériser.

### 3. Etude du comportement membranaire des peptides de fusion

Si les expériences de calorimétrie tendent à montrer l'existence d'une interaction faible entre nos peptides de fusion et des membranes lipidiques, elles ne donnent pas d'informations sur leur comportement au contact de la membrane. L'utilisation de la spectrofluorescence pourrait alors permettre de suivre l'internalisation ou l'insertion d'un peptide, marqué par un fluorophore, dans des vésicules lipidiques. De plus, l'utilisation des peptides libres et d'un système FRET pourrait rendre compte de la capacité de ces séquences à entraîner la fusion de liposomes.

#### 3.1. Suivi de l'internalisation par spectrofluorescence

##### 3.1.1. Principe

La pénétration de nos peptides dans des LUVs comme modèles de membrane a été étudiée sur les conjugués avec le fluorophore NBD (Série S1') en collaboration avec le Dr Gérard Chassaing au Laboratoire des Biomolécules (Université Pierre et Marie Curie). Cette technique a déjà été utilisée pour étudier l'internalisation de peptides polycationiques (Tat, pénétratine, R<sub>9</sub>, RW<sub>9</sub> et RL<sub>9</sub>) dans des liposomes de différentes compositions.<sup>174,219</sup> Pour cela, une solution de peptide et une solution de LUVs sont mélangées à la température de l'analyse pendant un temps donné, de manière à atteindre un ratio P/L de 1/100. La température est ensuite diminuée à 10°C afin de bloquer toute pénétration. L'ajout d'un agent réducteur, le dithionite de sodium (DT), permet alors de réduire chimiquement le groupement nitro du NBD en amine, ce qui a pour effet de dissiper la fluorescence de la molécule (Figure 107).

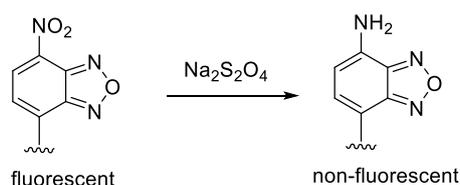


Figure 107 : Réaction de réduction du NBD par le dithionite de sodium (DT)

La membrane étant peu perméable à 10°C, le DT n'est pas capable de pénétrer dans la membrane et de la traverser. La réduction chimique du NBD, et donc la diminution de la fluorescence, n'est possible que sur les composés présents dans le milieu extravésiculaire. En suivant la fluorescence du NBD (555 nm) grâce à un spectrofluorimètre, il est possible d'en mesurer l'intensité et d'observer sa diminution lors de l'ajout du réducteur. Cette diminution étant due à la réduction du NBD dans le milieu extravésiculaire, la fluorescence résiduelle correspond alors au peptide inséré dans la membrane et/ou internalisé dans le milieu intravésiculaire (Figure 108). Connaissant la fluorescence des LUVs seules

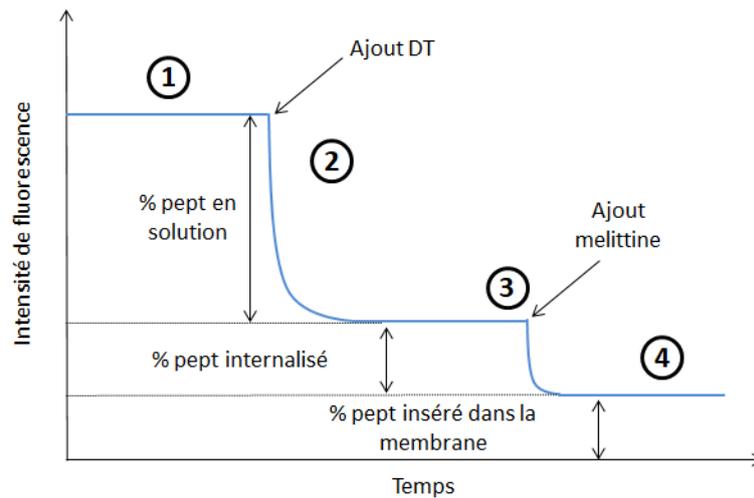
<sup>219</sup> Swiecicki, J.-M.; Di Pisa, M.; Burlina, F.; Lécorché, P.; Mansuy, C.; Chassaing, G.; Lavielle, S. *Biopolymers* **2015**, *104* (5), 533–543.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

(blanc), il est possible de calculer les pourcentages de peptides dans le milieu extravésiculaire et de peptides insérés dans la membrane et/ou internalisés grâce au rapport entre l'intensité de fluorescence avant et après réduction :

$$\% (\text{peptide inséré ou internalisé}) = \frac{I_{\text{red}} - I_0}{I_{10^\circ\text{C}}} \times 100$$

où  $I_0$  correspond à l'intensité de fluorescence des LUVs seules (blanc),  $I_{10^\circ\text{C}}$  l'intensité de fluorescence à  $10^\circ\text{C}$  avant réduction et  $I_{\text{red}}$  l'intensité de fluorescence à  $10^\circ\text{C}$  après réduction.



**Figure 108 : Evolution de la fluorescence du NBD lors de l'expérience d'internalisation**

(1) Fluorescence stable à  $10^\circ\text{C}$  ; (2) Ajout du réducteur DT et diminution de la fluorescence ; (3) Ajout de méltittine et formation de pores dans la membrane ; (4) Diminution de la fluorescence due à la pénétration du DT dans le milieu intravésiculaire.

La méltittine est un AMP capable de former des pores dans des bicouches lipidiques, même à basse température. Son utilisation, toujours à  $10^\circ\text{C}$ , permet de perméabiliser la membrane sans la détruire, entraînant la pénétration du réducteur dans le milieu intravésiculaire (procédure en cours de publication). De la même manière que précédemment, on observe alors une diminution de l'intensité de fluorescence due à la réduction du fluorophore présent dans le milieu intravésiculaire. La fluorescence résiduelle correspond alors uniquement au peptide inséré dans la membrane (Schéma 58).

A nouveau, le rapport des intensités de fluorescence permet de déterminer le pourcentage de peptide inséré dans la membrane et donc la proportion de peptide internalisé.

Ainsi cette technique présente l'avantage de pouvoir totalement discriminer les proportions de peptides dans les différents milieux (extravésiculaires, insérés dans la membrane et internalisés) par simple mesure de l'intensité de fluorescence. De plus, en travaillant en milieu thermostaté, il est possible d'étudier le comportement des séquences dans les différentes phases de la membrane (gel en dessous de  $T_m$ , défauts de phase autour de  $T_m$  et fluide au-dessus), pour des liposomes de compositions diverses.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

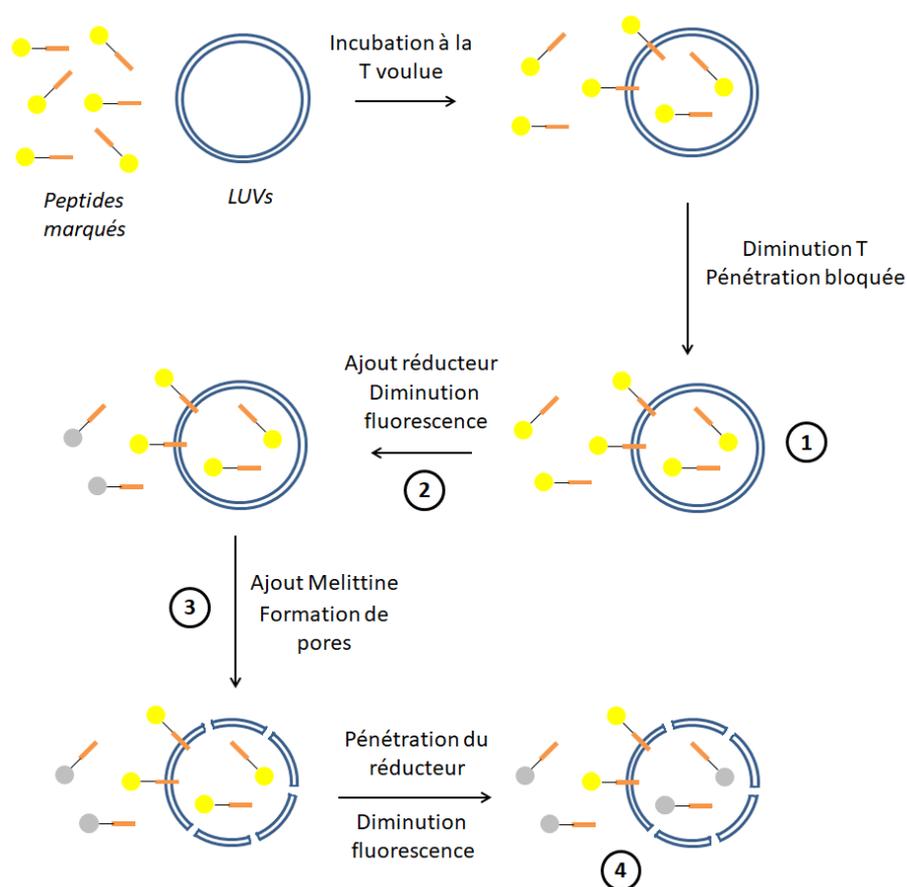


Schéma 58 : Schéma de l'expérience de suivi de l'internalisation par fluorescence

(1) Fluorescence stable à 10°C ; (2) Ajout du réducteur DT et diminution de la fluorescence ; (3) Ajout de mélittine et formation de pores dans la membrane ; (4) Diminution de la fluorescence due à la pénétration du DT dans le milieu intravésiculaire.

### 3.1.2. Résultats du suivi de l'internalisation des peptides de la Série 1'

Nous avons choisi de travailler avec des LUVs de DMPC et/ou de DMPG, puisque ces lipides ont été utilisés en DSC et ITC, mais également car leur température de transition proche de la température ambiante (24 et 23°C respectivement) permet une expérience plus simple à mettre en œuvre. De plus, de nombreuses études font état de l'importance des défauts de phase dans la bicouche lipidique quant à l'activité de certains peptides comme des polyarginines,<sup>220</sup> ou le peptide de fusion gp41 du VIH.<sup>221,222</sup> L'utilisation de lipides dont la température de transition est proche de la température ambiante permet ainsi de pouvoir étudier le comportement des différents peptides en phase gel, en phase fluide, ainsi qu'à la température de transition où les défauts de phase sont nombreux du fait de la coexistence de domaine en phase gel et en phase fluide.

Les premiers essais menés avec le peptide Tat-S1' et des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 ont permis de confirmer cette tendance avec une meilleure activité à la température de transition, puisque le pourcentage de peptides internalisés était de 18 % en phase fluide (37°C) et 25 % à 24°C, température de transition de la membrane étudiée (Figure 109).

<sup>220</sup> Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.; Futaki, S. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56* (26), 7644–7647.

<sup>221</sup> Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Simmons, J. A.; White, J. M.; Tamm, L. K. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 1–10.

<sup>222</sup> Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11401.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

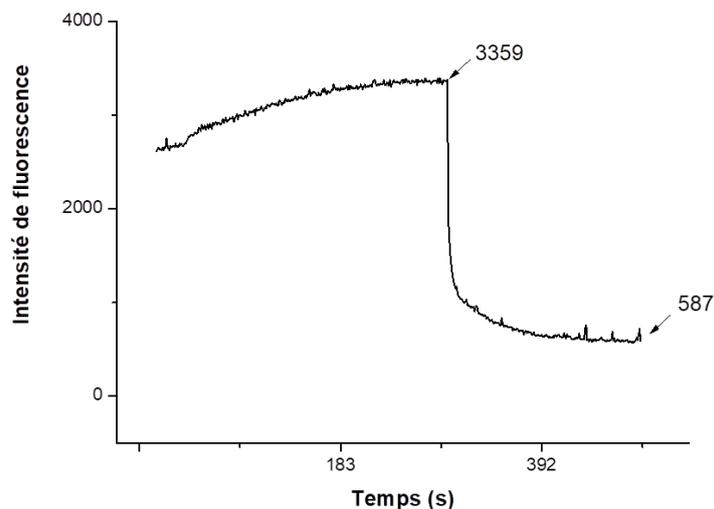


Figure 109 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'expérience d'internalisation de Tat-S1' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 37°C

En revanche, aucune internalisation n'a été observée pour HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1' sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 et ce quelle que soit la température d'étude. En effet, l'intensité de la fluorescence a diminué jusqu'au niveau du blanc lors de la réduction au DT, indiquant que la totalité du NBD a été réduit et donc que ce dernier se trouve uniquement dans le milieu extravésiculaire (Figure 110).

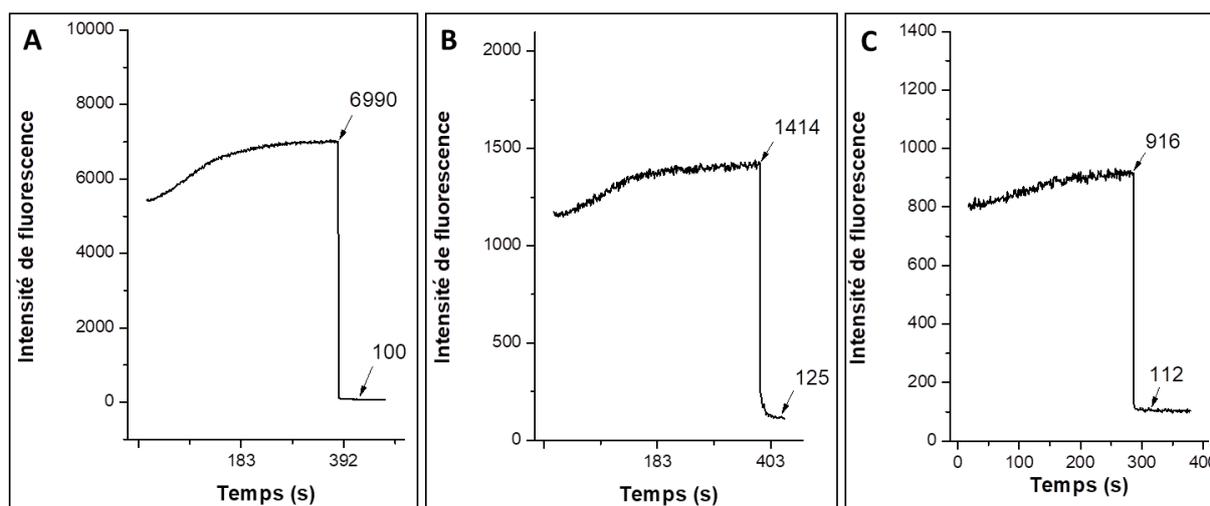


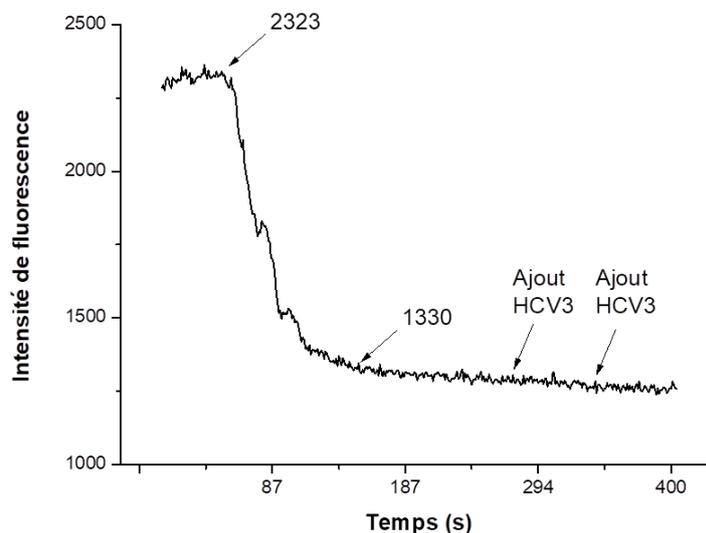
Figure 110 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors des expériences d'internalisation de HCV3-S1' (A), HCV6-S1' (B) et HCV7-S1' (C) avec des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 24°C

Ces résultats sont relativement inattendus, puisque les expériences DSC ont montré une action des peptides sur la membrane et que les peptides membranotropes ont tendance à exercer une activité à la  $T_m$ . Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats serait la formation de pores aux températures testées. En effet, si les peptides sont capables de former des pores dans la membrane, alors les milieux intravésiculaire et membranaire deviennent accessibles au réducteur DT ce qui expliquerait la diminution totale de l'intensité de fluorescence.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'action de ces peptides a été étudiée après internalisation du Tat-S1' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1. Pour cela, les solutions de Tat-S1' et de LUVs ont été incubées à 24°C, puis le DT a été ajouté après diminution de la température à 10°C. Comme expliqué

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

précédemment, on observe alors une diminution de l'intensité de fluorescence correspondant à la réduction du NBD présent dans le milieu extravésiculaire, les peptides insérés dans la membrane ou internalisés n'étant pas touchés. Les peptides HCV3-S0, HCV6-S0 et HCV7-S0 ont alors été ajoutés dans le milieu (ratio P/L final 1/50). Pour chaque séquence, aucune diminution de l'intensité de fluorescence n'a été observée, montrant que le milieu intravésiculaire n'est toujours pas accessible au DT et donc que les peptides ne sont pas capables de former des pores dans la membrane à 10°C (Figure 111).



**Figure 111 : Evolution de l'intensité de fluorescence du Tat-S1' après ajout de HCV3-S0 sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 10°C**

Dans les mêmes concentrations, l'ajout des peptides HCV3-S0, HCV6-S0 ou HCV7-S0 à 24°C, suivi d'une réduction classique au DT à 10°C a donné le même pourcentage d'internalisation de Tat-S1' que lors de l'expérience sans peptides de fusion. A nouveau, ce résultat montre que les peptides sélectionnés ne sont pas capables de former des pores à 24°C, température de transition des LUVs étudiées.

Outre l'absence d'interaction avec la membrane, d'autres hypothèses pourraient expliquer la réduction totale observée avec HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1'. En effet, ces séquences comportent un motif TTDS permettant d'espacer le fluorophore NBD de la séquence peptidique. Il est donc possible que la présence de ce motif très hydrophile gêne l'interaction avec la membrane et l'internalisation. Une autre possibilité serait que les peptides soient capables de s'insérer dans la membrane, mais le TTDS apporterait suffisamment d'espace pour éloigner le NBD de la bicouche lipidique, le rendant accessible à la réduction de la même manière que s'il était en solution.

Pour vérifier ces hypothèses, le peptide NBD-Tat, comportant un NBD conjugué en position N-terminale mais sans la présence de l'espacer TTDS (fourni par le LBM de l'UPMC), a été testé dans les mêmes conditions sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1. Le pourcentage de peptide internalisé à 24°C était alors de 55 % c'est-à-dire plus du double de celui obtenu avec Tat-S1' (25 %). Le TTDS n'est donc clairement pas un motif adapté à l'utilisation de cette technique pour visualiser l'internalisation de nos peptides.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

### 3.1.3. Suivi de l'internalisation du peptide HCV-S1''

Afin de s'affranchir des complications entraînées par la présence du motif TTDS, une autre série de peptides (Série S1'') a été envisagée, ne comportant plus de motif TTDS mais un résidu lysine sur lequel le NBD est introduit sur l'amine de la chaîne latérale. Compte tenu des difficultés de synthèse rencontrées avec HCV3 et HCV6 sans TTDS, cette série n'a été préparée que dans le cas du peptide HCV7 (HCV7-S1'', cf Chapitre III). Cette séquence a ensuite été étudiée pour son internalisation dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 dans les conditions présentées précédemment. Les résultats obtenus montrent une diminution de la fluorescence lors de la réduction jusqu'à un niveau de fluorescence correspondant à 33 % de la fluorescence initiale (Figure 112). L'ajout de mélittine ne modifie pas la fluorescence, signifiant que ces 33 % ne correspondent pas au peptide internalisé mais uniquement inséré dans la membrane.

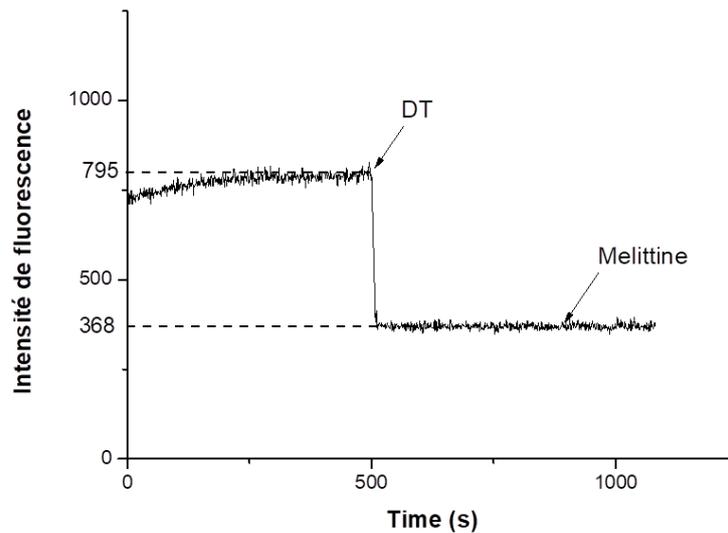


Figure 112 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'expérience d'internalisation de HCV7-S1'' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 24°C

Lors de la réalisation des triplicats, ces résultats n'ont toutefois pas été retrouvés. Les solutions de LUVs utilisées ayant été préparées à des instants différents, l'hypothèse d'une composition variable en DMPC ou DMPG pourrait éventuellement expliquer ce phénomène. Pour cette raison, des analyses ont également été effectuées sur des LUVs de DMPC et DMPG purs à 24°C (Figure 113).

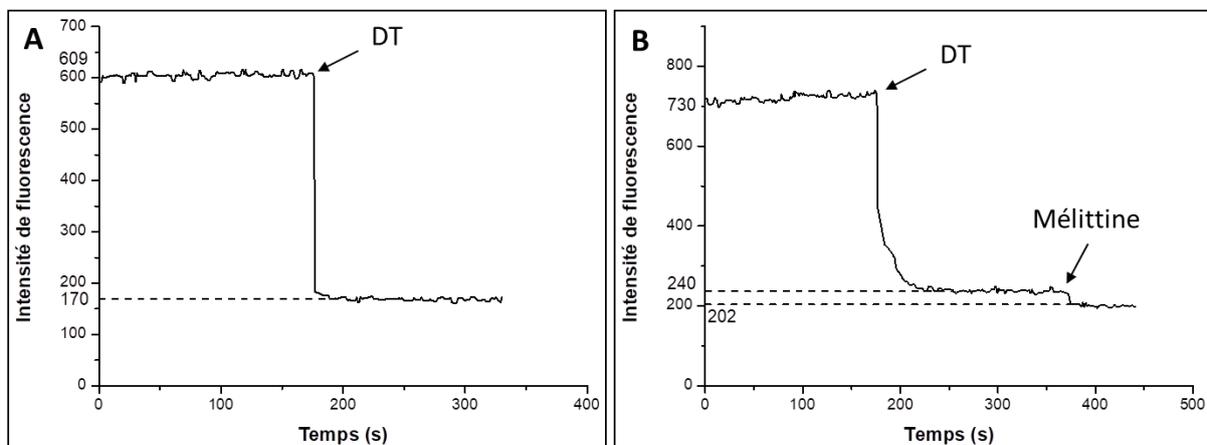


Figure 113 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors des expériences d'internalisation de HCV7-S1'' sur des LUVs de DMPC (A) et de DMPG (B)

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

L'expérience avec les LUVs de DMPC n'a montré aucune internalisation ou insertion du peptide, puisque le niveau de fluorescence a diminué jusqu'à atteindre celui des LUVs seules, et ce à 24°C ou à 37°C. En revanche, l'essai avec des LUVs de DMPG s'est révélé plus concluant. En effet, l'intensité de fluorescence a atteint un niveau légèrement supérieur à celui du blanc après réduction au DT. L'ajout de méliittine a ensuite entraîné un retour du niveau de fluorescence à celui du blanc montrant que la fluorescence résiduelle correspondait au peptide internalisé et non pas inséré dans la membrane. La réalisation de cette expérience en triplicat (en utilisant les mêmes solutions de peptide et de LUVs) a permis de calculer une internalisation de  $8 \% \pm 2,5 \%$  à 24°C et de  $4,7 \% \pm 3,7 \%$  à 37°C. Cependant, l'utilisation de nouvelles solutions dans ces mêmes conditions n'a pas permis de retrouver ces résultats.

Le manque de reproductibilité des expériences menées avec les LUVs de DMPC/DMPG 9/1 et les LUVs de DMPG pures, tend à montrer que le problème ne provient pas de la composition des LUVs. De plus, pour chacune de ces solutions de LUVs, la taille et la monodispersité des vésicules formées après extrusion ont été vérifiées par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*). Enfin, dans l'optique de réaliser une expérience contrôle positive, les solutions de LUVs ont également été testées avec Tat-S1' ou NBD-Tat et chacune s'est révélée capable d'internaliser le peptide.

Le problème de reproductibilité pourrait donc provenir de l'étape de réduction au DT qui est cruciale pour le résultat obtenu. En effet, le DT en solution a tendance à se dégrader en subissant une oxydation au contact de l'air (Figure 114). Pour s'affranchir de cette limitation, la solution de DT habituellement utilisée dans la procédure est fortement concentrée (environ 1M) afin de toujours avoir un large excès d'agent réducteur. Dans le cas de notre peptide HCV7-S1'', l'utilisation d'un tel excès pour permettre une réduction rapide n'est peut-être pas adaptée.

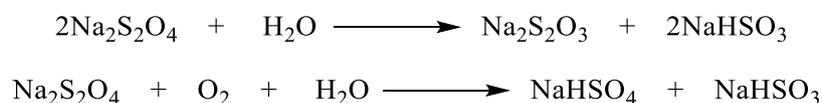


Figure 114 : Equations de dégradation du dithionite de sodium en solution aqueuse

Afin de vérifier cette hypothèse, l'internalisation du peptide HCV7-S1' a été testée sur des LUVs de DMPC/DMPG 7/3 mais en utilisant des ajouts répétés de solution diluée de DT (100 mM) pour réaliser la réduction à 10°C. L'évolution de l'intensité de fluorescence montre alors que l'efficacité de la réduction est dépendante de la quantité de DT utilisée, bien que celui-ci soit toujours en excès par rapport au peptide. On constate alors, qu'à partir d'un certain seuil, la réduction entraîne une diminution brutale de la fluorescence, jusqu'à un plateau correspondant à 8 % de la fluorescence avant réduction (Figure 115). L'ajout de méliittine ne modifie pas le signal montrant que la fluorescence résiduelle correspond uniquement au peptide inséré dans la membrane, ce qui est cohérent avec les premiers résultats obtenus sur des LUVs DMPC/DMPG 9/1. L'ajout de DT supplémentaire continue de diminuer l'intensité de fluorescence jusqu'au niveau du blanc. Cette observation montre que, dans le cas de l'étude du peptide HCV7-S1'', l'utilisation d'un excès trop important de DT entraîne une diminution totale de l'intensité de fluorescence lors de la réduction, et ce alors même que le peptide est capable de s'insérer dans la membrane.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

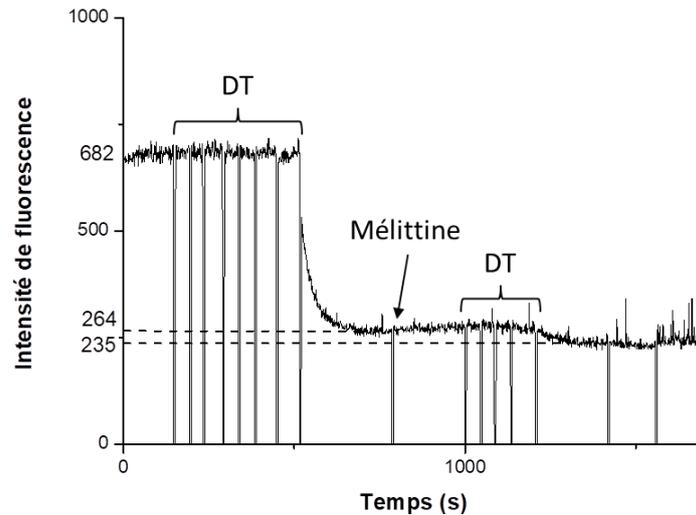


Figure 115 : Evolution de l'intensité de fluorescence lors de l'utilisation d'une solution diluée de DT pour réaliser la réduction dans l'expérience entre HCV7-S1'' et DMPC/DMPG 7/3

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. En effet, il est possible que le peptide ne soit pas réellement inséré dans la bicouche lipidique mais simplement adsorbé à la surface des LUVs grâce à des interactions électrostatiques. Ce comportement expliquerait qu'un très grand excès de DT soit capable de diffuser au travers de la double couche électrique proche de la membrane et ainsi de réduire le NBD comme s'il n'était pas protégé. Une deuxième possibilité serait que le peptide est en équilibre entre différents états dans la membrane ce qui expliquerait que des réductions effectuées à des instants différents permettent de calculer des pourcentages d'insertion très variés. Cette hypothèse supposerait une interaction relativement faible entre le peptide et la membrane et pourrait correspondre soit à différentes structures secondaires au contact de la membrane, soit à un phénomène de partition entre la membrane et le milieu aqueux, ce qui reste cohérent avec les conclusions tirées des expériences de calorimétrie (Figure 116). Malgré le manque de reproductibilité, ces résultats confirment l'existence d'une interaction entre HCV7 et des membranes et tendent à montrer sa faculté à s'y insérer ou à la traverser.

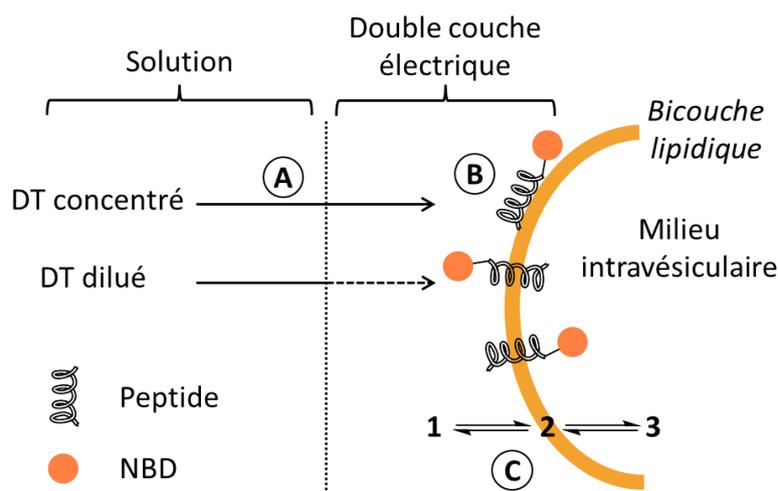


Figure 116 : Différentes hypothèses permettant d'expliquer le manque de reproductibilité des expériences d'internalisation

(A) Diffusion du DT au travers de la double couche électrique à forte concentration ; (B) Différents états du peptide associé à la membrane ; (C) Partition entre la membrane et le milieu aqueux.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

### 3.2. Etude de l'activité fusogénique

Si l'interaction entre les peptides sélectionnés et des membranes ne semble pas suffisamment forte pour entraîner une internalisation ou une insertion franche dans des liposomes, elle pourrait être suffisante pour entraîner la fusion des vésicules. Il a donc été décidé de caractériser l'activité fusogénique de nos peptides par deux méthodes complémentaires : de la spectrofluorescence utilisant des lipides marqués par un système FRET et le suivi de l'évolution des tailles des liposomes par diffusion dynamique de la lumière.

#### 3.2.1. Visualisation de la fusion des liposomes par FRET

##### 3.2.1.1. Principe

Grâce à un spectrofluorimètre, il est possible de mettre en évidence la fusion de liposomes marqués en utilisant le phénomène de transfert d'énergie de résonance de type Förster (FRET pour *Förster resonance energy transfert*). Ce phénomène correspond à un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes : un « donneur » d'énergie et un « accepteur ». Deux conditions doivent être remplies pour que le transfert ait lieu : la bande d'émission du composé donneur et la bande d'absorption de l'accepteur doivent se chevaucher au moins partiellement, de manière à ce que l'énergie dégagée suite à l'excitation du donneur soit en partie transmise à l'accepteur ; les fluorophores doivent être spatialement proches (distance inférieure à 10 nm) afin de permettre le transfert d'énergie. Ainsi, lorsque l'on excite le fluorophore donneur par une source lumineuse et si les conditions précédentes sont remplies, ce dernier va transférer son énergie à l'accepteur, qui va alors émettre de l'énergie sous la forme de fluorescence à sa longueur d'onde d'émission. En revanche, si les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur ne se chevauchent pas ou si les molécules sont trop éloignées l'une de l'autre, le transfert d'énergie n'aura pas lieu et seule la fluorescence du donneur à sa longueur d'onde d'émission sera observée (Figure 117).

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

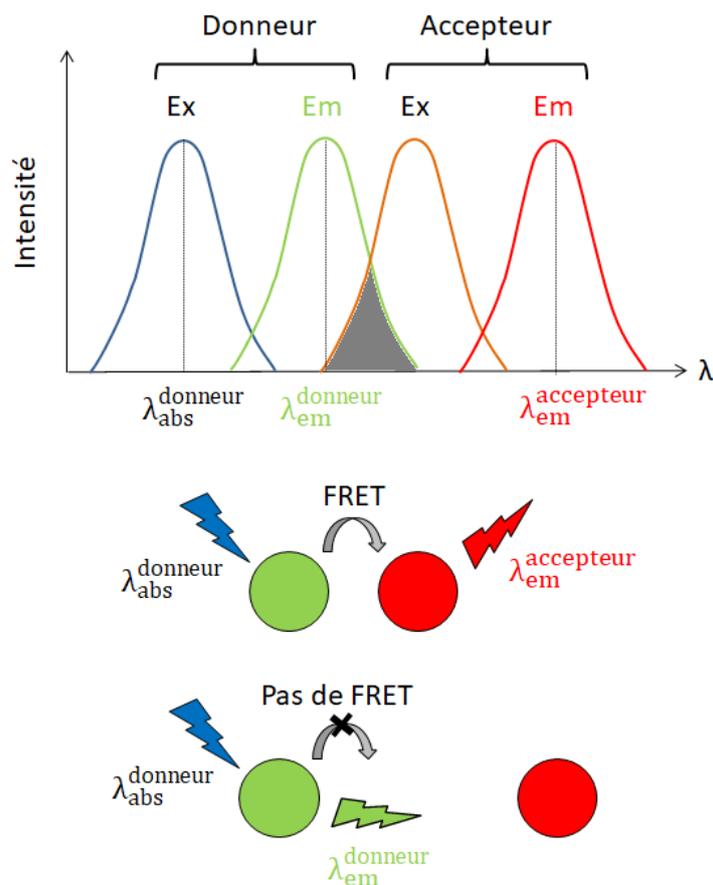


Figure 117 : Conditions nécessaires au transfert d'énergie d'un système FRET

Struck *et al.* ont ainsi utilisé ce phénomène pour mettre en évidence la fusion de liposomes marqués.<sup>223</sup> Dans cette étude, des vésicules partiellement marquées (2 % molaire) avec les fluorophores NBD (donneur) et rhodamine B (Rho, accepteur) sont mélangées à des vésicules non-marquées. Les auteurs montrent ainsi qu'il est possible d'utiliser le système FRET formé par les deux fluorophores pour suivre la fusion des vésicules sous l'action de concentration croissante de chlorure de calcium.

En effet, lors de la fusion ou de l'hémifusion, les lipides des feuillettes externes des vésicules marquées et non-marquées vont se mélanger. Les lipides portant les fluorophores vont donc s'écartier les uns des autres, ce qui entraînera une diminution de l'efficacité du FRET. Il est ainsi possible d'observer la fusion des vésicules en suivant l'augmentation de la fluorescence du NBD à 530 nm et la diminution de l'émission de la rhodamine à 590 nm (Figure 118). D'autres phénomènes (agrégation, dégradation des LUVs) peuvent également entraîner une diminution de l'efficacité du FRET, mais le suivi de la fluorescence reste une bonne indication de l'activité fusogénique de la séquence.

<sup>223</sup> Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* **1981**, 20 (14), 4093–4099.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

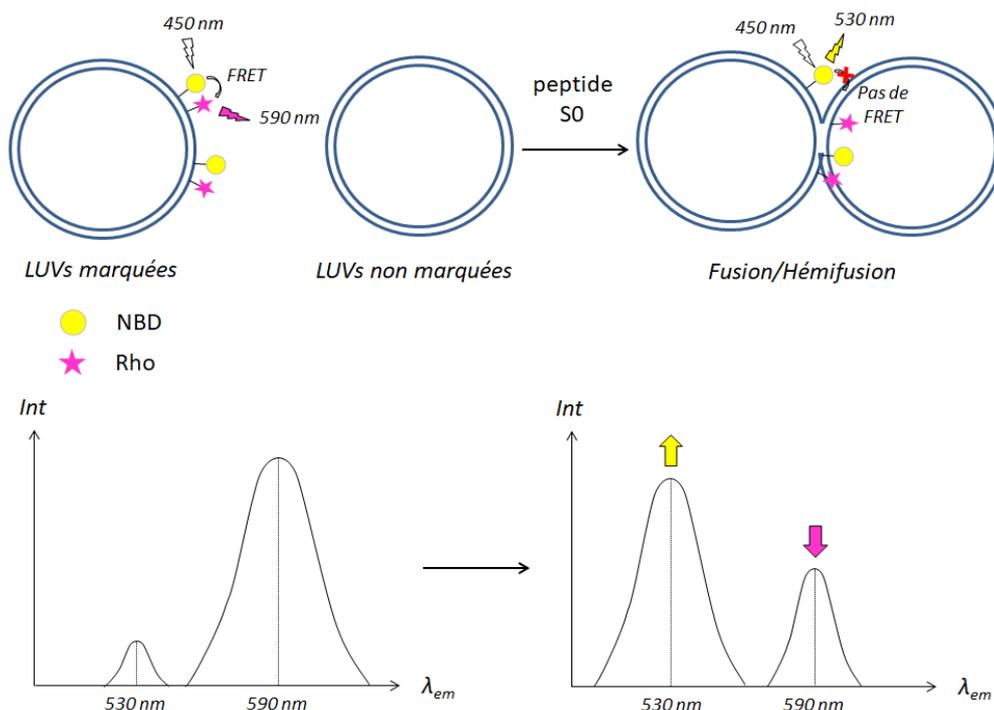


Figure 118 : Utilisation du FRET NBD-Rho pour mettre en évidence la fusion de liposomes

Expérimentalement, seule l'émission du NBD est mesurée en fonction du temps. Cela est dû au fait que le spectre d'émission et d'absorption de la rhodamine se chevauchent, entraînant une perte de fluorescence par un phénomène appelé auto-extinction de fluorescence (ou *self-quenching*). Puisque la fusion entraîne un éloignement des lipides marqués, elle a aussi pour conséquence une diminution du *self-quenching* de la rhodamine. La diminution de l'émission de la rhodamine due à une baisse de l'efficacité du FRET peut alors être contrebalancée par son augmentation due à l'affaiblissement du *self-quenching*.<sup>224,225</sup>

Cette technique a largement été utilisée pour observer la fusion de liposomes induite par des peptides. Pérez-Berná *et al.*, dont le travail a été présenté précédemment, ont étudié l'activité fusogénique des peptides de fusion du VHC sur des LUVs de PC/PG et cholestérol (Chol) ou sphingomyéline (SM) en appliquant la procédure décrite par Struck.<sup>200</sup>

Plus récemment, Ulrich *et al.* ont étudié l'activité fusogénique de différents peptides membranotropes (CPPs, AMPs et le peptide de fusion FP23 du VIH) sur des LUVs de composition LM3 (POPC/POPE/POPS/SM/Chol 10/5/2/2/10), généralement utilisée comme modèle de membrane biologique. Il a ainsi été possible de montrer que les CPPs tels que la pénétratine sont capables d'entraîner autant, voire plus de fusion sur les LUVs en 20 min, que le peptide de fusion FP23. En revanche, les AMPs se sont révélés relativement inactifs dans ces conditions.<sup>226</sup>

<sup>224</sup> MacDonald, R. I. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265 (23), 13533–13539.

<sup>225</sup> Loura, L. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. J. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104 (29), 6920–6931.

<sup>226</sup> Wadhvani, P.; Reichert, J.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. *Eur. Biophys. J.* **2012**, 41 (2), 177–187.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

### 3.2.1.2. Résultats de suivi de fusion par FRET

Nous avons ainsi étudié la capacité de nos peptides à engendrer de la fusion dans les conditions décrites par Ulrich à savoir sur des LUVs de LM3 comportant des lipides DPPE-NBD et DPPE-Rho (2 % molaire) et des LUVs de LM3 non-marquées pour atteindre un ratio 1/10 entre LUVs marquées et LUVs non-marquées et une concentration totale de 150  $\mu\text{M}$  en lipides. La solution de peptide (S0) est alors ajoutée pour atteindre une concentration finale de 3  $\mu\text{M}$  (ratio P/L de 1/50) et la fluorescence du NBD à 530 nm est mesurée au cours du temps.

Le premier essai dans ces conditions avec le Tat-S0 a montré une augmentation de fluorescence dès l'ajout de peptide, puis une diminution après 5 min et une détérioration du signal (Figure 119). Visuellement, une précipitation a été observée dans la cuve d'analyse ce qui explique le signal obtenu. L'augmentation de la fluorescence du NBD à 530 nm indique que le peptide a bien une activité fusogénique mais cette dernière entraîne la formation de particules de tailles importantes qui finissent par précipiter.

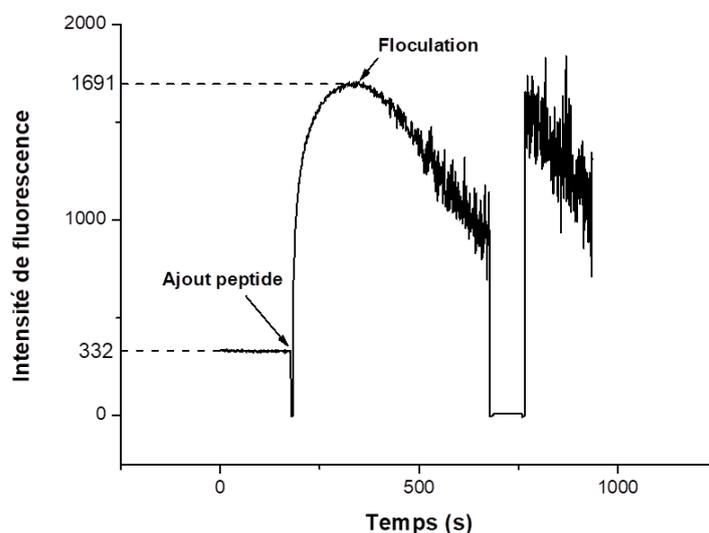


Figure 119 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'essai de fusion entre Tat-S0 et des LUVs de LM3

Compte tenu de ce résultat, il paraît évident que le peptide Tat n'est pas une référence adaptée à l'étude de fusion envisagée. Pour cette raison, l'activité fusogénique de la pénétratine (Ac-Pen, fournie par le LBM de l'UPMC) a également été étudiée dans ces conditions. Les ajouts de la solution de peptide ont été répétés jusqu'à atteindre un ratio de 1/12, pour montrer l'influence du ratio P/L sur l'activité (Figure 120). L'intensité de fluorescence à 530 nm augmente ainsi légèrement avec les premiers ratios P/L (1/100 et 1/50) puis brutalement lorsque le ratio 1/12 est atteint. L'intensité atteint ainsi 842 en environ 1h30 contre 330 pour les LUVs seules. Même après 1h30, l'intensité de fluorescence n'est toujours pas stabilisée indiquant que le processus de fusion a toujours lieu. L'échantillon est alors laissé sous agitation à 37°C (bain thermostaté) pour atteindre une intensité de fluorescence de 1280 après 4h et 1340 après une nuit. Le processus de fusion semble donc bien induit par la Ac-Pen et cette activité fusogénique dépend du ratio P/L mais également du temps, puisque 4h d'incubation ont été nécessaires pour atteindre une intensité de fluorescence relativement stable.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

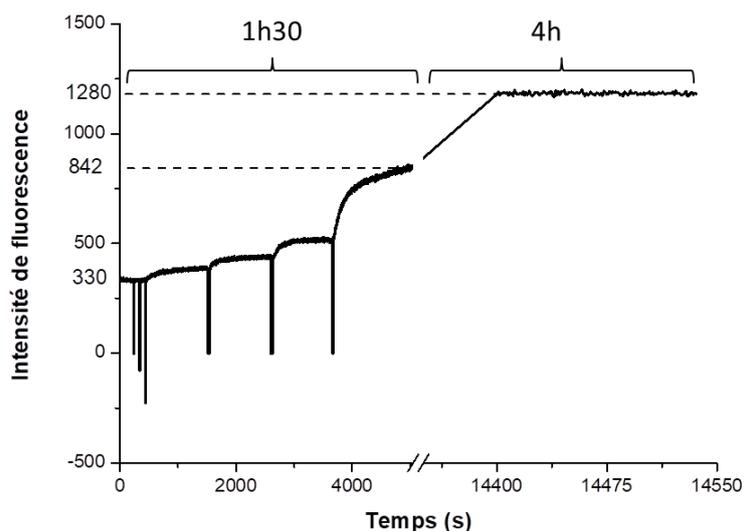


Figure 120 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion de Ac-Pen sur des LUVs de LM3

Les différentes séquences sélectionnées (HCV3-S0, HCV6-S0 et HCV7-S0) ont ensuite été testées dans ces conditions. Aucune augmentation de fluorescence n'a été observée à l'ajout des solutions de peptides alors qu'une augmentation significative a eu lieu après incubation sur une nuit (Figure 121).

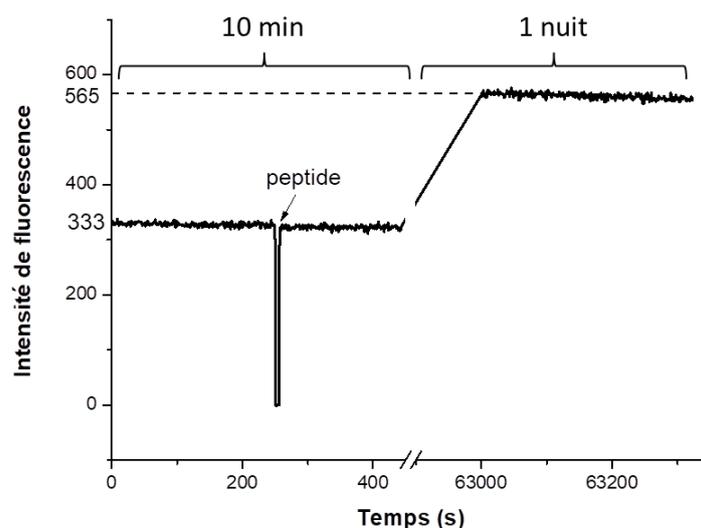


Figure 121 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion de HCV7-S0 sur des LUVs de LM3

Afin de vérifier que cette augmentation n'est pas due à un artefact ou à de la fusion, voire de l'agrégation des LUVs seules, une expérience contrôle sans peptide a été réalisée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus (Tableau 13) montrent effectivement que l'intensité de fluorescence des LUVs seules augmente pendant une nuit. Si ce résultat laisse supposer que les vésicules sont capables de fusionner ou de s'agréger d'elles-mêmes à 37°C et sur un temps d'expérience aussi long, on peut néanmoins constater que l'incubation des peptides de fusion du VHC sur une nuit entraîne une augmentation de fluorescence légèrement plus marquée. Ces séquences seraient donc légèrement fusogéniques mais impliquées dans un processus lent.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Expérience	Intensité après 10 min	Intensité après une nuit
Ac-Pen	842	1340
HCV3-S0	324	506
HCV6-S0	323	581
HCV7-S0	326	565
LUVs seules	324	480

Tableau 13 : Valeurs d'intensité de fluorescence à 530 nm obtenues lors des expériences de fusion dans les conditions d'Ulrich

Afin de vérifier que le phénomène de fusion ne perturbe pas les expériences d'internalisation réalisées précédemment, des essais utilisant le FRET NBD-Rho ont été réalisés dans les conditions d'internalisation (concentration en lipide totale de  $10\mu\text{M}$ ) sur des LUVs de composition LM3.

A nouveau, la fusion de l'Ac-Pen a été testée en réalisant des ajouts successifs de solution de peptide. Les résultats obtenus montrent une augmentation brutale de la fluorescence relative au phénomène de fusion à partir d'un ratio P/L de 1/3, bien plus important que le ratio 1/100 utilisé lors des expériences d'internalisation (Figure 122).

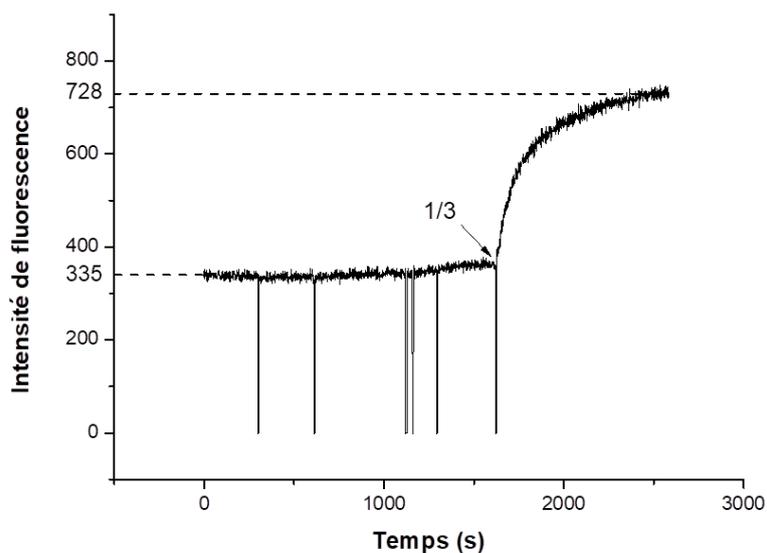


Figure 122 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion d'Ac-Pen sur des LUVs de LM3 dans les conditions d'internalisation

Différentes séquences ont alors été testées dont des CPPs ( $R_9$ ,  $RW_9$ ), un AMP, la magainine 2 (Mag-2) et le peptide de fusion HCV6-S0 semblant être la séquence la plus active parmi celles qui ont été choisies. Les solutions de peptide ont été ajoutées à la solution de LUVs de manière à atteindre un ratio P/L de 1/3, puis les intensités de fluorescence du NBD ont été mesurées après 10 min, 3h et une nuit d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature dans la mesure où les CPPs semblent effectivement être fusogéniques mais pas l'AMP étudié (Tableau 14). Néanmoins, la Mag-2 entraîne une augmentation de fluorescence significative après une nuit, indiquant une diminution de l'efficacité du FRET. Cette observation n'est pas nécessairement en contradiction avec les conclusions d'Ulrich<sup>226</sup> sur l'activité fusogénique des AMPs, dans la mesure où la diminution de l'efficacité du FRET peut être attribuée à d'autres phénomènes que la fusion. En effet, l'AMP pourrait

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

avoir une activité type « détergent » et détériorer la membrane, ce qui entraînerait également l'éloignement des fluorophores et donc une diminution de l'efficacité du FRET.

HCV6-S0, quant à lui, n'a pas entraîné d'augmentation de fluorescence, même après incubation sur une nuit. Le peptide ne semble donc pas fusogénique, en tout cas dans les conditions utilisées pour les tests d'internalisation. Les manques de reproductibilité observés dans ces derniers ne proviennent donc pas d'une perturbation de l'analyse par un processus de fusion ou d'agrégation des vésicules.

Expérience	Intensité après 10 min	Intensité après 3h	Intensité après 1 nuit
Ac-Pen	730	768	1142
RW <sub>9</sub>	702	310	550
R <sub>9</sub>	746	334	476
Mag-2	362	385	631
HCV6-S0	332	342	450
LUVs seules	333	-	420

Tableau 14 : Valeurs d'intensité de fluorescence à 530 nm obtenues lors des expériences de fusion dans les conditions d'internalisation

### 3.2.2. Suivi de la fusion des liposomes par DLS

Dans l'optique de vérifier la tendance observée en spectrofluorescence utilisant un système FRET, le processus de fusion a été suivi par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*). Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que le suivi de fusion par fluorescence : une concentration totale en LUVs de LM3 (uniquement non-marquées) de 150  $\mu\text{M}$  et une incubation de la solution de peptide à 37°C. Après un premier ajout de la solution de peptide pour atteindre un ratio 1/50, la taille des LUVs est mesurée par DLS après 20 min, puis une nuit d'incubation. Un nouvel ajout de peptide est réalisé pour atteindre le ratio de 1/12, puis la taille des vésicules est analysée après 8 h, puis 24 h supplémentaires.

L'analyse des LUVs de LM3 seules a ainsi infirmé l'existence d'un phénomène de fusion ou d'agrégation des vésicules dans ces conditions, puisque la taille de ces dernières n'a pas augmenté, même après deux jours d'incubation à 37°C (Figure 123). L'augmentation de fluorescence observée lors des expériences de fusion faisant intervenir le FRET NBD-Rho est donc certainement due à une concentration des solutions à 37°C, puisque ce phénomène n'a été observé que pour des temps relativement longs (une nuit). On peut donc raisonnablement considérer que l'augmentation légèrement plus marquée de la fluorescence lors de l'utilisation des différents peptides est bien due à un phénomène de fusion

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

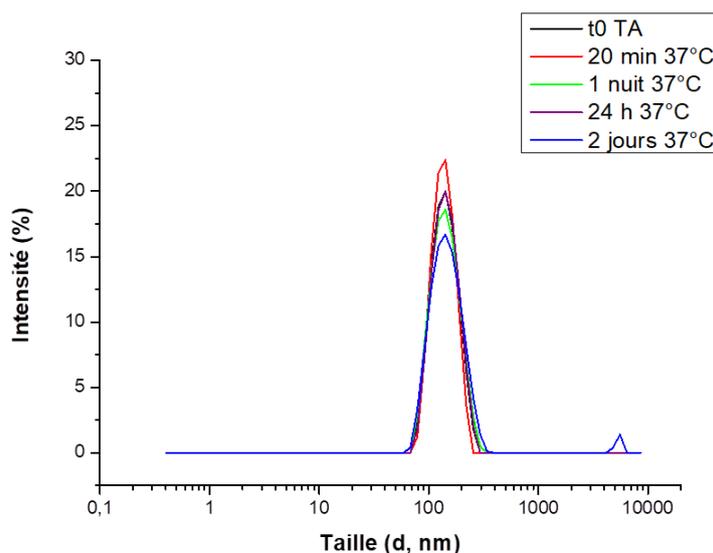


Figure 123 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion sans peptide par DLS

Le suivi de la fusion par DLS des LUVs de LM3 par l'Ac-Pen a confirmé les résultats obtenus précédemment. En effet, une augmentation en taille significative (d'environ 135 nm à 185 nm) a été observée après 20 min d'incubation à 37°C traduisant une activité fusogénique du peptide. Les ajouts supplémentaires de peptide et des temps d'incubation plus longs ont confirmé cette tendance avec des tailles de plus en plus importantes (jusqu'à 242 nm, Figure 124).

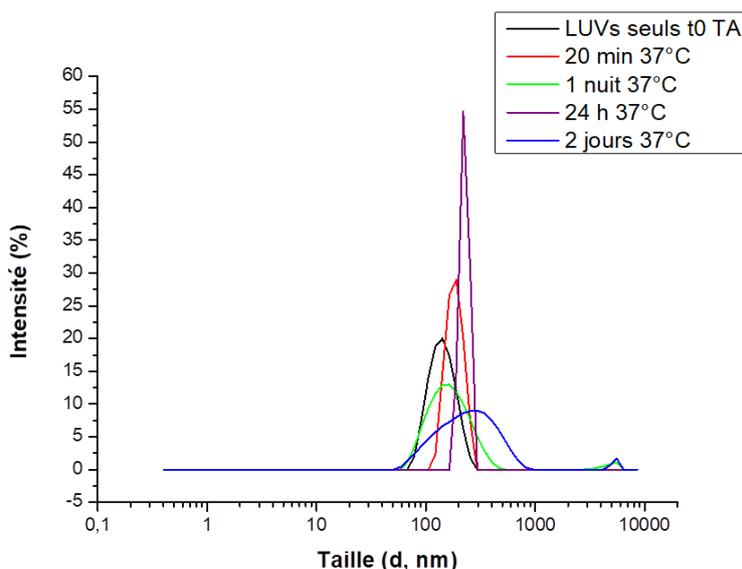


Figure 124 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion induite par Ac-Pen par DLS

Enfin, si les peptides HCV3-S0 et HCV7-S0 n'ont pas entraîné une augmentation significative de la taille des LUVs, le peptide HCV6-S0 s'est révélé plus efficace. En effet, comme pour les expériences de FRET, le peptide n'a pas induit d'augmentation de taille et donc de fusion 20 min ou une nuit après le premier ajout. Néanmoins, une légère augmentation a été observée 8 h après le deuxième ajout (de 139 nm à 148 nm), qui s'est révélée beaucoup plus significative (jusqu'à 215 nm) après 24h (Figure 125).

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

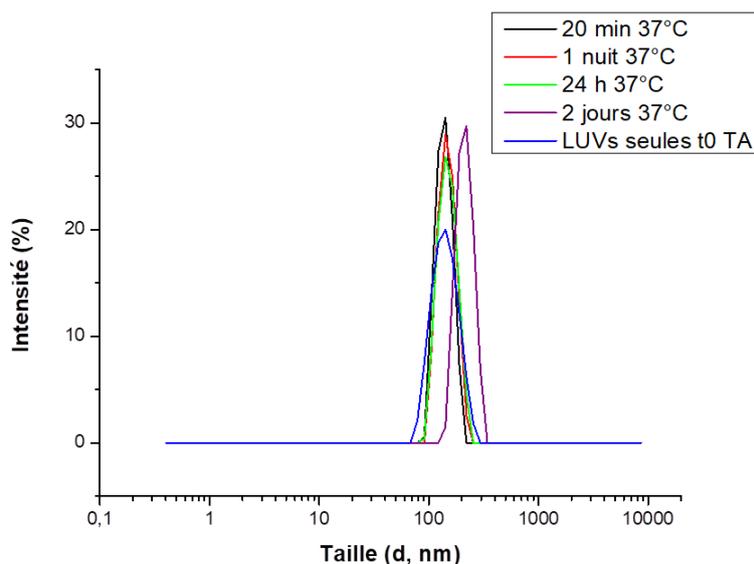


Figure 125 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion induite par HCV6-S0 par DLS

Ces résultats confirment donc les conclusions tirées des expériences FRET, à savoir que les peptides HCV3, HCV6 et HCV7 étudiés engendrent peu de fusion, que ce processus est lent et que le peptide HCV6-S0 semble être le peptide le plus fusogénique des séquences choisies.

Lors des études menées par Ulrich, des analyses en dichroïsme circulaire ont permis de corréler l'activité en fusion avec la capacité du peptide à se structurer au contact de la membrane, sans que la structure secondaire adoptée ne semble avoir d'importance.<sup>226</sup> Cette observation et nos résultats de suivi de fusion sont à rapprocher des études structurales par dichroïsme circulaire, menées par le Pr. Carotenuto de l'université de Naples. En effet, si les peptides HCV6-S0 et HCV7-S0 sont non-structurés en solution, ils sont capables d'adopter certaines conformations au contact de micelles (Figure 126). Ainsi, HCV6-S0 adopte majoritairement une structure  $\beta$  au contact de micelle de dodécylphosphocholine (DPC) alors que HCV7-S0 forme des structures en hélices (entre 2 et 7%), en coude  $\beta$  (entre 20 et 30 %), mais reste majoritairement non-structuré (environ 70 %) au contact de micelles de DPC et de dodécylsulfate de sodium (SDS). La difficulté du peptide HCV7-S0 à se structurer au contact de membranes pourrait être la cause d'une interaction faible, difficilement caractérisable par les techniques utilisées (ITC, spectrofluorescence).

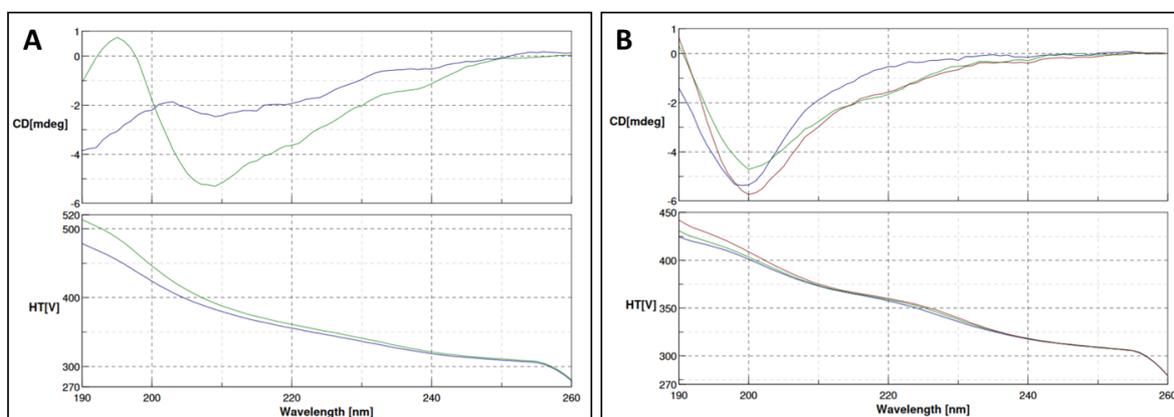


Figure 126 : Spectres de dichroïsme circulaire des peptides HCV6-S0 (A) et HCV7-S0 (B) Spectre du peptide dans l'eau (bleu), au contact de micelles de DPC (vert) et de SDS (rouge)

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Les résultats de suivi de fusion en spectrofluorescence et en DLS confirment donc les observations réalisées par Ulrich puisque, parmi les séquences sélectionnées, HCV6-S0 se structure fortement au contact de membrane et montre par ailleurs la meilleure activité fusogénique.

### 4. Analyse par microscopie à épifluorescence

Dans l'optique de confirmer le comportement membranaire de nos peptides mis en évidence par des expériences de fluorescence, des analyses en microscopie à épifluorescence ont été menées en collaboration avec le Pr. Franck Carreiras et le Dr Sabrina Kellouche (laboratoire ERRMECe, UCP). Lors de cette étude, le comportement des peptides Tat-S1', HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1' a été étudié sur des liposomes de différentes compositions. Puisque le peptide HCV7 semble être la séquence la plus active, les capacités de pénétration de ce dernier et de notre peptide référence Tat ont également été caractérisées par microscopie à épifluorescence sur des cellules cancéreuses CHO (*Chinese Hamster Ovarian cells*).

#### 4.1. Visualisation de l'action des peptides sur des liposomes

Afin de réaliser les expériences de microscopie sur des liposomes, des solutions 100  $\mu\text{M}$  de peptides ont été ajoutées à des solutions 5 mM de MLVs de différentes compositions (DMPG et DMPC/DMPG 9/1) de manière à atteindre un ratio P/L de 1/50. En effet, du fait des limitations de résolution du microscope, des MLVs (0,1-15  $\mu\text{m}$ ) ont été préférées à des LUVs, trop petites pour être observées (100-200 nm). Après 20 min d'agitation à température ambiante, une goutte du mélange est déposée sur une lame surmontée d'une lamelle puis observée au microscope.

Les résultats obtenus avec le peptide de référence Tat-S1' ont ainsi confirmé la capacité du peptide à pénétrer dans le milieu intravésiculaire de MLVs de DMPG ou de DMPC/DMPG 9/1 puisque la fluorescence du NBD a été observée dans le coeur de la vésicule (Figure 127). L'analyse reste cependant très qualitative puisque les MLVs sont de tailles et de lamellarités différentes ce qui explique que plusieurs comportements peuvent être observés lors d'une même analyse. De plus, les liposomes n'étant pas fixés à la plaque, le manque de netteté de certains clichés et la fluorescence diffuse traduisent le mouvement brownien des liposomes en solution.

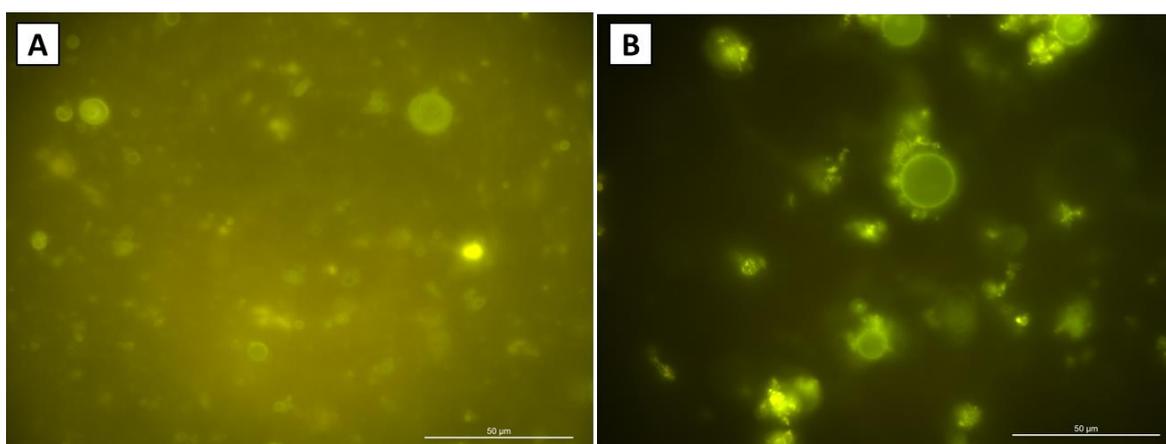
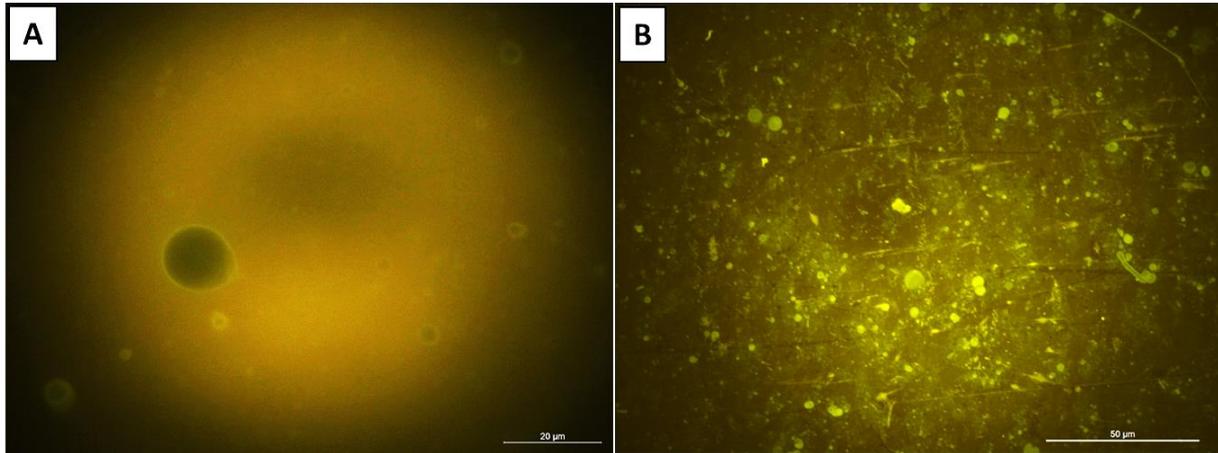


Figure 127 : Microscopie à épifluorescence de Tat-S1' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 (A) et DMPG (B)

Les premiers essais réalisés avec le peptide HCV7-S1'' et des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 se sont montrés très prometteurs dans la mesure où ils confirment les résultats obtenus pour ce peptide et ce type de membrane par spectrofluorescence. En effet, le premier cliché obtenu montre clairement qu'aucune fluorescence n'est visible à l'intérieur des vésicules, mais qu'un liseret se forme autour de

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

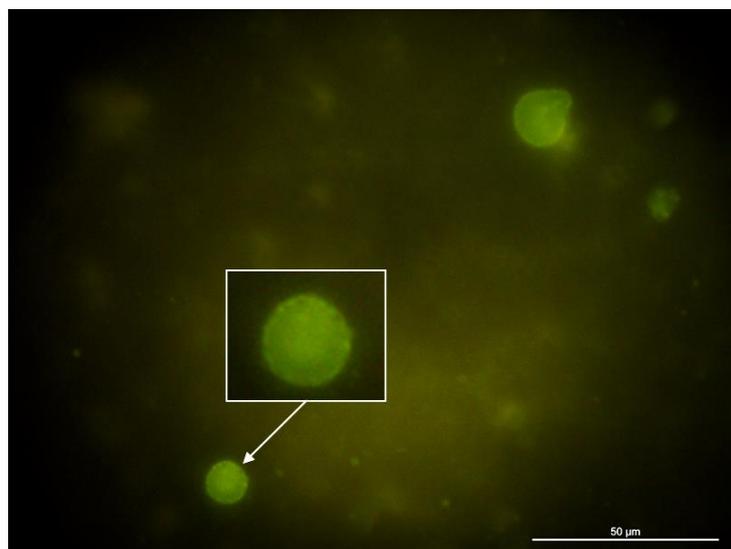
la membrane (Figure 128A). Cette observation confirme donc la capacité du peptide HCV7-S1'' à s'insérer dans une membrane de cette composition, sans la traverser. Malheureusement, comme pour les expériences d'internalisation, ce résultat n'a pas été retrouvé lors de la réalisation des triplicats. En effet, les analyses qui ont suivi ont montré de la fluorescence du NBD à l'intérieur des vésicules étudiées (Figure 128B). Ces dernières semblent toutefois de plus petites tailles que lors des premières expériences, rendant la fluorescence relativement diffuse et donc les observations peu fiables.



**Figure 128 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1. (A) Visualisation du liséré de fluorescence autour de la membrane et absence de fluorescence dans la vésicule ; (B) Deuxième expérience contradictoire montrant l'internalisation dans de plus petites vésicules.**

Si ce manque de reproductibilité pouvait être attribué à des artefacts de mesure ou une trop faible interaction peptide/lipide dans le cas des expériences d'internalisation, le problème semble ici provenir de l'utilisation de solutions de MLVs, fortement hétérogènes en termes de taille et de lamellarité. Il pourrait donc être intéressant de travailler avec des vésicules mieux définies comme des GUVs, puisque les LUVs sont de trop petite taille pour être visualisées au microscope optique.

L'expérience réalisée avec HCV7-S1'' et des MLVs de DMPG semble également confirmer les résultats obtenus par spectrofluorescence. En effet, la fluorescence visible à l'intérieur des vésicules de DMPG montre que le peptide est capable de s'internaliser dans les conditions de l'analyse (Figure 129).



**Figure 129 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des MLVs de DMPG**

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

En revanche, les analyses des peptides HCV3-S1' et HCV6-S1' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 ou de DMPG se sont révélées moins concluantes. En effet, lors de l'utilisation de ces peptides, les vésicules observées au microscope ont présenté deux différences majeures avec celles des expériences impliquant Tat-S1' ou HCV7-S1'' : une taille globalement réduite, sauf quelques amas d'environ 20-30  $\mu\text{m}$ , et aucun objet en mouvement. Ces informations laisseraient penser que les séquences HCV3-S1' et HCV6-S1' seraient capables de s'agréger ou d'agréger les vésicules et donc de les faire précipiter.

### 4.2. Visualisation de l'action des peptides sur des cellules

Dans la mesure où le peptide HCV7-S1'' semble présenter la meilleure pénétration membranaire, ce dernier ainsi que le peptide de référence Tat-S1' ont été testés sur des cellules épithéliales animales (CHO). Pour cela, les solutions de peptides (100  $\mu\text{M}$  pour le Tat-S1' et 25  $\mu\text{M}$  pour HCV7-S1'') ont été ajoutées à des cellules cultivées sur lamelle. Les cellules ont ensuite été placées à 37°C pendant 30 min ou 1h de manière à permettre l'incorporation du peptide. Après 30min ou 1h d'incubation, les cellules sont fixées 10 min au paraformaldéhyde (PFA) 3%, puis l'ADN des noyaux est marqué au DAPI (4,6-diamino-2-phényliindoldihydrochloride, D9542, Sigma) (composé fluorescent se liant fortement aux bases constitutives de l'ADN, permettant ainsi de visualiser le noyau). Enfin, les cellules sont lavées une fois au PBS et à l'eau distillée. Les lamelles sont montées à l'aide du Prolong Gold et observées au microscope à épifluorescence Leica DMLB. Les images obtenues sont traitées avec le logiciel ImageJ.

L'observation des cellules montre clairement une internalisation du peptide dans le milieu intracellulaire dans le cas du Tat-S1' dès 30 min d'incubation. En effet, la fluorescence du NBD (jaune) est visible dans le cytosol et le marquage ponctiforme (points de fluorescence) suggère une pénétration par endocytose (Figure 130A). Après 1h d'incubation, la fluorescence est aussi présente dans le milieu intracellulaire, mais semble se concentrer autour du noyau (Figure 130B). Cette observation est en accord avec la littérature, puisque de nombreuses études montrent que le Tat est capable d'assurer la pénétration cellulaire de différents cargos par endocytose, voire même de les délivrer autour du noyau (transfection).<sup>168,169,227,228,229</sup>

On constate également une diminution du nombre de cellules sur plaque entre 30 min et 1h d'incubation due à l'élimination des cellules mortes (qui n'adhèrent donc plus à la plaque) lors du lavage. La toxicité du peptide Tat étant faible sur les cellules CHO,<sup>230</sup> la cytotoxicité observée correspond certainement à l'action du fluorophore NBD. L'observation d'une concentration de fluorescence autour du noyau des cellules est donc à relativiser, puisqu'elles adoptent un état « rétracté » du fait de l'action cytotoxique du NBD. Bien que ce dernier permette de faire le parallèle avec les expériences d'internalisation par spectrofluorescence, il serait intéressant d'utiliser un autre marqueur fluorescent, peut-être même de réaliser un immunomarquage.

<sup>227</sup> Meng, S.; Wei, B.; Xu, R.; Zhang, K.; Wang, L.; Zhang, R.; Li, J. *Intervirology* **2009**, 52 (3), 135–140.

<sup>228</sup> Moschos, S. A.; Jones, S. W.; Perry, M. M.; Williams, A. E.; Erjefalt, J. S.; Turner, J. J.; Barnes, P. J.; Sproat, B. S.; Gait, M. J.; Lindsay, M. A. *Bioconj. Chem.* **2007**, 18 (5), 1450–1459.

<sup>229</sup> Lo, S. L.; Wang, S. *Biomaterials* **2008**, 29 (15), 2408–2414.

<sup>230</sup> El-Andaloussi, S.; Järver, P.; Johansson, H. J.; Langel, Ü. *Biochem. J.* **2007**, 407 (2), 285–292.

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

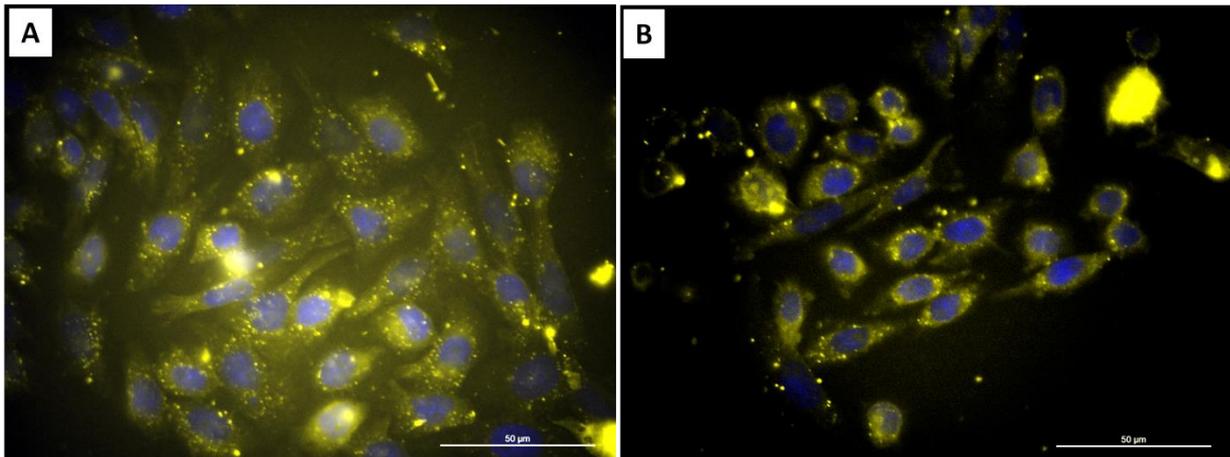


Figure 130 : Microscopie à épifluorescence de Tat-S1' sur des cellules CHO après 30 min (A) et 1h (B) d'incubation à 37°C

Les expériences avec le peptide HCV7-S1'' ont également montré sa capacité à pénétrer dans le milieu intracellulaire. En effet, la fluorescence du NBD est également visible dans le cytoplasme après 30 min d'incubation, et semble se concentrer autour du noyau après 1h (Figure 131).

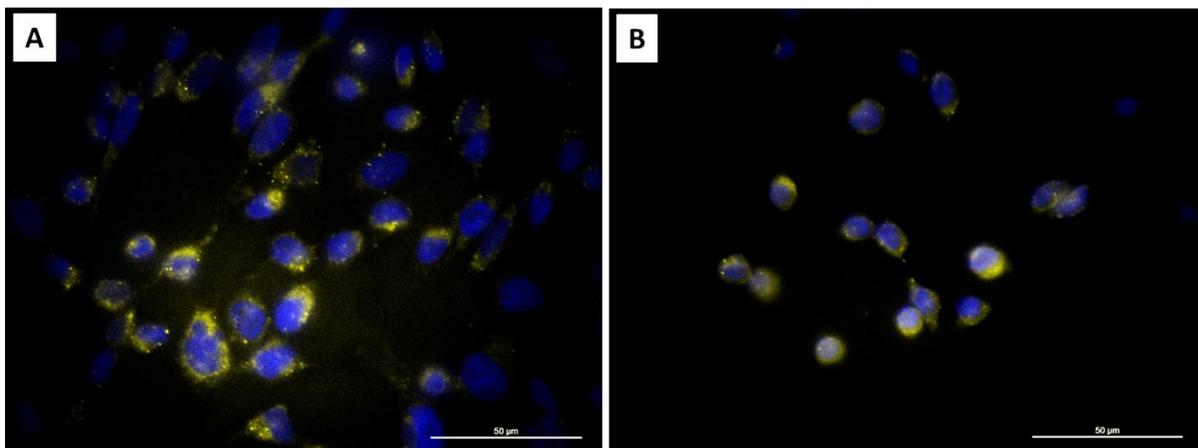


Figure 131 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des cellules CHO après 30 min (A) et 1h (B) d'incubation à 37°C

Comme dans le cas de Tat-S1', un marquage ponctiforme est observé lors de l'internalisation du peptide HCV7-S1'' traduisant une pénétration par endocytose. Cette observation n'est cependant pas suffisante pour conclure quant au mécanisme général de pénétration du peptide. Il pourrait donc être pertinent de réaliser ces mêmes expériences avec une incubation à plus basse température (4°C) dans la mesure où les transports actifs comme l'endocytose seraient bloqués. Une pénétration du peptide signifierait alors que le mécanisme fait également intervenir une diffusion passive au travers de la membrane.

### 5. Conclusion sur la caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Les techniques de calorimétrie ont permis de mettre en évidence l'interaction entre les séquences HCV3, HCV6 et HCV7 sélectionnées et des bicouches lipidiques (Tableau 15). L'utilisation de la DSC a notamment démontré l'activité membranaire du peptide HCV7-S0 sur des vésicules de DMPG, probablement due à la présence d'un résidu arginine dans la séquence. Le peptide s'est ainsi révélé

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

capable de fluidifier une telle membrane par une action « localisée », certainement due à la formation d'agrégats au contact des lipides. En revanche, les analyses ITC n'ont pas permis de quantifier ces interactions, du fait d'une interaction trop faible ou de conditions d'analyse difficiles à maîtriser. Dans ce cas, il pourrait être intéressant de caractériser l'interaction P/L par d'autres techniques comme la résonance des plasmons de surface (SPR pour *surface plasmon resonance*) ou des analyses d'ondes acoustiques de surface (SAW pour *surface acoustic waves*) initialement prévues. De plus, des analyses sur des constituants membranaires anioniques plus pertinents tels que les PS, PI ou des GAGs pourraient également permettre de mieux appréhender le comportement du peptide.

Analyse	Composition lipidique	HCV3	HCV6	HCV7
DSC	DMPC	-	-	Pas d'influence
	DMPG	Détérioré la membrane	Pas d'influence	Fluidifie la membrane
ITC	DOPC	Pas d'interaction	Pas d'interaction	Interaction mais non quantifiée
	DOPG	Pas d'interaction	Pas d'interaction	Pas d'interaction
	DMPG	-	-	Pas d'interaction
Internalisation	DMPC/DMPG	Pas d'internalisation Pas de formation de pores	Pas d'internalisation Pas de formation de pores	Insertion dans la membrane
	DMPC	-	-	Pas d'internalisation
	DMPG	-	-	Légère internalisation
Fusion	LM3	Pas de fusion	Fusion lente	Pas de fusion
Microscopie	DMPC/DMPG	Non concluant	Non concluant	Insertion dans la membrane
	DMPG	Non concluant	Non concluant	Internalisation
	CHO	-	-	Internalisation

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des résultats d'analyses d'interaction P/L

L'étude du comportement des peptides par spectrofluorescence a également permis de constater que si les séquences HCV3-S0 et HCV6-S0 ne semblent pas montrer d'activité membranotrope particulière, HCV7-S0 est capable de s'insérer dans des membranes de DMPC/DMPG 9/1 et de faiblement s'internaliser dans des LUVs de DMPG à la température de transition. En dépit d'un manque de reproductibilité probablement dû à une trop faible interaction ou à l'existence du peptide sous plusieurs états au contact de la membrane (conformations ou équilibre de partition), ces résultats confirment les observations réalisées en calorimétrie, à savoir que la séquence HCV7-S0 semble être la plus membranotrope. Son activité reste néanmoins bien moins importante que d'autres CPPs comme le Tat ou RW<sub>9</sub>.

Les expériences de fusion suivies par spectrofluorescence grâce à un système FRET NBD-Rho ou par DLS ont montré que les peptides sélectionnés entraînent peu de fusion sur des LUVs de LM3, par un

## Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

processus lent et dépendant du ratio P/L utilisé. Si son activité fusogénique n'est pas comparable à celle de la pénétratine ou du Tat, HCV6 s'est révélé être la séquence la plus active parmi les trois sélectionnées.

Enfin, l'étude du comportement des peptides de fusion sur des MLVs par microscopie à épifluorescence a également permis de confirmer les observations précédentes. Cette expérience reste néanmoins qualitative dans la mesure où les solutions de MLVs utilisées sont très hétérogènes et induisent nécessairement des comportements différents. Par ailleurs des expériences avec des cellules CHO ont prouvé la capacité de la séquence HCV7 à pénétrer dans le milieu intracellulaire. Bien que la cytotoxicité observée semble être induite par le fluorophore NBD, l'utilisation de HCV7-S1'' apparaît plus néfaste pour les cellules qu'avec Tat-S1'. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la cytotoxicité ou le potentiel antimicrobien de la séquence seule. De plus, l'utilisation d'un autre fluorophore ou d'un immunomarquage pourrait permettre de réduire la toxicité induite par les peptides et donc de tirer des conclusions plus fiables quant à l'activité de nos séquences.

## **Conclusion et perspectives**



## Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives

Dans l'optique d'améliorer l'activité anti-VHC du C-nucléoside SRO91, deux axes ont été développés dans ce projet : l'adressage de l'antiviral vers les cellules hôtes, à savoir les hépatocytes, et l'amélioration de sa pénétration cellulaire.

L'utilisation de galactosides a ainsi été choisie pour réaliser l'adressage de SRO91 vers les cellules du foie, du fait de leur affinité pour les ASGPRs. Un premier conjugué monovalent galactose/SRO91 a pu être synthétisé avec un espaceur triéthylène glycol et un bras succinique. Le conjugué Gal-TEG-SRO91 a ainsi été obtenu en 6 étapes impliquant une glycosylation de Koenigs-Knorr, avec un rendement global de 3,5 %. Ce composé devra ensuite être testé *in vitro*, sur des lignées cellulaires exprimant les ASGPRs et des cellules n'en exprimant pas, afin de vérifier l'impact et l'utilité du galactoside quant à l'amélioration de l'activité du nucléoside. De plus, de nombreuses études démontrent que la meilleure affinité avec les ASGPRs est obtenue grâce à des ligands multivalents, particulièrement les trivalents du fait de la conformation trimérique du récepteur. La synthèse de conjugués trivalents, utilisant des galactosides ou *N*-acétylgalactosamines et un répartiteur Tris, est en cours au laboratoire. De plus, la préparation de structures 3/3, comportant 3 nucléosides pour 3 galactoses, sont programmés afin d'augmenter la charge d'antiviraux sur l'adresseur (Figure 132).

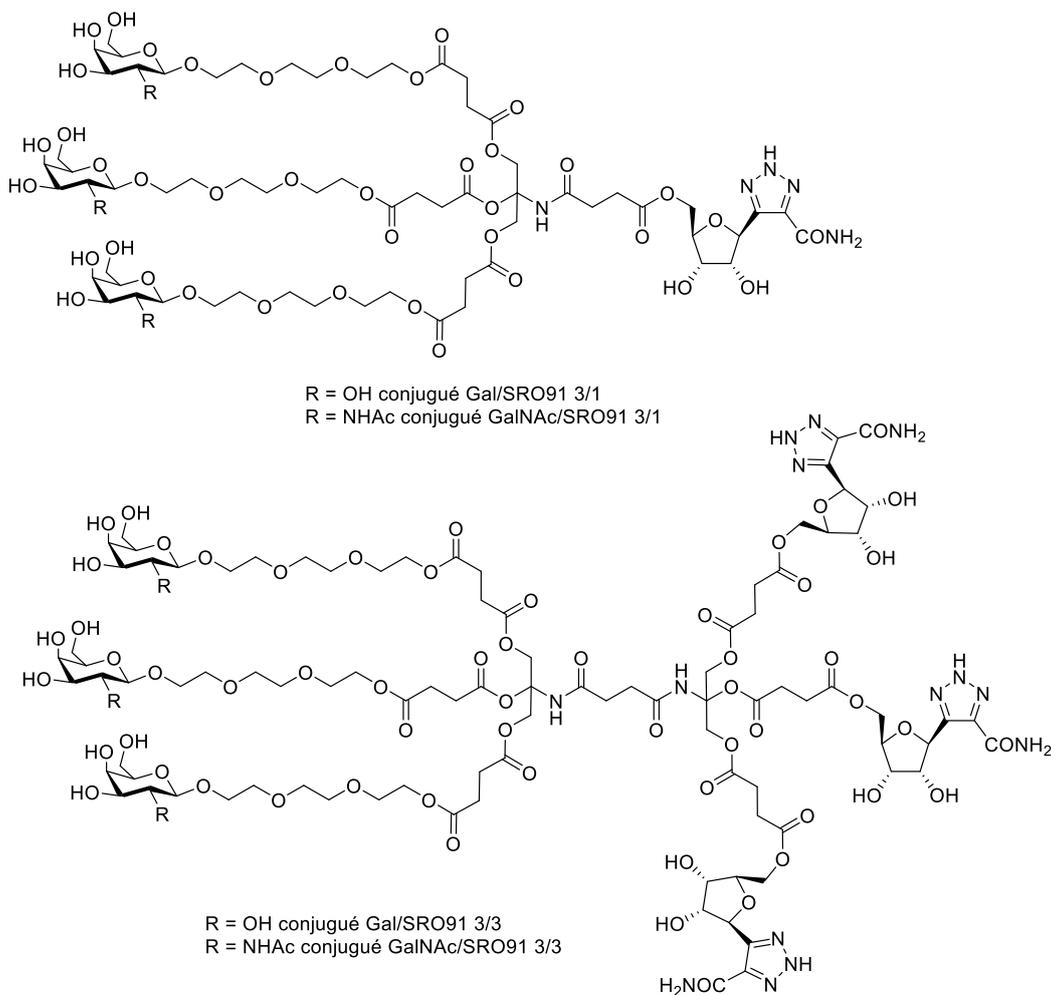


Figure 132 : Structure des conjugués trivalents envisagés

## Conclusion et perspectives

Dans l'optique d'améliorer la pénétration cellulaire de SRO91, trois peptides de fusion du VHC (HCV3, HCV6 et HCV7) ont été sélectionnés, synthétisés par SPPS et fonctionnalisés par différents motifs tels que le nucléoside SRO91 ou un fluorophore NBD. Les séquences peptidiques ont ainsi été obtenues avec des rendements allant de 2 à 45 %. Néanmoins, certaines synthèses, notamment avec HCV6, se sont révélées délicates du fait de la faible solubilité et de la purification difficile de ces composés. Par conséquent, les séquences de la série S2, conjuguées à un acide lipoïque en vue de réaliser des analyses SAW, n'ont pas été effectuées avec les peptides HCV3 et HCV6. De même, ces derniers n'ont pas été conjugués au nucléoside SRO91. En revanche, les conjugués avec HCV7 et le Tat, notre peptide de référence, ont été obtenus avec une bonne pureté et devront ensuite être testés *in vitro* quant à leur activité anti-VHC.

Différentes analyses ont ensuite été effectuées afin de caractériser l'interaction des séquences sélectionnées et des liposomes, choisis comme modèle de membrane. Les expériences de DSC ont ainsi prouvé l'existence d'interactions entre ces peptides de fusion et des bicouches lipidiques, particulièrement entre HCV7 et des vésicules de DMPG. Les différents essais en ITC n'ont pas permis de quantifier les interactions P/L. En effet, si aucune interaction n'a été observée avec les peptides HCV3 et HCV6, le résultat obtenu avec HCV7 et des MLVs de DOPG démontrant une interaction moyenne de l'ordre de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  n'a pas pu être reproduit. Néanmoins, cette observation pourrait être expliquée par l'existence d'une interaction faible, mais bien présente, entre le peptide et les lipides.

Des expériences d'internalisation par spectrofluorescence ont permis de confirmer cette tendance. En effet, HCV3 et HCV6 n'ont montré aucune interaction avec des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 alors que HCV7 s'est révélé capable de s'insérer dans la membrane (environ 30 % d'insertion). De plus, un essai avec des LUVs de DMPG a montré que le peptide HCV7 était capable de faiblement s'internaliser dans des vésicules anioniques (environ 8 % d'internalisation) à la manière des CPPs. Si ces résultats n'ont pas pu être reproduits lors de la réalisation de triplicats, l'utilisation d'une solution de réducteur diluée a permis de montrer que le peptide était bien capable de s'insérer dans une membrane. Trois hypothèses ont été émises pour expliquer cette observation : (i) le peptide pourrait être adsorbé à la surface de la membrane et l'utilisation d'un grand excès de réducteur entraînerait une diffusion rapide et donc une réduction instantanée et totale, (ii) le peptide existerait sous différentes conformations en équilibre au contact de la membrane, dont certaines seraient plus sensibles à la réduction, et enfin (iii) le peptide pourrait présenter un équilibre de partition entre la membrane et le milieu aqueux ce qui expliquerait la perte totale de fluorescence lors de la réduction. Par ailleurs, l'activité de HCV7 observée en DSC tend à montrer la capacité du peptide à s'agréger pour exercer une influence sur la membrane. La concentration en peptides utilisée dans les expériences de spectrofluorescence étant très faible (100 nM), les résultats obtenus pourraient simplement ne pas être reproductibles du fait de l'absence d'agrégation de ce peptide.

Les études de fusion par spectrofluorescence ou DLS ont permis de montrer que seul HCV6 présente une activité fusogénique sur des LUVs de LM3 à 37°C. Néanmoins, cette activité semble associée à un processus lent, puisque plusieurs heures ont été nécessaires pour pouvoir observer de la fusion, contrairement aux peptides de référence Tat et pénétratine.

Enfin, de nouvelles études de microscopie à épifluorescence ont été menées et confirment les résultats obtenus par spectrofluorescence, à savoir que le peptide HCV7 est capable de s'insérer dans une membrane de DMPC/DMPG 9/1 et de s'internaliser dans des vésicules de DMPG. Il est important de noter que l'utilisation de MLVs pour ces expériences rend les observations réalisées très qualitatives. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser des vésicules plus homogènes, comme des GUVs, pour confirmer ces résultats. Les expériences sur des cellules CHO, quant à elles, ont permis de démontrer

## Conclusion et perspectives

la capacité du peptide HCV7 à pénétrer dans le milieu intracellulaire. Dans l'éventualité où la présence d'un fluorophore influencerait sur l'activité membranotrope du peptide, il pourrait être intéressant de réaliser ces expériences en utilisant la séquence seule et en réalisant un immunomarquage.

Ces observations sont globalement en accord avec la littérature, particulièrement les études de Pérez-Berná *et al.* sur les peptides de fusion du VHC. En effet, le peptide HCV6, qui a montré la meilleure activité fusogénique en spectrofluorescence et DLS, fait partie de la région extracellulaire de la protéine de fusion E1, souvent identifiée comme la partie contenant le peptide de fusion. Néanmoins, la séquence entraînant une fusion relativement lente, on ne peut affirmer avec certitude que le peptide HCV6 constitue la séquence minimale du peptide de fusion du VHC.

En revanche, aucune étude de notre connaissance ne fait état de l'activité membranotrope du peptide HCV7. Si certains résultats restent à relativiser, les expériences de microscopie ont montré que le peptide était capable de traverser la membrane cellulaire.

Cette étude apporte également quelques précisions quant au potentiel mécanisme d'action de ces peptides. En effet, les analyses DSC ont permis de démontrer que ces séquences ne forment pas de pores dans des bicouches lipidiques à la  $T_m$  ou en phase gel. De plus, l'influence de HCV7 sur la membrane semble dépendre d'une agrégation du peptide à son contact, suggérant un comportement similaire à certains CPPs ou AMPs. Le marquage ponctiforme observé lors des expériences de microscopie suggérant la formation de vésicules, le peptide HCV7 pourrait entraîner la pénétration cellulaire en formant des agrégats au contact de la membrane, qui sont internalisés par endocytose dans un deuxième temps.

Enfin, ces résultats sont à mettre en relation avec nos hypothèses de départ, à savoir l'utilisation de séquences relativement courtes et le remplacement des résidus cystéine par des résidus sérine. De fait, la taille des peptides et l'absence de ponts disulfures pourraient gêner la structuration du peptide en une conformation potentiellement importante pour l'activité membranaire. En effet, les études structurales menées par le Pr. Carotenuto de l'Université de Naples, ont montré que le peptide HCV7 restait majoritairement non-structuré au contact de micelles. Il pourrait donc être intéressant de synthétiser de nouvelles séquences, plus longues et comportant des résidus pouvant être importants pour l'activité membranaire (résidus cationiques comme des arginines, ou induisant une structuration particulière comme des prolines ou cystéines). Puisque de nombreuses études semblent identifier la région extracellulaire de la protéine E1 du VHC comme particulièrement importante pour la fusion virale, une perspective intéressante serait de synthétiser et d'étudier l'activité membranaire des séquences qui la composent (Tableau 16).

Peptide	Séquence
HCV8	<sup>268</sup> SATLCSALYVGDLCSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQD <sup>304</sup> C
HCV9	<sup>268</sup> SATLCSALYVGDLCS <sup>282</sup> G
HCV10	<sup>290</sup> LCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQD <sup>304</sup> C
HCV11	<sup>283</sup> SVFLVGQLFTFSPRR <sup>298</sup> H

Tableau 16 : Séquences de la protéine E1 intéressantes à étudier



## **Experimental part**



## Experimental part

### Experimental part

#### 1. Materials and methods

Solvents were dried and distilled as follows:

- THF was distilled on sodium and benzophenone under inert atmosphere (Ar)
- DCM was distilled on calcium hydride under inert atmosphere (Ar)
- DMF was distilled on sodium hydride under inert atmosphere (Ar)
- ACN was distilled on calcium hydride under inert atmosphere (Ar)
- MeOH was dried with molecular sieves 4Å under inert atmosphere (Ar)

Reactions were monitored by TLC (silica 60 F<sub>254</sub> provided by Merck), revealed under a 254 nm UV lamp and using a 10 % sulfuric acid in ethanol, a ninhydrine solution with acetic acid in ethanol (1.5 g/500 mL plus 5 mL AcOH), a KMnO<sub>4</sub> solution in water (3 g plus 20 g potassium carbonate plus 5 mL 5% NaOH in 300 mL) or a phosphomolybdic acid solution in ethanol (6 g in 100 mL). Purifications on silica gel were performed using a Macherey-Nagel 70-230 mesh silica.

HPLC-MS analyses were performed on a Alliance Chromatography (Waters) apparatus with a Phenomenex Kinetex C18 column (2.6µm , 3.0 × 100 mm) working at 0.6 mL/min, with the indicated linear gradients, coupled to a single quadrupole ESI-MS (Micromass ZQ). The solvent systems used were: A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O) and B (0.1 % TFA in ACN).

UPLC-MS analyses were performed on a Waters Acquity UPLC apparatus, which was equipped with a Waters Acquity UPLC BEH C18column (1.7 µm, 2.1 × 50 mm) working at 0.6 mL/min, with the indicated linear gradients, coupled to a single quadrupole ESI-MS (Waters 3100 Mass Detector). The solvent systems used were: A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O) and B (0.1 % TFA in ACN).

NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra were acquired with a Jeol ECX 400 (400 MHz <sup>1</sup>H and 101 MHz <sup>13</sup>C) spectrometer. Chemical shift (δ) were reported in part per million (ppm) using tetramethylsilane as reference (δ 0.00 ppm). Data are reported as followed: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet), coupling constant (Hz), intergration, attribution.

Infrared spectra were acquired with a Brücker Tensor.

Optical rotations were measured with a JASCO P1010 polarimeter.

HRMS analyses were performed by the Small Molecule Mass Spectrometry platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif - [www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr))

Melting points were measured using a capillary tube with a Büchi melting point apparatus.

Automated SPPS were performed using a Liberty Blue automated microwave synthesizer (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) following the Fmoc/*t*Bu methodology.

Peptides were purified by RP-HPLC using a Phenomenex Jupiter C18 column (10µm, 250 × 10 mm) or a Phenomenex Jupiter C18 column (10µm, 250 mm × 4.6 mm) and a H<sub>2</sub>O/ACN mixture as eluent.

Peptides were lyophilized using a Edwards (Crawley, England) Modulyo or a 5Pascal (Milan, Italy) Lio5P lyophilizer.

Centrifugations were performed with a Hettich Universal 320 centrifuge.

## Experimental part

UV spectra were acquired with a Jasco V-730 spectrophotometer.

DSC experiments were performed on a MicroSC calorimeter (Setaram Instrumentation). For each analysis, three scans from 40°C to 5°C were performed with a scan rate of 1°C/min and waiting 15 min between sequential scans in a series to allow thermal equilibration. Data analysis was performed by the Calisto Software provided by Setaram Instrumentation and Origin software.

ITC experiments were performed on a ITC200 calorimeter (MicroCal Systems, Malvern). Data analysis was performed with the Origin software provided by MicroCal and using the one-site model for fitting after withdrawing the lipids dilution heat.

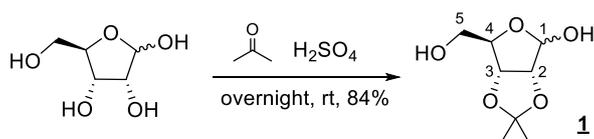
Time-course fluorescence measurements were recorded with a Jasco Fluorescence Spectrophotometer at the desired temperature (controlled by a Jasco MCB-100 mini circulation bath).

Fusion/hemifusion experiments by DLS were performed using a Zeta-Sizer Nano (Malvern) with the following parameters:  $n = 1.345$ , absorption = 0.001 and considering water as solvent.

Fluorescence microscopy was performed with a Leica MLB microscope. All pictures were acquired using a x63 zoom and analyzed with Image J software.

## 2. Organic Synthesis

### 2,3-O-Isopropylidene-D-ribofuranose (**1**)

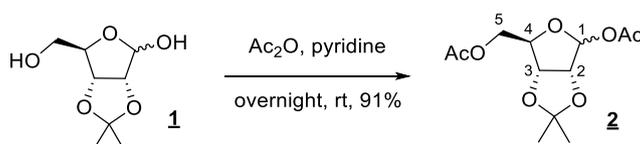


To a solution of D-ribofuranose (500 mg ; 3.33 mmol) in acetone (10 mL), few drops of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> are added. The reaction mixture is left overnight at room temperature under stirring. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then quenched with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution at 0°C (pH 7). The reaction mixture is filtered then concentrated under reduced pressure yielding **1** (522 mg ; 84%) as a yellow oil. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>231</sup>

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.40 (bs, 1H, H<sub>1</sub>), 4.82 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.56 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.39 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 3.76-3.62 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.47 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.30 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm

R<sub>f</sub> = 0.28 (cyclohexane/AcOEt 3/7 ; 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH).

### 1,5-Di-O-acetyl-2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranose (**2**)



To a solution of **1** (21 g ; 111 mmol) in pyridine (150 mL), acetic anhydride (80 mL ; 847 mmol) is added under stirring. The reaction mixture is stirred at room temperature overnight. The reaction is monitored by TLC. Excess of anhydride is then quenched with cold MeOH and pyridine is co-

<sup>231</sup> Nagarapu, L.; Karnakanti, S.; Bantu, R. *Tetrahedron* **2012**, 68 (29), 5829–5832.

## Experimental part

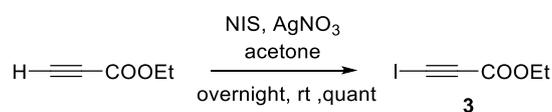
evaporated with toluene under reduced pressure. The crude product is then filtered on silica gel and rinsed with a cyclohexane/AcOEt solution which is removed under reduced pressure yielding **2** as a yellow oil (27.5 g ; 91%). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>232</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 6.20 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 4.70 (bs, 2H, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>), 4.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 4.08-4.12 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 2.07 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.31 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.4 (-OCOCH<sub>3</sub>), 169.3 (-OCOCH<sub>3</sub>), 113.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 102.2 (C<sub>1</sub>), 85.4 (C<sub>4</sub>), 85.1 (C<sub>3</sub>), 81.6 (C<sub>2</sub>), 64.1 (C<sub>5</sub>), 26.5 (-OCOCH<sub>3</sub>), 25.1 (-OCOCH<sub>3</sub>), 21.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

R<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/AcOEt 2/1 ; 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH).

### Ethyl 3-iodopropiolate (**3**)

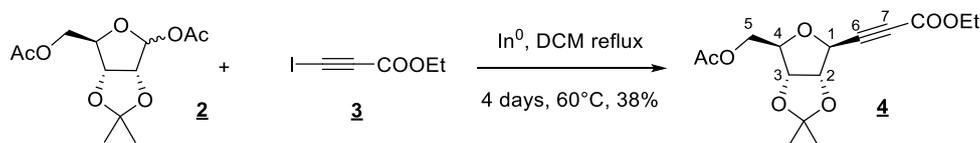


To a solution of ethyl propiolate (4.5 mL ; 44.8 mmol) in acetone (200 mL), NIS (12.2 g ; 54.2 mmol) and AgNO<sub>3</sub> (768 mg ; 4.52 mmol) are added. The reaction mixture is then kept overnight at room temperature under inert atmosphere and protected from light with aluminum foil. The reaction mixture is filtered on Celite, rinsed with acetone and concentrated under reduced pressure. The crude is then dissolved in diethyl ether and washed four times with water. The organic phase is then dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure yielding the ethyl 3-iodopropiolate **3** as a pale yellow powder (10,02 g ; quant). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>233</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.21 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 152.3 (C=O), 87.1 (-C≡C-COOEt), 62.4 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.9 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.0 (I-C≡C-) ppm.

### Ethyl 3-(5'-O-acetyl-2',3'-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl)propiolate (**4**)



Indium (2.19 g ; 38.2 mmol) is poured into a screw-capped flask and activated by vigorous magnetic stirring for 1h. **2** (2.14 g ; 15.6 mmol), ethyl 3-iodopropiolate **3** (3.5 g ; 31.2 mmol) and DCM (25 mL) are then added and the mixture is heated above reflux (60°C) for four days. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then filtered on Celite and washed two times with DCM. After solvent evaporation under reduced pressure, the crude is purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 8/2 as eluent yielding **4** as a yellow oil (935 mg ; 38%). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>58</sup>

<sup>232</sup> Kam, B. L.; Barascut, J.-L.; Imbach, J.-L. *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 285–293.

<sup>233</sup> Laurence, C.; Queignec-Cabanetos, M.; Wojtkowiak, B. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 135–138.

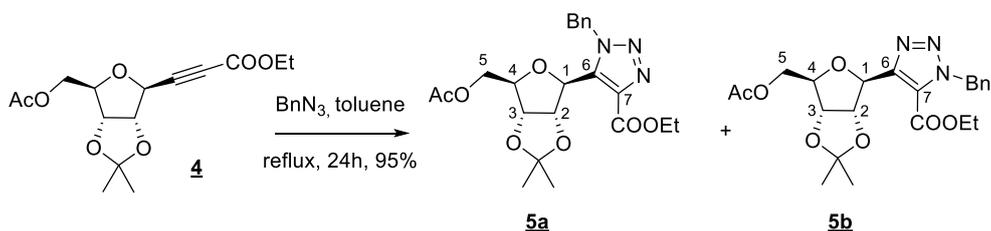
## Experimental part

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.88 (dd,  $J = 2.3$  Hz, 6.0 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.79 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.70 (dd,  $J = 2.1$  Hz, 6.0 Hz, 1H;  $\text{H}_3$ ), 4.33 (dt,  $J = 2.1$  Hz, 5.3 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 4.14-4.26 (m, 4H,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{H}_5$ ), 2.09 (s, 3H,  $-\text{OCOCH}_3$ ), 1.49 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.32 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.3 ( $-\text{COCH}_3$ ), 151.6 ( $-\text{CO}_2\text{Et}$ ), 112.8 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 84.6 ( $\text{C}_2$ ), 82.6 ( $\text{C}_4$ ), 82.1 ( $\text{C}_6$ ), 81.3 ( $\text{C}_3$ ), 77.0 ( $\text{C}_7$ ), 73.4 ( $\text{C}_1$ ), 62.5 ( $\text{C}_5$ ), 61.0 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25.6 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.8 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 19.6 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 12.7 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

Rf = 0.33 (cyclohexane/AcOEt 7/3 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

### Ethyl 1-benzyl-5-(5'-O-acetyl-2',3'-O-isopropylidene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**5a**) and ethyl 1-benzyl-4-(5'-O-acetyl-2',3'-O-isopropylidene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazole-5-carboxylate (**5b**)



Ribosylpropiolate **4** (1 g ; 3.21 mmol), benzyl azide (1.79 g ; 13.46 mmol) and toluene (10 mL) are poured into a round bottom flask. The reaction mixture is then heated to reflux under stirring for 24h. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then concentrated under reduced pressure yielding a brown oil. The crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 7/3 yielding the two isomers **5a** (737 mg) and **5b** (618 mg) with a 95% overall yield. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>58</sup>

#### **5a:**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.34 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, Ph), 7.20 – 7.13 (m, 2H, Ph), 5.78 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.70 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.57 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.50 (dd,  $J = 7.1$ , 5.0 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.43 (m,  $\text{H}_3$  and  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.35 – 4.26 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ), 4.13 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 2.07 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.53 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.45 – 1.40 (m, 3H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.19 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.6 ( $-\text{COCH}_3$ ), 161.1 ( $-\text{CO}_2\text{Et}$ ), 137.8 ( $\text{C}_6$ ), 137.7 ( $\text{C}_7$ ), 134.9 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ph), 129.1, 128.7, 127.1 (Ph), 116.2 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 84.4 ( $\text{C}_2$ ), 82.8 ( $\text{C}_4$ ), 81.2 ( $\text{C}_3$ ), 77.1 ( $\text{C}_1$ ), 63.6 ( $\text{C}_5$ ), 61.6 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 27.3 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.3 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.9 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 14.4 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

Rf = 0.17 (cyclohexane/AcOEt 7/3 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

#### **5b:**

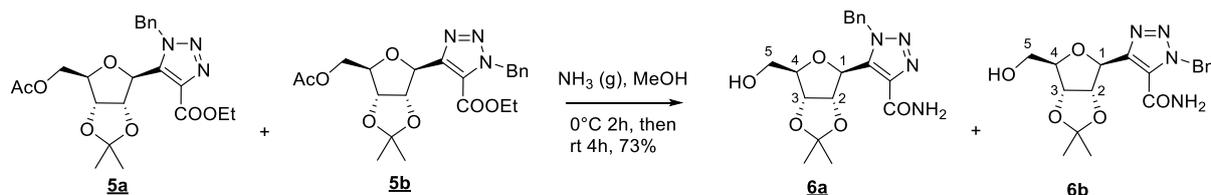
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.43 – 7.17 (m, 5H, Ph), 5.89 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.85 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.53 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 5.30 (dd,  $J = 6.4$ , 3.4 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.83 (dd,  $J = 6.4$ , 3.1 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4.35 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.31 – 4.22 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ), 4.16 – 4.08 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 2.04 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.57 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.41 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.34 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

## Experimental part

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.8 ( $-\text{COCH}_3$ ), 158.3 ( $-\text{CO}_2\text{Et}$ ), 148.6 ( $\text{C}_6$ ), 134.9 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ph), 128.8, 128.5, 128.0 (Ph), 127.9 ( $\text{C}_7$ ), 114.4 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 83.9 ( $\text{C}_2$ ), 83.6 ( $\text{C}_4$ ), 82.8 ( $\text{C}_3$ ), 78.1 ( $\text{C}_1$ ), 64.3 ( $\text{C}_5$ ), 62.2 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 54.0 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 27.4 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.5 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.9 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 14.1 ppm ( $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

Rf = 0.25 (cyclohexane/AcOEt 7/3 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

### 1-Benzyl-5-(2',3'-O-isopropylidene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazole-4-carboxamide (**6a**) and 1-Benzyl-4-(2',3'-O-isopropylidene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazole-5-carboxamide (**6b**)



To a solution of **5a** and **5b** (2.4 g ; 5.39 mmol ; a/b 55/45) in MeOH (60 mL),  $\text{NH}_3$  (g) is bubbled at  $0^\circ\text{C}$  for 2h under stirring. The reaction mixture is then kept in a closed vessel at room temperature for 24h. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then concentrated under reduced pressure and purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/1 as eluent yielding the isomer mixture **6a/6b** (a/b 77/23) as a white powder (1.47 g ; 73%). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>58</sup>

#### **6a:**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.38-7.27 (m, 3H, Ph), 7.19-7.12 (m, 2H, Ph), 5.68 (d,  $J = 14$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.62 (d,  $J = 14$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.98 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4.93 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 5.6 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.15 (ddd,  $J = 2.8$  Hz, 1.9 Hz, 1.8 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3.84 (dd,  $J = 11.1$  Hz, 1.8 Hz, 1H,  $\text{H}_{5a}$ ), 3.70 (dd,  $J = 11.1$  Hz, 1.9 Hz, 1H,  $\text{H}_{5b}$ ), 1.44 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.25 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

Rf = 0.23 (cyclohexane/AcOEt 1/1 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

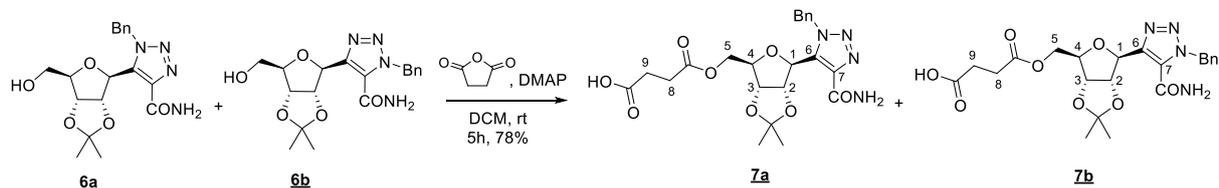
#### **6b:**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.38-7.27 (m, 3H, Ph), 7.19-7.12 (m, 2H, Ph), 5.90 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.85 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.13 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 5.08 (dd,  $J = 5.8$  Hz, 4.8 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.87 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4.22 (dt,  $J = 3.2$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3.77 (dd,  $J = 10.9$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_{5a}$ ), 3.59 (dd,  $J = 10.9$  Hz, 3.2 Hz, 1H,  $\text{H}_{5b}$ ), 1.56 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.34 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

Rf = 0.16 (cyclohexane/AcOEt 1/1 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

## Experimental part

### 1-Benzyl-5-[2',3'-O-isopropylidene-5'-O-(3''-carboxy-1''-oxopropyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-1,2,3-triazole-4-carboxamide (**7a**) and 1-Benzyl-4-[2',3'-O-isopropylidene-5'-O-(3''-carboxy-1''-oxopropyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-1,2,3-triazole-5-carboxamide (**7b**)



To a solution of **6a/6b** (500 mg ; 1.34 mmol ; a/b 77/23) in freshly distilled DCM (10 mL), succinic anhydride (201 mg ; 2 mmol) and DMAP (245 mg ; 2 mmol) are added. The reaction mixture is kept at room temperature under stirring and inert atmosphere for 5h. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then washed two times with 50% NH<sub>4</sub>Cl and the aqueous phase is extracted two times with AcOEt. The organic phases are combined and washed once with saturated NaCl. After a few hours at room temperature, a white precipitate appeared in the organic phase. This precipitate is filtered yielding the pure **7a** (427 mg) as a white powder. The organic phase is concentrated under reduced pressure and the resulting crude is purified on silica gel using DCM/MeOH 95/5 + 1% AcOH as eluent yielding **7b** (68 mg) as a white solid. The compounds are obtained with a 78% overall yield.

#### **7a:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.33 – 7.24 (m, 3H, Ph), 7.14 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, Ph), 5.67 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 5.62 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 5.53 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.67 (dd,  $J$  = 6.9, 5.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.51 (dd,  $J$  = 6.9, 4.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.27 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 4.10 (q,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 2.53 (s, 4H, H<sub>8</sub> and H<sub>9</sub>), 1.46 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.16 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.51 (-COOH), 172.44 (-COOC<sub>5</sub>), 162.70 (-CONH<sub>2</sub>), 139.20 (C<sub>7</sub>), 136.21 (C<sub>6</sub>), 134.58 (C<sub>IV</sub> Ph), 129.03 (Ph), 128.63 (Ph), 127.14 (Ph), 115.91 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 84.26 (C<sub>2</sub>), 82.67 (C<sub>4</sub>), 81.30 (C<sub>3</sub>), 76.24 (C<sub>1</sub>), 63.62 (C<sub>5</sub>), 53.06 (CH<sub>2</sub>Ph), 28.91 (C<sub>9</sub>), 28.74 (C<sub>8</sub>), 26.94 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.04 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

R<sub>f</sub> = 0.37 (DCM/MeOH 95/5 + 1% AcOH ; KMnO<sub>4</sub>).

IR (ATR): 3367, 3196, 1744, 1713, 1655, 1593, 1213, 1086 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: ESI+ C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> calc = 475.1829 ; found = 475.1831

$[\alpha]_D^{20}$  = -16.80 ( $c$  0.13, MeOH). m.p. 191-193°C.

#### **7b:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.35 – 7.19 (m, 5H, Ph), 5.90 (d,  $J$  = 14.3 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 5.81 (d,  $J$  = 14.3 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 5.59 (dd,  $J$  = 6.5, 3.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.20 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.70 (dd,  $J$  = 6.5, 3.5 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.32 (ddd,  $J$  = 7.6 Hz, 6.5 Hz, 3.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 4.07 (dd,  $J$  = 12.1, 6.5 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 3.92 (dd,  $J$  = 12.1, 7.6 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 2.51 – 2.46 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 2.44 – 2.37 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 1.53 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.36 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.86 (-COOH), 172.15 (-COOC<sub>5</sub>), 162.23 (-CONH<sub>2</sub>), 144.12 (C<sub>6</sub>), 135.15 (C<sub>IV</sub> Ph), 128.97 (C<sub>7</sub>), 128.78 (Ph), 128.40 (Ph), 128.20 (Ph), 114.88 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 83.74 (C<sub>4</sub>),

## Experimental part

82.46 (C<sub>2</sub>), 81.59 (C<sub>3</sub>), 78.90 (C<sub>1</sub>), 63.62 (C<sub>5</sub>), 53.70 (CH<sub>2</sub>Ph), 28.87 (C<sub>9</sub>), 28.69 (C<sub>8</sub>), 27.05 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.22 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

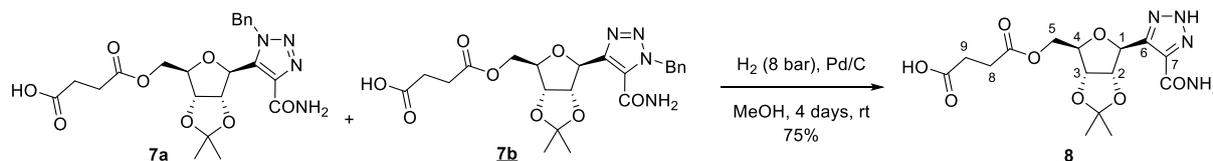
R<sub>f</sub> = 0.52 (DCM/MeOH 95/5 + 1% AcOH ; KMnO<sub>4</sub>).

IR (ATR): 3421, 3320, 3172, 1732, 1668, 1598, 1192, 1071 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: ESI+ C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> calc = 475.1836 ; found = 475.1838

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -41.05 (c 0.83, MeOH). m.p. 162-164°C

### 5-[2',3'-O-isopropylidene-5'-O-(3''-carboxy-1''-oxopropyl)-β-D-ribofuranosyl]-2H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (**8**)



A solution containing a mixture of **7a** and **7b** (444 mg ; 0.94 mmol) in MeOH (50 mL) is poured in a Parr bomb containing Pd on charcoal (1 g ; 0.94 mmol) in MeOH (10 mL). The mixture is left with H<sub>2</sub> (8 bar) under stirring during 4 days. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is filtered through a membrane yielding, after evaporation under reduced pressure, **8** as a white powder (270 mg ; 75%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5.55 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 5.10 (dd, *J* = 6.5, 3.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.79 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.33 – 4.10 (m, 3H, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 2.54 (bs, 4H, H<sub>8</sub> and H<sub>9</sub>), 1.54 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.34 (s, 3H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

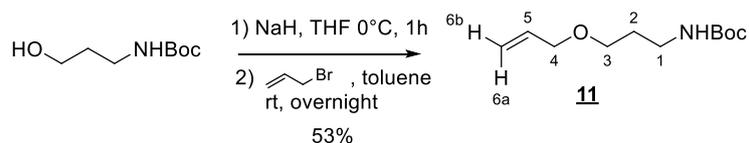
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 174.98 (-C(=O)OH), 172.63 (-C(=O)OC<sub>3</sub>), 163.53 (-C(=O)NH<sub>2</sub>), 143.83 (C<sub>6</sub>), 138.06 (C<sub>7</sub>), 114.16 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 84.86 (C<sub>2</sub>), 83.24 (C<sub>4</sub>), 82.33 (C<sub>3</sub>), 78.42 (C<sub>1</sub>), 64.03 (C<sub>5</sub>), 28.56 (C<sub>9</sub>), 28.50 (C<sub>8</sub>), 26.26 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.28 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

IR (ATR): 3459, 3222, 1737, 1699, 1652, 1572 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: ESI+ C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> calc = 383.1209 ; found = 383.1203.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -12.87 (c 1.0, MeOH). m.p. 160-163°C.

### *tert*-Butyl [3-(prop-2-en-1-yloxy)propyl]carbamate (**11**)



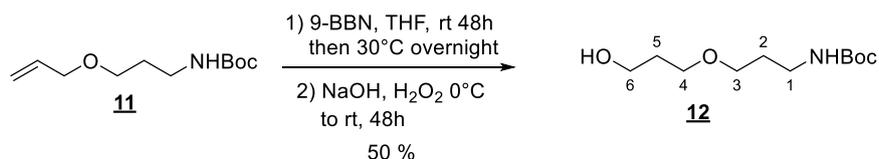
To a solution of *tert*-butyl (3-hydroxypropyl)carbamate (23 g ; 131.4 mmol) in freshly distilled THF (250 mL) cooled at 0°C, sodium hydride 60% (6.83 g ; 171 mmol) is added portionwise under inert atmosphere and stirring. After 1h, a solution of allylbromide (16 mL ; 184 mmol) in toluene (30 mL) is added dropwise at 0°C as described by Khorev *et al.*<sup>130</sup> The reaction mixture is warm up to room temperature and kept under inert atmosphere and stirring overnight. Excess sodium hydride is then quenched by slowly adding isopropanol then water at 0°C. THF is then removed gently under reduced

## Experimental part

pressure and the resulting aqueous phase is extracted with AcOEt (4 x 20 mL). The organic phase is then concentrated under reduced pressure and the residue is purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 9/1 as eluent yielding **11** as a pale yellow oil (15.04 g ; 53%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6.79 (m, 1H,  $-\text{NH}(\text{CO})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 5.86 (ddt,  $J = 17.2$  Hz, 10.5 Hz, 5.3 Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 5.22 (dd,  $J = 17.2, 1.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ), 5.12 (dd,  $J = 10.5, 1.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ), 3.89 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{H}_4$ ), 3.35 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_3$ ), 2.96 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_1$ ), 1.60 (tt,  $J = 6.6$  Hz, 6.4 Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 1.36 (s, 9H,  $-\text{NH}(\text{CO})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

### tert-Butyl [3-(3-hydroxypropoxy)propyl]carbamate (**12**)

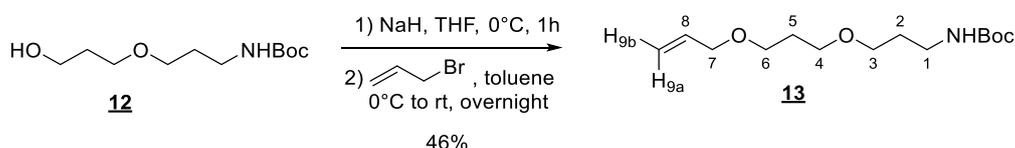


To a solution of **11** (3 g ; 14 mmol) in freshly distilled THF (20 mL), a 0.5M solution of 9-BBN in THF (50 mL ; 25 mmol) is added dropwise. The reaction mixture is then kept at room temperature under stirring for 48h then heated to 30°C overnight as described by Khorev *et al.*<sup>130</sup> The reaction is monitored by TLC. A 3M NaOH solution (50 mL ; 140 mmol) is then added dropwise at 0°C followed by a 35% (wt) hydrogen peroxide solution (12 mL ; 140 mmol). The reaction mixture is then kept at room temperature under inert atmosphere and stirring for 48h and THF is removed under reduced pressure. The resulting aqueous phase is extracted four times with AcOEt then the organic phase is washed with saturated NaCl solution, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 4/6 as eluent yielding **12** (1.63 g ; 50%) as a colorless oil.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.83 (bs, 1H,  $-\text{NH}(\text{CO})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.77 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_6$ ), 3.58 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_4$ ), 3.49 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_3$ ), 3.23 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_1$ ), 1.82 (tt,  $J = 5.7$  Hz, 5.6 Hz, 2H,  $\text{H}_5$ ), 1.77 – 1.68 (tt,  $J = 6.2$  Hz, 6.0 Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 1.43 (s, 9H,  $-\text{NH}(\text{CO})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

R<sub>f</sub> = 0.24 (cyclohexane/AcOEt 1/1 ; ninhydrin).

### tert-Butyl {3-[3-(prop-2-en-1-yloxy)propoxy]propyl}carbamate (**13**)



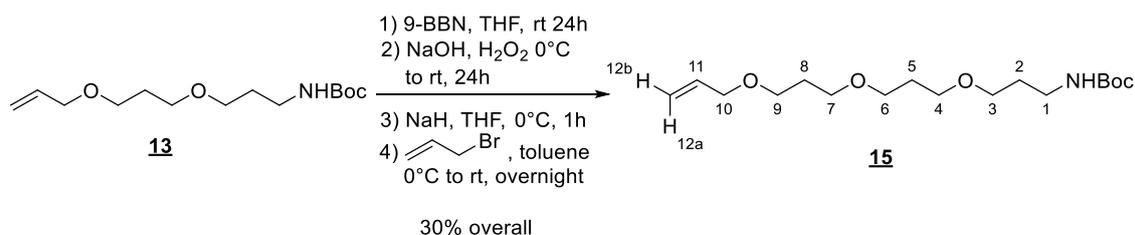
To a solution of **12** (1.32 g ; 5.67 mmol) in freshly distilled THF (30 mL) cooled at 0°C, sodium hydride 60% (680 mg ; 17 mmol) is added portionwise under inert atmosphere and stirring. After 1h, a solution of allylbromide (1.6 mL ; 18.1 mmol) in toluene (3.2 mL) is added dropwise at 0°C as described by Khorev *et al.*<sup>130</sup> The reaction mixture is warmed up to room temperature and kept under inert atmosphere and stirring overnight. Excess sodium hydride is then quenched by slowly adding isopropanol then water at 0°C. THF is then removed gently under reduced pressure and the resulting aqueous phase is extracted with AcOEt (6 x 40 mL). The organic phase is then concentrated under reduced pressure and the residue is purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 4/1 as eluent yielding **13** as a pale yellow oil (716 mg ; 46%).

## Experimental part

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.60 (ddt,  $J = 17.2$  Hz, 10.5 Hz, 5.3 Hz, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.26 (ddt,  $J = 17.2$ , 1.8 Hz, 1.8 Hz, 1H,  $\text{H}_{9a}$ ), 5.17 (ddt,  $J = 10.5$ , 1.8 Hz, 1.3 Hz, 1H,  $\text{H}_{9b}$ ), 4.91 (s, 1H, -NH(CO)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.97 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{H}_7$ ), 3.61 – 3.39 (m, 6H,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_4$  and  $\text{H}_3$ ), 3.22 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_1$ ), 1.85 (tt,  $J = 6.6$  Hz, 6.3 Hz, 2H,  $\text{H}_5$ ), 1.74 (tt,  $J = 6.7$  Hz, 6.5 Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 1.43 (s, 9H, -NH(CO)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

Rf = 0.27 (cyclohexane/AcOEt 4/1 ; ninhydrin).

### tert-Butyl (3-(3-(3-(allyloxy)propoxy)propoxy)propyl)carbamate (**15**)



To a solution of **13** (607 mg ; 2.22 mmol) in freshly distilled THF (12 mL), a 0.5M solution of 9-BBN in THF (8 mL ; 4 mmol) is added dropwise. The reaction mixture is then kept at room temperature under stirring for 24h. The reaction is monitored by TLC. A 3M NaOH solution (8 mL ; 22.2 mmol) is then added dropwise at 0°C followed by a 35% (wt) hydrogen peroxide solution (2.5 mL ; 29.2 mmol) as described by Khorev *et al.*<sup>130</sup> The reaction mixture is then kept at room temperature under inert atmosphere and stirring for 24h and THF is removed under reduced pressure. The resulting aqueous phase is extracted four times with AcOEt then the organic phase is washed with saturated NaCl solution, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/2 as eluent yielding an unsperable mixture of compound **14** (592 mg) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.

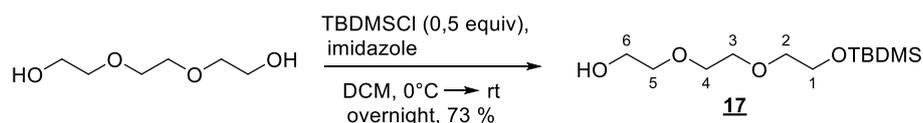
To a solution of crude **14** (592 mg) in freshly distilled THF (15 mL) cooled at 0°C, sodium hydride 60% (240 mg ; 6 mmol) is added portionwise under inert atmosphere and stirring. After 1h, a solution of allylbromide (0.6 mL ; 6.4 mmol) in toluene (1.5 mL) is added dropwise at 0°C as described by Khorev *et al.*<sup>130</sup> The reaction mixture is warmed up to room temperature and kept under inert atmosphere and stirring overnight. Excess sodium hydride is then quenched by slowly adding isopropanol then water at 0°C. THF is then removed gently under reduced pressure and the resulting aqueous phase is extracted with AcOEt (4 x 30 mL). The organic phase is then concentrated under reduced pressure and the residue is purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 7/3 as eluent yielding **14** as a pale yellow oil (222 mg ; 30 % overall).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.91 (ddd,  $J = 17.3$ , 10.1, 5.6 Hz, 1H,  $\text{H}_{11}$ ), 5.26 (dd,  $J = 17.3$ , 1.3 Hz, 1H,  $\text{H}_{12a}$ ), 5.17 (dd,  $J = 10.1$ , 1.3 Hz, 1H,  $\text{H}_{12b}$ ), 3.96 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{10}$ ), 3.59 – 3.39 (m, 10H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$  and  $\text{H}_9$ ), 3.22 (td,  $J = 6.0$ , 5.8 Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 1.91 - 1.79 (m, 4H,  $\text{H}_5$  and  $\text{H}_8$ ), 1.74 (tt,  $J = 6.2$ , 6.0 Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 1.43 (s, 9H, -NH(CO)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

Rf = 0.35 (cyclohexane/AcOEt 7/3).

### 2-(2-[2-{O-tert-Butyl(dimethyl)silyloxy}ethoxy]ethoxy)ethanol (**17**)

## Experimental part

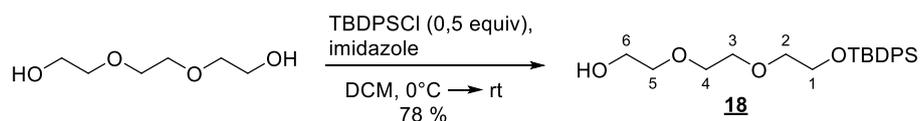


To a solution of triethylene glycol (10 g ; 66.6 mmol) dissolved in DCM freshly distilled (100 mL), imidazole (2.95 g ; 43.3 mmol) and TBDMSCl 1M in DCM (33 mL ; 33.3 mmol) are added at 0°C. The reaction mixture is left overnight under stirring and inert atmosphere. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then washed three times with a NH<sub>4</sub>Cl 50% solution (3x100 mL) and once with saturated NaCl (50 mL). The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 2/1 yielding **17** (6.4 g ; 73 %) as a colorless oil. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>234</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.76 - 3.70 (m, 4H, H<sub>5</sub> and H<sub>6</sub>), 3.67 (s, 4H, H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>), 3.65 – 3.59 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>1</sub>), 0.89 (s, 9H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.06 (s, 6H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 72.80 (C<sub>1</sub> and C<sub>5</sub>), 70.90 (C<sub>3</sub>), 70.59 (C<sub>4</sub>), 62.83 (C<sub>2</sub>), 61.94 (C<sub>6</sub>), 26.13 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.52 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) -5.15 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

### 2-(2-[2-{O-tert-Butyl(diphenyl)silyloxy}ethoxy]ethoxy)ethanol (**18**)

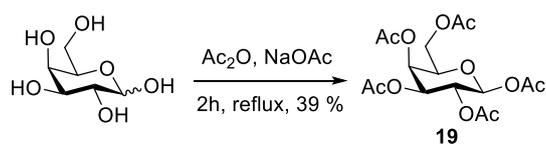


To a solution of triethylene glycol (4.51 g ; 30 mmol) dissolved in DCM freshly distilled (100 mL), imidazole (1.33 g ; 19.5 mmol) and TBDMSCl 1M in DCM (4 mL ; 15 mmol) are added at 0°C. The reaction mixture left overnight under stirring and inert atmosphere. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is then washed two times with a 50% NH<sub>4</sub>Cl solution (2x50 mL) and once with saturated NaCl (50 mL). The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 2/1 yielding **18** (6.4 g ; 78 %) as a colorless oil. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>235</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 – 7.62 (m, 4H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 7.46 – 7.33 (m, 6H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 3.81 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.72 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.66 (s, 4H, H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>), 3.61 (m, 4H, H<sub>5</sub> and H<sub>1</sub>), 2.35 (bs, 1H, -OH), 1.05 (s, 9H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 135.73 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 133.69 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 129.6 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 127.74 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 72.55 (C<sub>5</sub> and C<sub>1</sub>), 70.90 (C<sub>3</sub> or C<sub>4</sub>), 70.61 (C<sub>3</sub> or C<sub>4</sub>), 63.49 (C<sub>2</sub>), 61.94 (C<sub>6</sub>), 26.83 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 19.27 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>) ppm.

### 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (**19**)



<sup>234</sup> Witte, P.; Beuerle, F.; Hartnagel, U.; Lebovitz, R.; Savouchkina, A.; Sali, S.; Guldi, D.; Chronakis, N.; Hirsch, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (22), 3599.

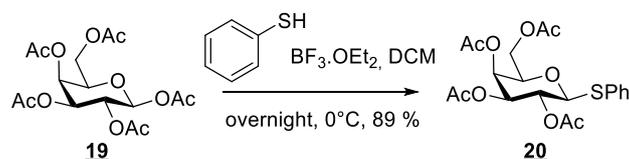
<sup>235</sup> Forsyth, C. J.; Ying, L.; Chen, J.; La Clair, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (12), 3858–3859.

## Experimental part

To a solution of D-galactose (10 g ; 55.6 mmol) dissolved in acetic anhydride (150 mL), sodium acetate (45 g ; 556 mmol) is added. The reaction mixture is heated to reflux (140°C) and left for 2h. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is diluted in water and extracted by AcOEt. The resulting organic phase dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified by recrystallization in hexane/AcOEt 2/1 then filtered to yield the pure β-D-galactopyranoside **19** (8.42 g ; 39 %) as a white powder. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>236</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 5.42 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.33 (dd, *J* = 10.3, 8.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.06 (dd, *J* = 10.3, 3.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.19 – 4.01 (m, 3H, H<sub>5</sub> and H<sub>6</sub>), 2.16 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 6H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>) ppm.

### 1-O-Thiophenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (**20**)

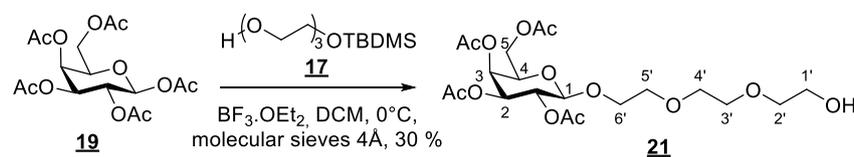


To a solution of **19** (3g ; 7.7 mmol) and thiophenol (1.2 mL ; 11.5 mmol) dissolved in freshly distilled DCM (5 mL), 48% BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (1.5 mL ; 11.5 mmol) was added dropwise at 0°C. The reaction mixture is stirred overnight under inert atmosphere (Ar). The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is quenched with excess trimethylamine at 0°C, diluted with DCM and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 2/1 as eluent, yielding **20** (2.99 g ; 89%) as a white powder. Analytical data are in accordance with the literature.<sup>237</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.55 – 7.47 (m, 2H, -SPh), 7.36 – 7.28 (m, 3H, -SPh), 5.42 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.24 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.05 (dd, *J* = 9.9, 3.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.71 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.22 – 4.08 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.94 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 2.12 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.68 (-OCOCH<sub>3</sub>), 170.49 (-OCOCH<sub>3</sub>), 170.35 (-OCOCH<sub>3</sub>), 169.73 (-OCOCH<sub>3</sub>), 132.71 (-SPh), 129.17 (-SPh), 128.43 (-SPh), 86.88 (C<sub>1</sub>), 74.63 (C<sub>5</sub>), 72.23 (C<sub>3</sub>), 67.44 (C<sub>2</sub> and C<sub>4</sub>), 61.87 (C<sub>6</sub>), 21.15 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.90 (O-COCH<sub>3</sub>) ppm.

### 2-(2-[2-Hydroxyethoxy]ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (**21**)



To a solution of dried **19** (390 mg ; 1 mmol) and **17** (344 mg ; 1.3 mmol) in freshly distilled DCM (10 mL), molecular sieves (4Å) and 48% BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (0.25 mL ; 1.3 mmol) were added dropwise at 0°C. The reaction mixture is left under stirring and inert atmosphere (Ar) for 4h. The reaction is monitored

<sup>236</sup> Poonthiyil, V.; Golovko, V. B.; Fairbanks, A. J.; Fairhurst, S. A.; Innocenti, P.; Fairbanks, A. J.; Donohoe, T. J.; Davis, B. G.; Russell, D. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5215–5223.

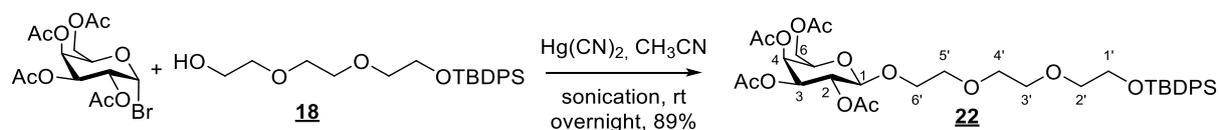
<sup>237</sup> Ramrao Patil, P.; Ravindranathan Kartha, K. P. *Green Chem.* **2009**, *11* (7), 953.

## Experimental part

by TLC. The reaction mixture is washed with a 50% NH<sub>4</sub>Cl solution. After extraction by DCM, the resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduce pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/3 then pure AcOEt as eluent, yielding **21** (147 mg ; 30%). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>236</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 5.36 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.19 (dd, *J* = 10.4 Hz, 8.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.00 (dd, *J* = 10.4 Hz, 3.2 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.24 - 4.19 (m, 1H, OH), 4.19 - 4.05 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.98 - 3.85 (m, 2H, H<sub>5</sub> and H<sub>1'</sub>), 3.77 - 3.55 (m, 11H, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub> and H<sub>6'</sub>), 2.13 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>) ppm.

### 2-(2-[2-{*O*-*tert*-Butyl(diphenyl)silyl}ethoxy]ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside (**22**)



To a solution of dried **18** (2.25 g ; 5.8 mmol) in freshly distilled acetonitrile (100 mL), mercury cyanide (2.2 g ; 8.7 mmol) is added. The reaction mixture is sonicated for 15 min at room temperature and under inert atmosphere and dried acetobromogalactose (3 g ; 7.3 mmol) is added. The reaction mixture is sonicated for 30 min and stirred overnight at room temperature under inert atmosphere (Ar). The reaction mixture is filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is dissolved in AcOEt and washed by a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, a 10 % KI solution, a saturated Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> solution and saturated NaCl. The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is purified on silica gel using DCM/acetone 24/1 as eluent, yielding **22** (3.74 g ; 89%) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.70 – 7.64 (m, 4H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 7.42 – 7.34 (m, 6H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 5.38 (dd, *J* = 3.4, 0.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.20 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.00 (dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.18 – 4.08 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.98 – 3.92 (m, 1H, H<sub>6'</sub>), 3.89 (dt, *J* = 6.7, 0.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.80 (dt, *J* = 5.6, 5.1 Hz, 2H, H<sub>2'</sub>), 3.76 – 3.69 (m, 1H, H<sub>6'</sub>), 3.69 – 3.54 (m, 8H, H<sub>1'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub> and H<sub>5'</sub>), 2.14 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, *J* = 1.8 Hz, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.04 (s, 9H, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.55 (-OCOCH<sub>3</sub>), 170.43 (-OCOCH<sub>3</sub>), 170.33 (-OCOCH<sub>3</sub>), 169.65 (-OCOCH<sub>3</sub>), 135.73 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 133.74 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 129.77 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 127.77 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 101.51 (C<sub>1</sub>), 72.56 (C<sub>1'</sub>), 71.03, 70.73 and 70.40 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub> and C<sub>4'</sub>), 69.27 (C<sub>6'</sub>), 68.89 (C<sub>2</sub>), 67.16 (C<sub>4</sub>), 63.52 (C<sub>5'</sub>), 61.42 (C<sub>6</sub>), 26.86 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ph<sub>2</sub>), 20.85 (-OCOCH<sub>3</sub>), 19.30 (-OCOCH<sub>3</sub>) ppm.

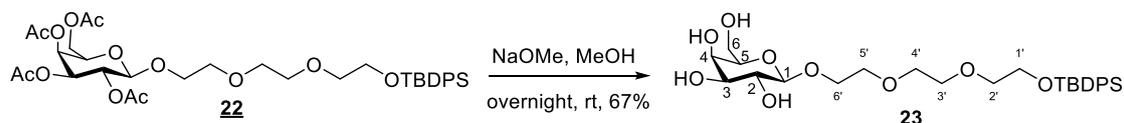
IR (ATR): 2932, 2858, 1747, 1216 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: ESI+ C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>13</sub>Si calc = 736.3359 ; found = 736.3349.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 6.21 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

## Experimental part

### 2-(2-[2-{O-*tert*-Butyl(diphenyl)silyl}ethoxy]ethoxy)ethyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**23**)

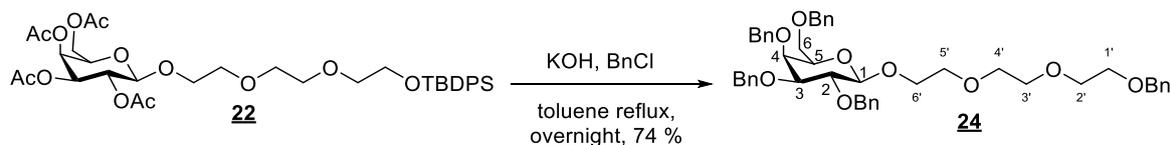


To a solution of galactoside **22** (250 mg ; 0,35 mmol) in dry methanol (4.5 mL) was added a solution of 0.5 M NaOMe in dry methanol (0.5 mL ; obtained by dissolution of 120 mg of metallic Na in 10 mL of dry methanol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction is monitored by TLC. The reaction mixture was neutralized by addition of DOWEX® 50W. The resin was then filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. This compound, obtained in 87% yield as a colorless oil (167 mg) was used in the next step without further purification.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.72 - 7.67 (m, 4H,  $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3\text{Ph}_2$ ), 7.47 - 7.37 (m, 6H,  $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3\text{Ph}_2$ ), 4.23 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.03 - 3.97 (m, 1H,  $\text{H}_1'$ ), 3.83 - 3.44 (m, 17H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_1'$ ,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_4'$ ,  $\text{H}_5'$  and  $\text{H}_6'$ ), 1.03 (s, 9H,  $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3\text{Ph}_2$ ) ppm.

Rf = 0.3 (DCM/MeOH 9:1 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

### 2-(2-[2-{O-Benzyl}ethoxy]ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**24**)



To a solution of **22** (100 mg ; 0.14 mmol) and potassium hydroxide (86 mg ; 1.5 mmol) in toluene (0.5 mL), benzyl chloride (115  $\mu\text{L}$  ; 1 mmol) is added dropwise and the reaction mixture is left overnight at reflux under vigorous stirring. The reaction mixture is diluted with toluene (4.5 mL) and washed with water (4 x 5 mL), a saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (4 x 5 mL) and brine (4 x 5 mL). The resulting organic phase is dried with  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 4/1 then 3/1 as eluent, yielding **24** (72 mg ; 74%).

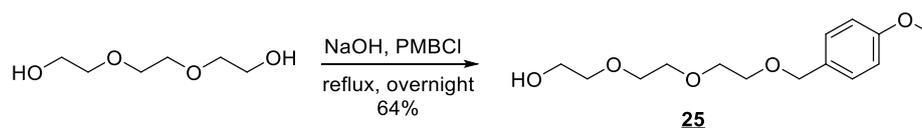
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.35-7.22 (m, 25H, Ph), 4.93 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.93 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.73 (d,  $J = 11.8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.71 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 (d,  $J = 11.8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.59 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.41 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.37 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.37 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.03 - 3.97 (m, 1H,  $\text{H}_1'$ ), 3.86 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3.79 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 7.7 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 3.75 - 3.45 (m, 14H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_1'$ ,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_4'$ ,  $\text{H}_5'$ , and  $\text{H}_6'$ ), 3.48 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 139.04 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ar), 138.80 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ar), 138.73 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ar), 138.44 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ar), 138.08 ( $\text{C}_{\text{IV}}$  Ar), 128.64, 128.56, 128.45, 128.42, 128.37, 128.11, 128.00, 127.96, 127.78, 127.74 (25 x  $\text{C}_{\text{Ph-H}}$ ), 104.29 ( $\text{C}_1$ ), 82.27 ( $\text{C}_3$ ), 79.62 ( $\text{C}_2$ ), 75.22 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.65 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.72 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.56, 73.52 ( $\text{C}_4$  and  $\text{C}_5$ ), 73.41 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.23 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 70.81, 70.52, 69.55, 69.15, 68.99 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - and  $\text{C}_6$ ) ppm.

Rf = 0.72 (Cyclohexane/AcOEt 1/1 ; 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH).

## Experimental part

### 2-(2-{2-[(4-Methoxyphenyl)methoxy]ethoxy}ethoxy)ethanol (**25**)

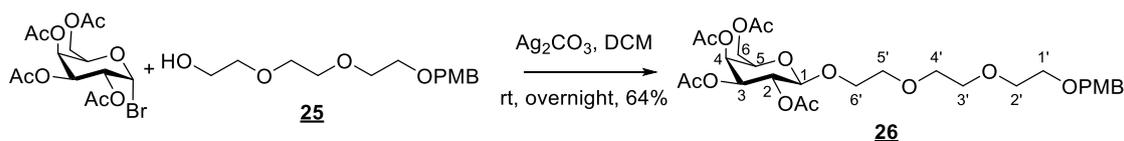


To a solution of triethylene glycol (6 g ; 40 mmol) dissolved in a 50% NaOH solution (20 mL), *p*-methoxybenzyl chloride (1.4 mL ; 10 mmol) is added with a syringe-pump (0.5 mL/h). The reaction mixture is heated to reflux (100 °C) and left overnight under stirring and inert atmosphere. The reaction mixture is diluted with water (20 mL) and extracted by Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL). The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/1 then 3/1 as eluent, yielding **25** (1.63 g ; 64%). Analytical data are in accordance with the literature.<sup>238</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 4.46 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>Ar), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.72-3.53 (m, 12H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) ppm.

Rf = 0.11 (Cyclohexane/AcOEt 1/1 ; KMnO<sub>4</sub>)

### 2-(2-{2-[(4-Methoxyphenyl)methoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside (**26**)



To a solution of acetobromogalactose (1.63 g ; 6.4 mmol) and **25** (1.31 g ; 3.2 mmol) in freshly distilled DCM (35 mL), Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 g ; 3.6 mmol) and molecular sieves 4Å are added. The reaction mixture is then left overnight, protected from light with aluminum foil, at room temperature under stirring and inert atmosphere. The reaction mixture is filtered on Celite®, washed with DCM then AcOEt and the resulting solution is concentrated under reduced pressure. The crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 2/1 then 1/1 as eluent, yielding **26** (1.2 g ; 64%) as a yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 6.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 5.34 (dd, *J* = 3.4 Hz, 1.0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.17 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.98 (dd, *J* = 10.5 Hz, 3.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.46 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ar), 4.11 (dd, *J* = 11.5 Hz, 6.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 4.07 (dd, *J* = 11.5 Hz, 6.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>'), 3.91 (ddd, *J* = 11.1 Hz, 4.3 Hz, 3.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>'), 3.86 (ddd, *J* = 6.8 Hz, 6.8 Hz, 1.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.70 (ddd, *J* = 11.1 Hz, 6.9 Hz, 3.9 Hz, H<sub>6</sub>'), 3.53 - 3.63 (m, 10H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>), 2.15 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.24 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.52 (-COCH<sub>3</sub>), 170.40 (-COCH<sub>3</sub>), 170.28 (-COCH<sub>3</sub>), 169.63 (-COCH<sub>3</sub>), 159.24 (Ar), 130.32 (Ar), 129.49 (Ar), 113.81 (Ar), 101.40 (C<sub>1</sub>), 72.94 (-CH<sub>2</sub>-Ar), 70.98 (C<sub>3</sub>), 70.77 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 70.72 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 70.68 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.66 (C<sub>5</sub>), 70.38 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.13 (C<sub>6</sub>'), 68.86 (C<sub>2</sub>), 67.14 (C<sub>4</sub>), 61.40 (C<sub>6</sub>), 55.34 (-OCH<sub>3</sub>), 20.87 (-COCH<sub>3</sub>), 20.79 (-COCH<sub>3</sub>), 20.77 (-COCH<sub>3</sub>), 20.70 (-COCH<sub>3</sub>) ppm.

IR (ATR): 1720, 2900, 3000 cm<sup>-1</sup>.

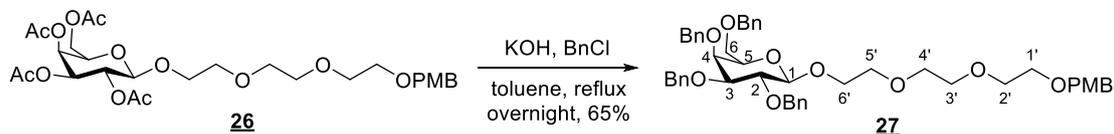
<sup>238</sup> Loiseau, F. A.; Hii, K. K. M.; Hill, A. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 639–647.

## Experimental part

HRMS: ESI+ C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>14</sub> calc = 618.2756 ; found = 618.2756.

$[\alpha]_D^{20} = 1.97$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

### 2-(2-{2-[(4-Methoxyphenyl)methoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galactopyranoside (**27**)



To a solution of **26** (540 mg ; 0.92 mmol) and potassium hydroxide (1.19 g ; 22 mmol) in toluene (4 mL), benzyl chloride (1.8 mL ; 15.6 mmol) is added dropwise and the reaction mixture is left overnight at reflux under vigorous stirring. The reaction mixture is diluted with toluene and washed with water (3 x 20 mL) and a saturated NH<sub>4</sub>Cl solution (20 mL). The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 3/1 then 2/1 as eluent, yielding **27** (467 mg ; 65%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.39 - 7.21 (m, 22H, Ph and Ar), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 4.95 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.93 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.70 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.46 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>Ar), 4.44 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.39 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.06-3.98 (m, 1H, H<sub>6'</sub>), 3.88 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.81 (dd, *J* = 9.7, 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.80-3.47 (m, 15H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub> and H<sub>6'</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 159.19 (C<sub>IV</sub> Ar), 138.92 (C<sub>IV</sub> Ph), 138.67 (C<sub>IV</sub> Ph), 138.59 (C<sub>IV</sub> Ph), 137.94 (C<sub>IV</sub> Ph), 130.36, 129.44, 128.48, 128.40, 128.29, 128.26, 128.22, 127.95, 127.84, 127.58 (20 x C<sub>Ph</sub>-H and 2 x C<sub>Ar</sub>-H), 113.77 (2 x C<sub>Ar</sub>-H), 104.14 (C<sub>1</sub>), 82.11 (C<sub>3</sub>), 79.47 (C<sub>2</sub>), 75.05 (-CH<sub>2</sub>Ph); 74.52 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.55 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.46, 73.36 (C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>), 73.06, 72.88 (-CH<sub>2</sub>Ph and -CH<sub>2</sub>Ar), 70.65, 70.38, 69.08, 68.99, 68.84 (C<sub>6</sub>, C<sub>1'</sub>, C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub> and C<sub>6'</sub>), 55.26 (-OCH<sub>3</sub>) ppm.

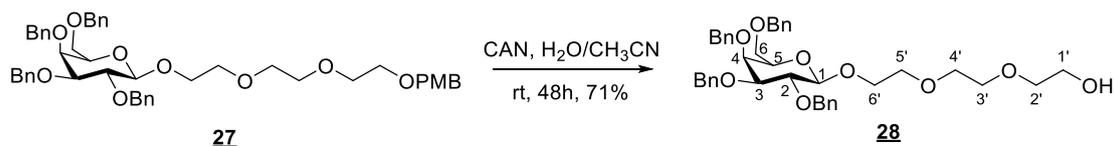
IR (ATR): 2900, 3100 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: ESI+ C<sub>48</sub>H<sub>60</sub>NO<sub>10</sub> calc = 810.4212 ; found = 810.4289.

$[\alpha]_D^{20} = 13.53$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

R<sub>f</sub> = 0.65 (Cyclohexane/AcOEt 1/1 ; 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH).

### 2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galactopyranoside (**28**)



To a solution of **27** (467 mg ; 0.59 mmol) in a H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN mixture (1/4 ; 15 mL), CAN (970 mg ; 1.77 mmol) is added and the reaction mixture is left 48h at room temperature under stirring and protected from light with aluminum foil. The reaction mixture is diluted with AcOEt, washed by a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (2 times), brine and water. The resulting organic phase is dried with

## Experimental part

MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated under reduced pressure and the resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/1 as eluent, yielding **28** (283 mg ; 71%) as a pale yellow oil.

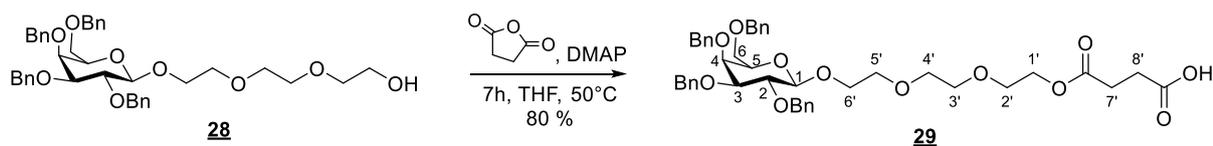
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.40 - 7.23 (m, 20H, Ph), 4.93 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.91 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H -CH<sub>2</sub>Ph), 4.73 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H -CH<sub>2</sub>Ph), 4.68 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H -CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H -CH<sub>2</sub>Ph), 4.44 - 4.34 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>Ph and H<sub>1</sub>), 4.04 - 3.97 (m, 1H, H<sub>6'</sub>), 3.86 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) 3.80 (dd, *J* = 9.8 Hz, 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.71 - 3.46 (m, 15H, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>5</sub> and H<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 138.98 (C<sub>IV</sub> Ph), 138.73 (C<sub>IV</sub> Ph), 138.65 (C<sub>IV</sub> Ph), 138.01 (C<sub>IV</sub> Ph), 128.58, 128.51, 128.40, 128.32, 128.06, 127.96, 127.71 (20 x C<sub>Ph</sub>-H), 104.14 (C<sub>1</sub>), 82.22 (C<sub>3</sub>), 79.59 (C<sub>2</sub>), 75.19 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.64 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.66 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.53, 73.47 (C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>), 73.15 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.65, 70.77, 70.55, 70.47, 69.01 (C<sub>1'</sub>, C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub> and C<sub>6'</sub>), 68.93 (C<sub>6</sub>) ppm.

HRMS: ESI+ C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>O<sub>9</sub>Na calc = 695.3196 ; found = 695.3221.

R<sub>f</sub> = 0.28 (Cyclohexane/AcOEt 1/1 ; 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH).

### 2-(2-{2-[(3-carboxy-1-propanoyloxy)]ethoxy}ethoxy)ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galactopyranoside (**29**)



To a solution of **28** (276 mg ; 0.41 mmol) in freshly distilled THF (5 mL), succinic anhydride (50 mg ; 0.50 mmol) and DMAP (60 mg ; 50 mmol) are added under stirring and inert atmosphere. The reaction mixture is left 7h at room temperature when additional succinic anhydride (50 mg ; 0.50 mmol) and DMAP (60 mg ; 50 mmol) are added and left overnight for completion. The reaction mixture is then concentrated under reduced pressure and the crude is partitioned between water and AcOEt. The aqueous phase is acidified to pH 5 and extracted with AcOEt (2 times). The combined organic phase is washed with NH<sub>4</sub>Cl (2 times). The resulting organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated under reduced pressure and the resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 1/2 then cyclohexane/AcOEt 1/2 and 1% AcOH as eluent, yielding **29** (255 mg, 80%) as a white oil.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.45 - 7.20 (m, 20H, Ph), 4.93 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.92 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.69 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.45 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.40 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.40 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.20 (m, 2H, H<sub>1'</sub>), 4.01 (m, 1H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 3.85 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.79 (dd, *J* = 9.6 Hz, 7.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.76-3.42 (m, 13H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> and -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.64 - 2.52 (m, 4H, H<sub>7'</sub> and H<sub>8'</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 176.36 (-COOH), 172.19 (-COOC<sub>1'</sub>), 138.85 (C<sub>IV</sub>, Ph), 138.60 (C<sub>IV</sub>, Ph), 138.54 (C<sub>IV</sub>, Ph), 137.85 (C<sub>IV</sub>, Ph), 128.51, 128.44, 128.32, 128.25, 128.01, 127.90, 127.64 (20 x C<sub>Ph</sub>-H), 104.05 (C<sub>1</sub>), 82.11 (C<sub>3</sub>), 79.46 (C<sub>2</sub>), 75.08 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.57 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.58 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.50 (C<sub>4</sub>), 73.38 (C<sub>5</sub>), 73.08 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.68 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 70.50 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 70.43 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.02, 68.95, 68.90 (3 x -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- and C<sub>6</sub>), 63.90 (C<sub>1'</sub>), 29.19 (C<sub>7'</sub> or C<sub>8'</sub>), 29.01 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7'</sub> or C<sub>8'</sub>) ppm.

## Experimental part

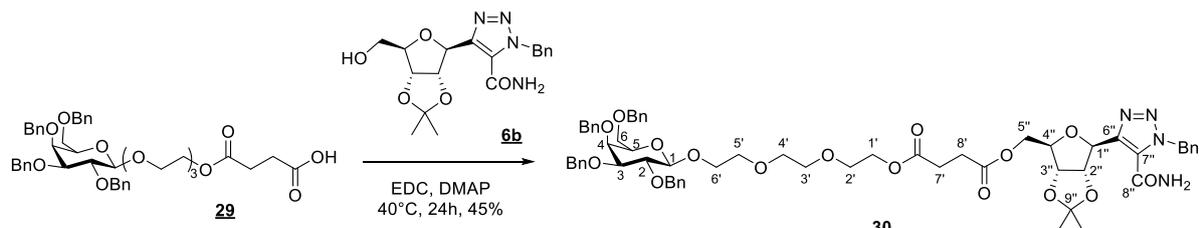
IR (ATR): 3461, 3030, 1732  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS: ESI+  $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{NO}_{12}$  calc = 790.3797 ; found = 790.3811.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.5$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

Rf = 0.19 (Cyclohexane/AcOEt 1/2;  $\text{KMnO}_4$ ).

### 2-[2-(2-ethoxy)ethoxy]ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl 1-(4'-benzyl-5'-carboxamyl-2',3',4'-triazole)-2,3-O-isopropylidene- $\beta$ -D-ribofuranosyl succinate (**30**)



To a solution of **29** (52 mg ; 67.3  $\mu\text{mol}$ ) and **6b** (25 mg ; 66.8  $\mu\text{mol}$ ) in freshly distilled DMF (3 mL), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (19 mg ; 77.4  $\mu\text{mol}$ ) and 4-dimethylaminopyridine (15 mg ; 118  $\mu\text{mol}$ ) are added under stirring and inert atmosphere. The reaction mixture is heated at 40°C for 24h and then washed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The resulting organic phase is dried with  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is finally purified on silica gel using cyclohexane/AcOEt 2/1 then 1/1 as eluent, yielding **30** (34 mg ; 45%) as a colorless oil.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.79 (bs, 1H,  $\text{CONH}_2$ ), 7.40 - 7.20 (m, 25H, Ph), 5.96 (d,  $J = 14.2$  Hz, 1H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.92 (bs, 1H,  $\text{CONH}_2$ ), 5.84 (d,  $J = 14.2$  Hz, 1H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.75 (dd,  $J = 6.4$  Hz, 2.9 Hz, 1H,  $\text{H}_{2''}$ ), 5.26 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{1''}$ ), 4.92 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.91 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.75 - 4.66 (m, 4H,  $\text{H}_{3''}$  + 3 x  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.59 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.42 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.37 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.37 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4.34 (ddd,  $J = 3.2$  Hz, 4.2 Hz, 7.3 Hz, 1H,  $\text{H}_{4''}$ ), 4.16 - 4.13 (m, 2H,  $\text{H}_{1'}$ ), 4.02 (dd,  $J = 12.0$  Hz, = 4.2 Hz, 1H,  $\text{H}_{5''}$ ), 3.87 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3.79 (dd,  $J = 12.0$  Hz, 7.3 Hz, 1H,  $\text{H}_{5''}$ ), 3.79 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 7.8 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 3.75-3.50 (m, 13H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_4'$ ,  $\text{H}_5'$  and  $\text{H}_6'$ ), 3.49 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 2.8 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 2.52-2.46 (m, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2.40-2.35 (m, 2H,  $\text{H}_8$ ), 1.57 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.42 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ ,  $-\text{COOC}_{1'}$ ), 171.79 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ ,  $-\text{COOC}_{5''}$ ), 159.44 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ), 144.43 ( $\text{C}_{6''}$ ), 139.03 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ , Ph), 138.77 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ , Ph), 138.69 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ , Ph), 138.05 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ , Ph), 135.42 ( $\text{C}_{\text{IV}}$ , Ph), 129.06 ( $\text{C}_{7''}$ ), 128.91, 128.64, 128.58, 128.49, 128.46, 128.44, 128.38, 128.11, 128.02, 127.77, 127.74 (25xCH, Ph), 114.53 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 104.27 ( $\text{C}_1$ ), 83.91 ( $\text{C}_{4''}$ ), 82.43 ( $\text{C}_{2''}$ ), 82.27 ( $\text{C}_3$ ), 82.12 ( $\text{C}_{3''}$ ), 79.61 ( $\text{C}_2$ ), 79.12 ( $\text{C}_{1''}$ ), 75.22 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 74.70 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 73.73 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 73.57 ( $\text{C}_4$ ), 73.54 ( $\text{C}_5$ ), 73.22 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 70.73, 70.53, 69.19, 68.99, ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 64.13 ( $\text{C}_{1'}$ ), 63.72 ( $\text{C}_{5''}$ ), 53.78 ( $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 28.94 ( $\text{C}_8$ ), 28.79 ( $\text{C}_7$ ), 27.18 ( $\text{CH}_3$ ), 25.33 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

IR (ATR): 1735, 1686, 1215  $\text{cm}^{-1}$ .

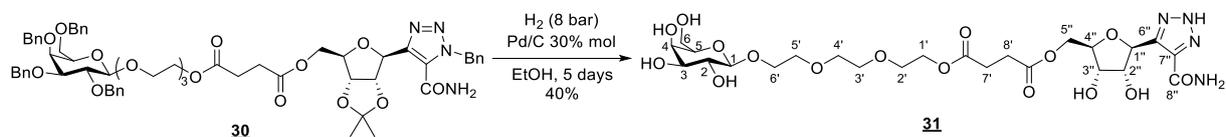
HRMS: ESI+  $\text{C}_{52}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_{16}$  calc = 1001.4390 ; found = 1001.2877.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22.22$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

## Experimental part

R<sub>f</sub> = 0.54 (Cyclohexane/AcOEt 1/1 ; KMnO<sub>4</sub>).

### 2-[2-(2-ethoxy)ethoxy]ethyl-β-D-galactopyranosyl-1-(5'-carboxamyl-2',3',4'-triazole)-β-D-ribofuranosyl succinate (**31**)



To a mixture of **30** (66 mg ; 56 μmol) and EtOH (3 mL), Pd on charcoal (12 mg ; 20% mol) is added. The resulting mixture is poured into a Parr bomb and left under stirring and H<sub>2</sub> (8 bar) for 2 days. Pd on charcoal (5 mg ; 10% mol) is then added and the mixture is left for another 3 days under stirring. The reaction mixture is filtered on Celite, rinsed with EtOH and concentrated under reduced pressure. The crude is finally purified on silica gel using DCM/MeOH 7/3 as eluent, yielding **31** (15 mg ; 40%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 5.44 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H<sub>1''</sub>), 4.40 (dd, *J* = 2.8 Hz, 11.8 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>), 4.43 - 4.12 (m, 5H, H<sub>1</sub>, H<sub>2''</sub>, H<sub>3''</sub>, H<sub>4''</sub>, and H<sub>5''</sub>), 4.05 - 3.99 (m, 1H, H<sub>1'</sub>), 3.83 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.76 - 3.43 (m, 16H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub> and H<sub>6'</sub>), 2.68-2.58 (m, 4H, H<sub>7'</sub> and H<sub>8'</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 174.30, 174.08 (-COOC), 165.53 (C<sub>8''</sub>), 144.76, 139.12 (C<sub>6''</sub> and C<sub>7''</sub>), 105.11 (C<sub>1</sub>), 83.24 (C<sub>4''</sub>), 78.77, 76.96, 76.81, 74.98, 73.33, 72.64 (C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>1''</sub>, C<sub>2''</sub> and C<sub>3''</sub>) 71.56, 71.53, (C<sub>1'</sub> and C<sub>6'</sub>) 70.46 (C<sub>3</sub>), 70.18, 69.72, 65.83, 65.09, 62.66 (C<sub>6</sub>, C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub> and C<sub>5''</sub>), 30.02 (C<sub>7'</sub> and C<sub>8'</sub>) ppm.

IR (ATR): 3325, 2924, 1727, 1602 cm<sup>-1</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 6.8 (c 0.5, MeOH).

## 3. Peptide Synthesis

### 3.1. General procedures

#### 3.1.1. General procedure for manual SPPS

All peptides were synthesized either on a 0.1 or 0.05-mmol scale following the Fmoc/*t*Bu methodology. The reactions were performed in a plastic syringe and continuously stirred by orbital shaking. If not specified, the following amino acid side-chain-protecting groups were used: *O**t*Bu (Asp, Glu), *t*Bu (Ser, Thr), Pbf (Arg), Trt (Gln, His) and Boc (Lys).

The resin was first swelled manually with DMF (1 mL/100 mg of resin) for 30 min. Each amino-acid cycle is then composed of the four following steps:

- Fmoc-deprotection: Resin is stirred twice (1 × 5 min + 1 × 15 min) with a solution of 20% piperidine in DMF (1 mL/100 mg of resin).
- Washing: DMF (3 × 3 min).
- Coupling reaction: Fmoc amino acids (5 eq) and TBTU or HBTU (5 eq), previously dissolved in DMF (1 mL/100 mg of resin) are added, followed by DiPEA or NMM (7 eq). Coupling steps were performed for 30 min at room temperature.
- Washing: DMF (3 × 3 min) and DCM (3 × 3 min).

## Experimental part

- Kaiser test.

### **3.1.2. General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer**

All peptides were synthesized either on a 0.1, 0.05 or 0.025-mmol scale by a high-efficiency solid-phase peptide synthesis (SPPS) strategy, using a Liberty Blue automated microwave synthesizer (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) following the Fmoc/*t*Bu methodology. The reactions were performed in a Teflon vessel and mixed by N<sub>2</sub> bubbling. Reaction temperatures were monitored by an internal fiber optic sensor. If not specified, the following amino acid side-chain-protecting groups were used: *O**t*Bu (Asp, Glu), *t*Bu (Ser, Thr), Pbf (Arg), Trt (Gln, His) and Boc (Lys).

The resin was first swelled manually with DMF (1 mL/100 mg of resin) for 30 min. Each amino-acid cycle is then composed of the three following steps:

- Fmoc-deprotection using a 20% piperidine in DMF, for 15 s at 75°C using 155 W.
- Three washes with DMF and N<sub>2</sub> bubbling.
- Coupling reaction using 0.2M amino acids, 0.5M DIC and 1M Oxyma solutions in DMF, for 17s at 75°C using 170 W followed by 110s at 90°C using 30 W.

Arg residues were coupled using a double coupling procedure composed of two steps of 1500s at 25°C without micro-waves followed by 120s at 75°C using 30 W.

His residues were coupled using a single coupling procedure composed of two steps of 120s at 25°C without micro-waves followed by 480s at 50°C using 35 W.

### **3.1.3. General procedure for acetylation**

Final acetylation or end-capping acetylation were both performed manually. After Fmoc-deprotection and washing steps as described in the general procedure for manual SPPS, a solution of acetic anhydride (10 eq) and NMM or DiPEA (10 eq) in DCM (1 mL/100 mg of resin) was added to the resin. The acetylation was performed for 1h (two times) at room temperature. The reaction completion was confirmed by Kaiser Test and micro-cleavage.

### **3.1.4. General procedure for pegylation**

After peptide elongation, pegylation was performed manually following the general procedure for manual SPPS described above. The coupling step was performed using Fmoc-TTDS-OH (2.5 eq), HBTU or TBTU (2.5 eq) and NMM or DiPEA (3.5 eq) for 30 min at room temperature. The reaction completion was confirmed by Kaiser Test and/or micro-cleavage.

### **3.1.5. General procedure for lipoic acid conjugation**

After peptide elongation and pegylation, the conjugation with lipoic acid was performed manually. The Mtt protecting group of the *N*-ter Lys was cleaved selectively by 12 short (1 min) washing steps using TFA/TIS/DCM 2/2/96 (v/v/v) solution. Then, the lipoic acid was coupled on the Lys side-chain following the standard coupling step as described in the general procedure for manual SPPS. The reaction completion was confirmed by micro-cleavage.

### **3.1.6. General procedure for fluorophore conjugation**

After peptide elongation and pegylation, the conjugation with fluorophore was performed manually following the general procedure for manual SPPS described above. The coupling step was performed

## Experimental part

using NBD (4 eq) and DiPEA (10 eq) for 18 h at room temperature and protected from light using an aluminum foil. The reaction completion was confirmed by micro-cleavage.

In the case of HCV3-S1', HCV6-S1' and HCV7-S1'', NBD was introduced on a Lys side-chain using a slightly different procedure. After peptide elongation and pegylation for HCV3-S1' and HCV6-S1', a Fmoc-Lys(Dde)-OH was manually coupled on the *N*-ter position as described in the general procedure for manual SPPS. In order to remove the Dde protecting group selectively, a 3M/2.25M NH<sub>2</sub>OH.HCl/Imidazole solution in NMP/DMF 5/1 (v/v) was added to the resin and stirred at room temperature for 3h. After washing with DMF, the NBD was coupled on Lys side-chain as described above.

### **3.1.7. General procedure for nucleoside conjugation**

After peptide elongation and pegylation, the conjugation with nucleoside was performed manually following the general procedure for manual SPPS described above. The coupling step was performed using 5-[2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-(3''-carboxy-1''-oxopropyl)-β-D-ribofuranosyl]-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide **8** (2.5 eq), HBTU or TBTU (2.5 eq) and NMM or DIPEA (3.5 eq) for 30 min at room temperature. The reaction completion was confirmed by micro-cleavage.

### **3.1.8. Kaiser test procedure**

To a small amount of peptide-resin placed in a test tube, three drops for each of the following solutions were added: ninhydrine in ethanol (5 g/100 mL); phenol in ethanol (80 g/20 mL); KCN (2 mL of 1 mM aqueous solution) in pyridine (98 mL). The tube is heated at 100°C for 5 min. A positive test (resin beads and solution appears vigorously blue-violet) states the presence of at least 5% free amino groups.<sup>239</sup>

### **3.1.9. General procedure for cleavages and micro-cleavages**

Cleavages from the resin and side chain deprotections were performed using a TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/Phenol cleavage mixture depending on the sequence, as indicated for each compound. The peptide-resin was treated for 1 to 5 h with the cleavage mixture (1 mL × 100 mg of resin for final-cleavage and 1 mL for micro-cleavage) at room temperature. The resin was filtered off and the solution was concentrated by nitrogen flushing. The peptide was precipitated from ice-cold Et<sub>2</sub>O, centrifuged and washed 2 to 3 times with ice-cold Et<sub>2</sub>O by centrifugation and organic supernatant elimination. The resulting crude peptide was finally dried and lyophilized.

### **3.1.10. General procedure for purification and characterization**

All peptides were purified by semi-preparative RP-HPLC. Methods and solvent system used are reported for each peptide. Fractions were checked by analytical RP-HPLC ESI-MS or RP-UPLC ESI-MS, homogeneous ones were pooled together, CH<sub>3</sub>CN was evaporated under reduced pressure and then aqueous phase was lyophilized. Peptides were characterized either by RP-HPLC ESI-MS or RP-UPLC ESI-MS using a gradient of A/B as eluent (with A corresponding to 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O and B 0.1 % TFA in CH<sub>3</sub>CN) and purity was evaluated based on the UV chromatogram. Retention times and *m/z* are reported for each peptide.

---

<sup>239</sup> Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34* (2), 595–598.

## Experimental part

### 3.2. Synthesis

#### TAT-S0

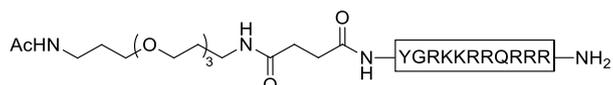


TAT-S0 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer.

The resin used was a Fmoc-Rink Amide AM (0.400 g ; loading 0.24 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (97/2/1 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 5h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 × 10 mm), using a 10-30% B gradient in 30 min (rt: 13.1 min). The peptide was obtained as a white powder (71 mg ; 38 %) in purity ≥ 95 % ([M+3H]<sup>3+</sup>: 520.58 Da ; rt: 0.61 min by RP-UPLC ESI-MS with a 2% B isocratic elution in 3 min).

#### TAT-S1

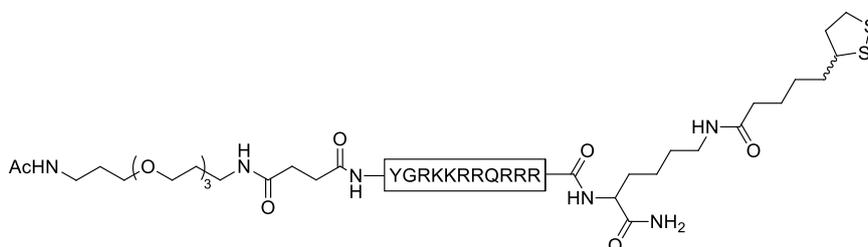


TAT-S1 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation.

The resin used was a Fmoc-Rink Amide AM (0.362 g ; loading 0.14 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (97/2/1 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 5h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 mm × 4.6 mm), using a 10-50% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as a white powder (14 mg ; 15 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 951.98 Da ; [M+3H]<sup>3+</sup>: 635.08 Da ; [M+4H]<sup>4+</sup>: 476.50 Da ; rt: 3.77 min by RP-HPLC ESI-MS with a 10-50% B eluent in 5 min).

#### TAT-S2



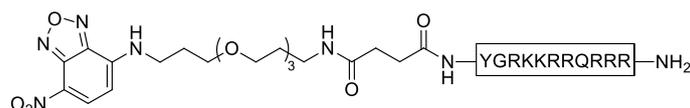
TAT-S2 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The lipoyl acid was coupled as described in General procedure for lipoyl acid conjugation.

## Experimental part

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.208 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT (95/1/2/2 v/v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 5h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10 $\mu$ m, 250  $\times$  10 mm), using a 20-60% B gradient in 30 min (rt: 10.1 min). The peptide was obtained as a white powder (25.7 mg ; 14 %) in purity  $\geq$  95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 1110.76 Da ; [M+3H]<sup>3+</sup>: 740.72 Da ; rt: 1.48 min by RP-UPLC ESI-MS with a 10-30% B eluent in 3 min).

### TAT-S1'

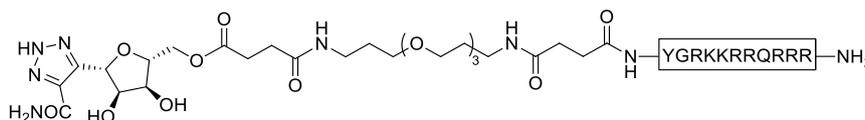


TAT-S1' was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The NBD was coupled as described in General procedure for fluorophore conjugation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.100 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 5h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10 $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), using a 25-60% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as an orange powder (39.3 mg ; 40 %) in purity  $\geq$  95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 1012.73 Da ; rt: 2.38 min by RP-HPLC ESI-MS with a 25-70% B eluent in 5 min).

### TAT-S3



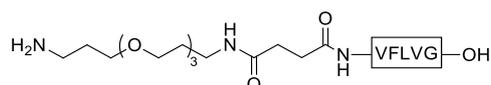
TAT-S3 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The nucleoside was coupled as described in General procedure for nucleoside conjugation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.100 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/Phenol/TIS (90/5/3/2 v/v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10 $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), using a 15-30% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as a white powder (60.3 mg ; 55 %) in purity  $\geq$  95 % ([M+3H]<sup>3+</sup>: 759.91 Da ; rt: 4.03 min by RP-HPLC ESI-MS with a 15-60% B eluent in 5 min).

## Experimental part

### HCV3-S0

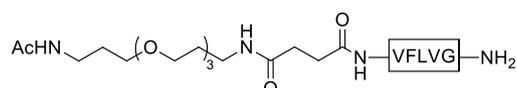


HCV3-S0 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for manual SPPS. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation.

The resin used was a Fmoc-L-Gly-Wang resin (0.300 g ; loading 0.44 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 × 10 mm), using a 20-60% B gradient in 30 min (rt: 15 min). The peptide was obtained as a white powder (49.4 mg ; 45 %) in purity ≥ 95 % ([M+H]<sup>+</sup>: 836.94 Da ; [M+2H]<sup>2+</sup>: 419.08 ; rt: 2.19 min by RP-UPLC ESI-MS with a 10-50% B eluent in 3 min).

### HCV3-S1

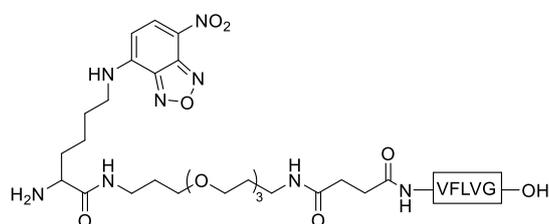


HCV-S1 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for manual SPPS. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.300 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 mm × 4.6 mm), using a 35-70% B gradient in 20 min. The peptide was obtained as a white powder (30.9 mg ; 11 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 1012.73 Da ; rt: 3.07 min by RP-HPLC ESI-MS with a 35-70% B eluent in 5 min).

### HCV3-S1'



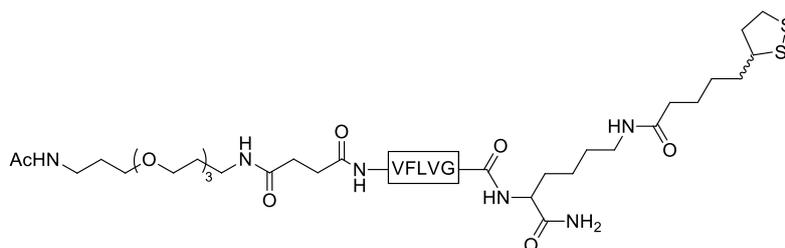
HCV3-S1' was synthesized on a 0.05 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for manual SPPS. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. NBD coupling was performed on a Lys side-chain as described in General procedure for fluorophore conjugation.

## Experimental part

The resin used was a Fmoc-L-Gly-Wang resin (0.114 g ; loading 0.44 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h30.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10µm, 250 × 10 mm), using a 40-80% B gradient in 30 min (rt: 16.3 min). The peptide was obtained as an orange powder (8.5 mg ; 15 %) in purity ≥ 95 % ([M+H]<sup>+</sup>: 1127.79 Da ; [M+2H]<sup>2+</sup>: 564.51 Da ; rt: 2.35 min by RP-UPLC ESI-MS with a 20-60% B eluent in 3 min).

### HCV3-S2



HCV3-S2 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for manual SPPS. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The lipoic acid was coupled as described in General procedure for lipoic acid conjugation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.300 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h. A RP-HPLC ESI-MS analysis showed that the desired peptide was obtained in two different forms: dithiolane [M+H]<sup>+</sup> : 1193.49; and dithiol [M+H]<sup>+</sup> : 1195.48). Thus, the crude peptide was re-oxidized by flushing air during 1h30, yielding only the dithiolane form.

Due to poor solubility, the crude peptide was purified by manual flash chromatography on RP-silica gel and acetonitrile/H<sub>2</sub>O 0/100 (2 CV), 50/50 (1 CV) and 100/0 (2 CV) as eluent. The peptide was obtained as a grey powder (3.1 mg ; 2 %) in purity ≥ 85 % ([M+H]<sup>+</sup>: 1093.57 Da ; rt: 1.72 min by RP-HPLC ESI-MS with a 50-100% B eluent in 5 min).

### HCV6-S0



HCV6-S0 was synthesized on a 0.025 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer.

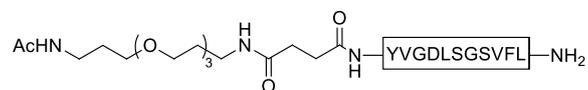
The resin used was a Fmoc-L-Leu-Wang TG resin (0.100 g ; loading 0.25 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10µm, 250 × 10 mm), using a 30-70% B gradient in 30 min (rt:

## Experimental part

13.9 min). The peptide was obtained as a white powder (9.4 mg ; 32 %) in purity  $\geq 95\%$  ( $[M+H]^+$ : 1157.16 Da ; rt: 1.68 min by RP-UPLC ESI-MS with a 20-60% B eluent in 3 min).

### HCV6-S1

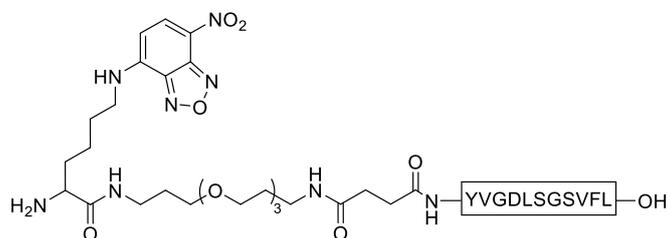


HCV6-S1 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.208 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h. The crude peptide was not able to precipitate in ice-cold diethyl ether, instead a gelation was observed. Another precipitation attempt was performed using hexane but resulted also in a gel formation. The gel was then washed 3 times with water (for 30 min each) and lyophilized.

Due to poor solubility, the crude peptide was purified by manual flash chromatography on RP-silica gel and acetonitrile/H<sub>2</sub>O (from 30/70 to 100/0 gradient) as eluent. The peptide was obtained as a white powder (14.6 mg ; purity  $\geq 50\%$ ). Based on the supernatant purity, the calculated yield was 10% ( $[M+H]^+$ : 1499.57 Da ; rt: 4.25 min by RP-HPLC ESI-MS with a 30-60% B eluent in 5 min).

### HCV6-S1'



HCV6-S1' was synthesized on a 0.025 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. NBD coupling was performed on a Lys side-chain as described in General procedure for fluorophore conjugation.

The resin used was a Fmoc-L-Leu-Wang TG resin (0.100 g ; loading 0.25 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 3h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10 $\mu$ m, 250  $\times$  10 mm), using a 40-70% B gradient in 30 min (rt: 14.4 min). The peptide was obtained as an orange powder (8 mg ; 18 %) in purity  $\geq 95\%$  ( $[M+2H]^{2+}$ : 875.85 Da ; rt: 2.28 min by RP-UPLC ESI-MS with a 20-60% B eluent in 3 min).

### HCV7-S0



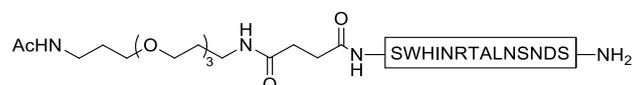
## Experimental part

HCV7-S1 was synthesized on a 0.05 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer.

The resin used was a Fmoc-L-Ser(*t*Bu) Wang resin (0.200 g ; loading 0.25 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h30.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 × 10 mm), using a 30-50% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as a white powder (25.6 mg ; 32 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 808.16 Da ; rt: 2.20 min by RP-UPLC ESI-MS with a 10-30% B eluent in 3 min).

### HCV7-S1

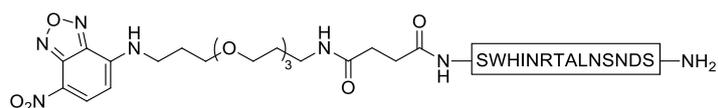


HCV7-S1 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.067 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h30.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 mm × 4.6 mm), using a 20-50% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as a white powder (7.7 mg ; 12 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 979.53 Da ; rt: 3.98 min by RP-HPLC ESI-MS with a 20-50% B eluent in 5 min).

### HCV7-S1'



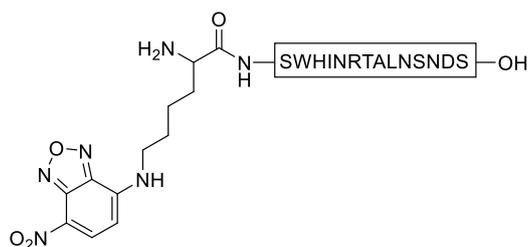
HCV7-S1' was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The NBD was coupled as described in General procedure for fluorophore conjugation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.067 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h30.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 mm × 4.6 mm), using a 30-70% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as an orange powder (11 mg ; 16 %) in purity ≥ 90 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 1040.19 Da ; rt: 3.20 min by RP-HPLC ESI-MS with a 30-70% B eluent in 5 min).

### HCV7-S1''

## Experimental part

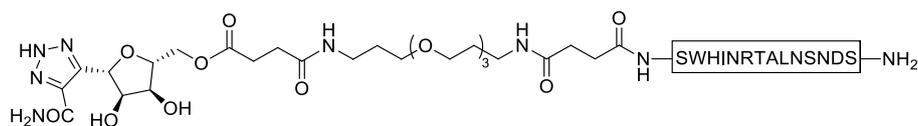


HCV7-S1'' was synthesized on a 0.05 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. NBD coupling was performed on a Lys side-chain as described in General procedure for fluorophore conjugation.

The resin used was a Fmoc-L-Ser(*t*Bu) Wang resin (0.203 g ; loading 0.25 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2.5/2.5 v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h30.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 × 10 mm), using a 40-70% B gradient in 30 min (rt: 11.5 min). The peptide was obtained as an orange powder (8 mg ; 9 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 953.88 Da ; rt: 1.33 min by RP-UPLC ESI-MS with a 20-50% B eluent in 3 min).

### HCV7-S3



HCV7-S3 was synthesized on a 0.1 mmol scale by SPPS using Fmoc/*t*Bu strategy, as described in General procedure for batch SPPS on a Liberty Blue automatic synthesizer. The pegylation was performed as described in General procedure for pegylation. The nucleoside was coupled as described in General procedure for nucleoside conjugation.

The resin used was a Fmoc-Rink-amide NovaSyn TGR resin (0.067 g ; loading 0.48 mmol/g). Cleavages were performed as described in General procedure for cleavages and micro-cleavages using a mixture of TFA/H<sub>2</sub>O/Phenol/TIS (90/5/3/2 v/v/v/v) under vigorous stirring at room temperature for 4h.

The crude peptide was purified as described in General procedure for purification and characterization, on a Phenomenex Jupiter C18 column (10μm, 250 mm × 4.6 mm), using a 20-35% B gradient in 30 min. The peptide was obtained as a white powder (8.5 mg ; 12 %) in purity ≥ 95 % ([M+2H]<sup>2+</sup>: 1121.78 Da ; rt: 4.08 min by RP-HPLC ESI-MS with a 20-35% B eluent in 5 min).

## 4. Interaction Analysis

### 4.1. General procedure for LUVs suspensions preparation

Depending on the desired LUV composition, a lipid solution in chloroform (DOPG, DOPC, DMPC, POPC, POPE, POPS), in ethanol (sphingomyelin), in methanol (cholesterol) or in chloroform/methanol/water 65/38/8 (v/v/v) (DMPG) was introduced in a round-bottom flask. Organic solvents were removed slowly under vacuum at 30°C with the aid of a rotary evaporator, and the residue was then placed under high vacuum for at least 4h. The lipids were hydrated with a buffer

## Experimental part

solution (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.3 or 10 mM PBS, 100 mM NaCl, pH 7.4) for at least 30 min above the transition temperature ( $T_m$ ) to obtain a MLVs suspension of the desired concentration. The turbid suspension was subsequently extruded eight times through a 200 nm polycarbonate track-etch membrane (Whatman) and ten times through a 100 nm polycarbonate track-etch membrane (Whatman) with a 10 mL Thermobarrel extruder (Lipex Biomembranes). The resulting 100-nm-diameter LUVs suspension was stored at 4°C and used within one week.

Vesicular size and distribution were evaluated by light scattering (Zetasizer Nano, Malvern) considering the following parameters:  $n = 1.345$  ; Absorption = 0.001 ; water as solvent.

The following results were obtained:

LUVs composition	d (nm)	PD <sub>i</sub>
DOPC	127	0.09
DOPC/DOPG 75/25	123	0.059
DOPG	129	0.069
DMPC	125	0.074
DMPC/DMPG 9/1	116	0.104
DMPC/DMPG 7/3	126	0.076
DMPG	129	0.065
LM3	134	0.079

Total phosphate concentration was titrated thanks to the Bartlett method using the following procedure:<sup>240</sup>

The samples (0.1 μmol phosphorus) and six phosphate standards (0, 0.0325, 0.114, 0.163 and 0.228 μmol corresponding respectively to 0, 50, 175, 250 and 350 μL of a 0.65 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  standard solution) were placed in screw-cap test tubes. 0.45 mL of a 8.9N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution was added to each tube. The tubes were heated at 215°C for 25 min using an oil bath. The tubes were allowed to cool at room temperature for 5 min before adding 150 μL of a  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution. The tubes were then heated for additional 30 min. After cooling to room temperature, 3.9 mL of deionized water was added to all tubes followed by 0.5 mL of a 2.5% ammonium molybdate (VI) tetrahydrate solution. After vortexing all tubes, 0.5 mL of a 10% ascorbic solution was added and the tubes were vortexed again. The tubes were heated at 100°C for 7 min and then cooled to room temperature.

With the determination of absorbance at 820 nm of the five standards (blank was performed using the 0 μmol standard), a calibration curve can be generated (equation:  $y = 4,2236x - 0,0071$   $R^2 = 0,9988$ ). The sample's absorbance at 820 nm allowed determining the total phosphorus concentration.

<sup>240</sup> Bartlett, G. R. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234 , 468–468.

## Experimental part

### 4.2. General procedure for peptide solution preparation

Peptide solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of pure peptide in Tris buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.3). The resulting solutions were vortexed and sonicated or heated to 40°C in the case of HCV3 and HCV6. If the peptide could not be completely solubilized, the suspension was centrifuged and the supernatant was filtered.

The peptide concentration was finally checked by UV-vis spectrophotometry between 220 and 500 nm. Concentration was calculated according to the Beer-Lambert's law using the following parameters:

Peptide	Residu	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
HCV3	Phe	258	195
HCV6	Tyr	275	1420
HCV7	Trp	280	5560
Tat	Tyr	275	1420
Serie S1' and S1''	NBD	480	25000

### 4.3. General procedure for DSC analysis

DSC experiments were performed on a MicroSC calorimeter (Setaram Instrumentation). For each analysis, three scans from 40°C to 5°C were performed with a scan rate of 1°C/min and waiting 15 min between sequential scans in a series to allow thermal equilibration. Data analysis was performed by the Calisto Software provided by Setaram Instrumentation and Origin software. The MLVs suspensions were prepared as described in General procedure for LUVs suspensions preparation reaching a concentration of 5 mM in Tris Buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.3). Aliquots of peptide solution (concentration varying from 300  $\mu$ M to 1 mM) in Tris buffer (with 5% DMSO for experiments with HCV6-S0) were gradually added to the lipid MLVs to obtain peptide/lipid molar ratios of 1/100, 1/50, 1/25, 1/10 and finally 1/5 and 1/1 only for experiments with HCV3-S0. For each addition, the exact same volume of Tris buffer solution was used as reference.

### 4.4. General procedure for ITC analysis

ITC experiments were performed on a ITC200 calorimeter (MicroCal Systems, Malvern). To avoid air bubbles, peptide and LUVs solutions were heated to desired temperature and degassed under vacuum before use with a ThermoVacc (MicroCal Systems). Titrations were performed by injecting aliquots of LUVs suspension (lipid concentration varying between 1 mM and 50 mM) in Tris buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.3) into the calorimeter cell containing the peptide solution (peptide concentration between 50  $\mu$ M and 500  $\mu$ M) in the same buffer, waiting 5 min between injections. Dilution of lipids was quantified by adding aliquots of lipids solution into a buffer solution in the exact same conditions. The experiments were performed at 25 °C or 30°C. Data analysis was performed with the Origin software provided by MicroCal and using the one-site model for fitting after withdrawing the lipids dilution heat.

The following parameters were used:

## Experimental part

Interaction	# Injection	V Injection ( $\mu\text{L}$ )	Injection duration (s)	Reference Power ( $\mu\text{cal/sec}$ )	[Lipid] (mM)	[peptide] ( $\mu\text{M}$ )	Cell temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Stirring (rpm)
Tat-S0/DOPC	19	2	4	5	5	500	25	600
Tat-S0/DOPC-DOPG 75-25	19	2	4	5	5	500	25	600
Tat-S0/DOPG	19	2	4	8	5	50	25	350
Tat-S3/DOPG	19	2	4	8	5	60	25	350
Tat-S1'	19	2	4	8	5	80	25	350
HCV3-S0/DOPG	19	2	4	8	5	235	25	350
HCV6-S0/DOPG 5% DMSO	76	2	4	8	5	100	25	350
HCV7-S0/DOPC	19	2	4	8	5	57	25	350
HCV7-S0/DMPC-DMPG 9-1	16	2	4	8	5	57	25	350
HCV7-S0/DMPG	19	2	4	8	5	75	25	350

### 4.5. General procedure for fluorescence assays

Time-course fluorescence measurements were recorded with a Jasco Fluorescence Spectrophotometer at the desired temperature (controlled by a Jasco MCB-100 mini circulation bath). As an excitation source a xenon lamp was used at 460 nm and emission was measured at 555 nm. The excitation bandwidth was set to 10 nm and the emission to 2.5 nm. Depending on the sequence, the PMT voltage was set between 650 and 750 V. To avoid peptide adsorption and subsequent fluorescence quenching, polymethacrylate cuvettes were used. During measurement the solution was stirred at 800 rpm.

For each analysis, 3 mL of PBS buffer (10mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4) and 30  $\mu\text{L}$  of a 1 mM LUVs solution was poured into a spectrophotometer cuvette. The emission measured at 555 nm was used as a blank value. 3  $\mu\text{L}$  of a 100  $\mu\text{M}$  solution of peptide bearing the NBD fluorescent tag (75  $\mu\text{L}$  of 4  $\mu\text{M}$  solution for HCV6-S1' and 18.5  $\mu\text{L}$  of a 16  $\mu\text{M}$  solution for HCV7-S1') was added into the cuvette and incubated at the desired temperature for 10-15 min. The solution was then cooled to 10 $^{\circ}\text{C}$  and 30  $\mu\text{L}$  of a concentrated (~1M) dithionite (DT) solution was added for reduction. If

## Experimental part

fluorescence intensity did not decrease to blank level, 3  $\mu\text{L}$  of a 600  $\mu\text{M}$  melittin solution was added in order to allow reduction in the intravesicular medium.

Experiments with a diluted DT solution were performed following the same procedure but after cooling to 10°C, several aliquots of increasing volume of 100 mM DT solution were added for reduction. When a stable fluorescence emission at 555 nm was reached, 3  $\mu\text{L}$  of a 600  $\mu\text{M}$  melittin was added. Finally, several aliquots of 100 mM DT were added, until the blank value was reached.

### 4.6. General procedure for fusion/hemifusion assays by FRET

Fusion/hemifusion experiments using FRET were performed on a Jasco fluorescence spectrophotometer at 37°C for experiments with LM3 (POPC/POPE/POPS/sphingomyelin/cholesterol 10/5/2/2/10) LUVs (controlled by a Jasco MCB-100 mini circulation bath). A xenon lamp was used at 450 nm and emission was measured at 530 nm for time-course fluorescence measurements. The excitation bandwidth was set to 10 nm and the emission to 2.5 nm. The PMT voltage was set at 600V for 150 $\mu\text{M}$  LUVs solution and 700V for 10 $\mu\text{M}$  LUVs solution. Analyses were performed using polymethacrylate cuvettes. During measurement the solution was stirred at 800 rpm.

For analyses performed with a 150  $\mu\text{M}$  LM3 LUVs solution, 1.7 mL of 10 mM phosphate buffer without NaCl (pH 7.4), 27  $\mu\text{L}$  of a 1mM LM3 LUVs solution containing 2% mol Rho-DPPE and 2% mol NBD-DPPE, and 273  $\mu\text{L}$  of a 1 mM LM3 LUVs solution (yielding a 1/10 ratio between fluorescent LUVs and non-fluorescent ones) were poured into a spectrophotometer cuvette. The fluorescence emission measured at 530 nm was used as a blank value. 60  $\mu\text{L}$  of a 100  $\mu\text{M}$  peptide solution (77  $\mu\text{L}$  of a 78  $\mu\text{M}$  solution for HCV6-S0 and 24  $\mu\text{L}$  of a 1 mM solution for acetyl-penetratin Ac-Pen) was added yielding a peptide/lipid ratio of 1/50 (1/12 for Ac-Pen). Fluorescence emission at 530 nm was recorded for 10 to 20 min. Cuvettes were then placed in a 37°C bath under stirring and fluorescence emission at 530 nm was measured after one night. A LUVs solution without peptide was studied following the same procedure as a control experiment.

For analysis performed with a 10 $\mu\text{M}$  LM3 LUVs solution, 3 mL of 10 mM phosphate buffer without NaCl (pH 7.4), 3  $\mu\text{L}$  of a 1mM LM3 LUVs solution containing 2% mol Rho-DPPE and 2% mol NBD-DPPE, and 27  $\mu\text{L}$  of a 1 mM LM3 LUVs solution (yielding a 1/9 ratio between fluorescent LUVs and non-fluorescent ones) were poured into a spectrophotometer cuvette. The fluorescence emission measured at 530 nm was used as a blank value. Peptide solution (concentration between 78  $\mu\text{M}$  and 1 mM) was added yielding a peptide/lipid ratio of 1/3. Fluorescence emission at 530 nm was recorded for 10 to 20 min. Cuvettes were then placed in a 37°C bath under stirring and fluorescence emission at 530 nm was measured after 3h and finally after one night. A LUVs solution without peptide was studied following the same procedure as a control experiment.

### 4.7. General procedure for fusion/hemifusion assays by DLS

Fusion/hemifusion experiments by DLS were performed using a Zeta-Sizer Nano (Malvern) considering the following parameters:  $n = 1.345$  ; Absorption = 0.001 ; water as solvent. The samples were analyzed at 37°C.

For each sample, 1.7 mL of 10 mM phosphate buffer without NaCl (pH 7.4), and 300  $\mu\text{L}$  of a 1mM LM3 LUVs solution (POPC/POPE/POPS/sphingomyelin/cholesterol 10/5/2/2/10) were poured into a screw-cap tube yielding a final concentration of 150  $\mu\text{M}$ . 60  $\mu\text{L}$  of a 100  $\mu\text{M}$  peptide solution (77  $\mu\text{L}$  of a 78  $\mu\text{M}$  solution for HCV6-S0 and 24  $\mu\text{L}$  of a 1 mM solution for Ac-Pen) was added yielding a

## Experimental part

peptide/lipid ratio 1/50 (1/12 for Ac-Pen). The samples were placed in a 37°C bath under stirring (800 rpm), and polydispersity and vesicle size (in intensity) were measured after 20 min and one night.

After one night, the same volume of peptide solution was added to the samples, and polydispersity and size were measured after another 20 min and one night.

A LUVs solution without peptide was studied following the same procedure as a control experiment.

### 4.8. General procedure for epifluorescence microscopy experiments

For experiments with MLVs, 100  $\mu$ L of a 5 mM MLVs solution in PBS buffer (10 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4) and 100  $\mu$ L of a 50  $\mu$ M peptide solution (100  $\mu$ M for TAT-S1') in PBS buffer were mixed in a Eppendorf tube. The mixture was vortexed gently then allowed to equilibrate at room temperature for 10 min. 15  $\mu$ L was then placed on a glass slide covered by a coverslip. Staining was examined with fluorescence conventional microscopy (Leica MLB). All pictures were acquired using a x63 zoom and analyzed with Image J software.

Chinese Hamster Ovarian cells (CHO, ATCC) were kindly provided by Pr. Franck Carreiras from the ERRMECe unit (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules, University of Cergy-Pontoise). The cells were grown in HAM F12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. For experiments, cells were harvested with 0.5% trypsin-EDTA (Invitrogen), then seeded onto glass coverslips at a density of 25,000 cells/cm<sup>2</sup> and incubated in culture medium for 24 h.

Cells were incubated with 400  $\mu$ L of a (100  $\mu$ M for TAT-S1' and 25  $\mu$ M for HCV7-S1'') peptide TFA-free solution (removed by several freeze-dryings with HCl 100 mM) in PBS buffer (10 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4) for 30 min and 1 h at 37°C. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde and washed with PBS. After washing, cell nuclei were stained using DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Coverslips were mounted in Prolong® Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen). Staining was examined with fluorescence conventional microscopy (Leica MLB). All pictures were acquired using a x63 zoom and analyzed with Image J software.

# **Bibliographie**



## Bibliographie

### Bibliographie

- (1) Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. *Science* **1989**, *244* (4902), 359.
- (2) Lindenbach, B. D. *Science* **2005**, *309*, 623.
- (3) Chisari, F. V. *Nature* **2005**, *436* (7053), 930.
- (4) World Health Organization. *Global hepatitis report, 2017*; 2017.
- (5) Hoofnagle, J.; Mullen, K.; Jones, D.; Rustgi, V.; Bisceglie, A.; Peters, M.; Waggoner, J.; Park, B.; Jones, E. N. *Engl. J. Med.* **1986**, *315* (25), 1575.
- (6) Witkowski, J. T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (11), 1150.
- (7) Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K. *Science* **1972**, *177*, 705.
- (8) Fried, M. W.; Fong, T. L.; Swain, M. G.; Park, Y.; Beames, M. P.; Banks, S. M.; Hoofnagle, J. H.; Di Bisceglie, A. M. *J. Hepatol.* **1994**, *21* (2), 145.
- (9) Kamar, N.; Rostaing, L.; Abravanel, F.; Garrouste, C.; Lhomme, S.; Esposito, L.; Basse, G.; Cointault, O.; Ribes, D.; Nogier, M. B.; Alric, L.; Peron, J. M.; Izopet, J. *Gastroenterology* **2010**, *139* (5), 1612.
- (10) Fried, M.; Shiffman, M. L.; Reddy, K. N. *Engl. J. Med.* **2002**, *347* (13), 975.
- (11) Heathcote, E. J.; Shiffman, M. L.; Cooksley, W. G. E.; Dusheiko, G. M.; Lee, S. S.; Balart, L.; Reindollar, R.; Reddy, R. K.; Wright, T. L.; Lin, A.; Hoffman, J.; De Pamphilis, J. N. *Engl. J. Med.* **2000**, *343* (23), 1673.
- (12) Lindsay, K. L.; Trepo, C.; Heintges, T.; Shiffman, M. L.; Gordon, S. C.; Hoefs, J. C.; Schiff, E. R.; Goodman, Z. D.; Laughlin, M.; Yao, R.; Albrecht, J. K. *Hepatology* **2001**, *34* (2), 395.
- (13) Vo, N. V.; Young, K.-C.; Lai, M. M. C. *Biochemistry* **2003**, *42* (35), 10462.
- (14) Maag, D.; Castro, C.; Hong, Z.; Cameron, C. E. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (49), 46094.
- (15) Bougie, I.; Bisailon, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (52), 52471.
- (16) Lowe, J. K.; Brox, L.; Henderson, J. F. *Cancer Res.* **1977**, *37* (3), 736.
- (17) Crotty, S.; Cameron, C. E.; Andino, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (12), 6895.
- (18) Tam, R. C.; Lau, J. Y.; Hong, Z. *Antivir. Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 261.
- (19) Li, G.; De Clercq, E. *Antiviral Res.* **2017**, *142*, 83.
- (20) Manns, M. P.; Wedemeyer, H.; Cornberg, M. *Gut* **2006**, *55* (9), 1350.
- (21) Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Shih, N.-Y.; Piwinski, J. J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 50.
- (22) Lawitz, E.; Mangia, A.; Wyles, D.; Rodriguez-Torres, M.; Hassanein, T.; Gordon, S. C.; Schultz, M.; Davis, M. N.; Kayali, Z.; Reddy, K. R.; Jacobson, I. M.; Kowdley, K. V.; Nyberg, L.; Subramanian, G. M.; Hyland, R. H.; Arterburn, S.; Jiang, D.; McNally, J.; Brainard, D.; Symonds, W. T.; McHutchison, J. G.; Sheikh, A. M.; Younossi, Z.; Gane, E. J. *Engl. J. Med.* **2013**, *368* (20), 1878.

## Bibliographie

- (23) Götte, M.; Feld, J. J. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13* (6), 338.
- (24) Nettles, J. H.; Stanton, R. A.; Broyde, J.; Amblard, F.; Zhang, H.; Zhou, L.; Shi, J.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Coats, S. J.; Kohler, J. J.; Schinazi, R. F. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (23), 10031.
- (25) Boson, B.; Denolly, S.; Turlure, F.; Chamot, C.; Dreux, M.; Cosset, F. L. *Gastroenterology* **2017**, *152* (4), 895.
- (26) Sun, J.-H.; O'Boyle II, D. R.; Fridell, R. A.; Langley, D. R.; Wang, C.; Roberts, S. B.; Nower, P.; Johnson, B. M.; Moulin, F.; Nophsker, M. J.; Wang, Y.-K.; Liu, M.; Rigat, K.; Tu, Y.; Hewawasam, P.; Kadow, J.; Meanwell, N. A.; Cockett, M.; Lemm, J. A.; Kramer, M.; Belema, M.; Gao, M. *Nature* **2015**, *527* (7577), 245.
- (27) Fontana, R. J.; Hughes, E.; Bifano, M. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13* (6), 1601.
- (28) Iyengar, S.; Tay-Teo, K.; Vogler, S.; Beyer, P.; Wiktor, S.; de Joncheere, K.; Hill, S. *PLoS Med.* **2016**, *13* (5), 1.
- (29) Rosenthal, E. S.; Graham, C. S. *Infect. Agent. Cancer* **2016**, *11* (1), 24.
- (30) Dyson, J. K.; Hutchinson, J.; Harrison, L.; Rotimi, O.; Tiniakos, D.; Foster, G. R.; Aldersley, M. A.; McPherson, S. *J. Hepatol.* **2016**, *64* (1), 234.
- (31) ANSM. Finalisation de la réévaluation des médicaments contenant de l'ambroxol ou de la bromhexine, retour d'information sur le PRAC de janvier 2015 - Point d'information <http://ansm.sante.fr/S-informer/Travaux-de-l-Agence-Europeenne-des-Medicaments-EMA-Comite-pour-l-evaluation-des-risques-en-matiere-de-pharmacovigilance-PRAC/Finalisation-de-la-reevaluation-des-medicaments-contenant-de-l-ambroxol-ou-de-la-bromhexine-retour> (accessed Aug 10, 2017).
- (32) Townsend, L. B. *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Springer US: Boston, MA, 1994.
- (33) Boutureira, O.; Matheu, M. I.; Díaz, Y.; Castellón, S. In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp 263–316.
- (34) Ramasamy, K. S.; Bandaru, R.; Averett, D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (18), 5849.
- (35) Dondoni, A.; Massi, A.; Aldhoun, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (20), 7677.
- (36) Dondoni, A.; Massi, A.; Sabbatini, S.; Bertolasi, V. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (20), 6979.
- (37) Butora, G.; Olsen, D. B.; Carroll, S. S.; McMasters, D. R.; Schmitt, C.; Leone, J. F.; Stahlhut, M.; Burlein, C.; MacCoss, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (15), 5219.
- (38) Hocek, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 9914.
- (39) Krohn, K.; Heins, H.; Wielckens, K. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (3), 511.
- (40) Harusawa, S.; Murai, Y.; Moriyama, H.; Imazu, T.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (13), 4405.
- (41) Hildbrand, S.; Blaser, A.; Parel, S. P.; Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (24), 5499.
- (42) Singh, I.; Seitz, O. *Org. Lett.* **2006**, *8* (19), 4319.
- (43) Trost, B. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5813.
- (44) Trost, B. M.; Machacek, M. R.; Aponick, A. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39* (10), 747.

## Bibliographie

- (45) Trost, B. M.; Kallander, L. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (15), 5427.
- (46) Zhang, H. C.; Daves, G. D. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (17), 4690.
- (47) Son, S.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1046.
- (48) A Phase 1 Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of BCX4430 - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02319772> (accessed Sep 2, 2017).
- (49) GS-5734 to Assess the Antiviral Activity, Longer-Term Clearance of Ebola Virus, and Safety in Male Ebola Survivors With Evidence of Ebola Virus Persistence in Semen <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610606678> (accessed Sep 2, 2017).
- (50) De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2301.
- (51) Burchenal, J. H.; Ciovacco, K.; Kalaher, K.; Kietner, R.; Dowling, M. D.; Chu, C. K.; Watanabe, K. A.; Wempen, I.; Fox, J. J. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1520.
- (52) Gutowski, G. E.; Sweeney, M. J.; DeLong, D. C.; Hamill, R. L.; Gerzon, K.; Dyke, R. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 544.
- (53) Sweeney, M. J.; Davis, F. A.; Gutowski, G. E.; Marnili, R. L.; Hoffman, D. H.; Poore, G. A. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2619.
- (54) Robins, R. K.; Srivastava, P. C.; Narayanan, V. L.; Plowman, J.; Paull, K. D. *J. Med. Chem.* **1982**, *25* (2), 107.
- (55) Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. *Nature* **2014**, *508* (7496), 402.
- (56) Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Lee, R.; Butler, T.; Metobo, S.; Aktoudianakis, V.; Lew, W.; Ye, H.; Clarke, M.; Doerffler, E.; Byun, D.; Wang, T.; Babusis, D.; Carey, A. C.; German, P.; Sauer, D.; Zhong, W.; Rossi, S.; Fenaux, M.; McHutchison, J. G.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1812.
- (57) Lubin-Germain, N.; Baltaze, J.-P.; Coste, A.; Hallonet, A.; Laureno, H.; Legrave, G.; Uziel, J.; Augé, J. *Org. Lett.* **2008**, *10* (5), 725.
- (58) Aït-Youcef, R.; Dos Santos, M.; Roussel, S.; Baltaze, J.-P.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (11), 4318.
- (59) Solarte, C.; Dos Santos, M.; Gonzalez, S.; Miranda, L. S. M.; Guillot, R.; Ferry, A.; Gallier, F.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Synthesis* **2017**, *49*, 1993.
- (60) Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Vita, P.; Jayaram, H. N.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Grifantini, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (15), 4983.
- (61) Damont, A.; Dukhan, D.; Gosselin, G.; Peyronnet, J.; Storer, R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26* (10–12), 1431.
- (62) Kirschberg, T. A.; Mish, M. R.; Zhang, L.; Squires, N. H.; Wang, K. Y.; Cho, A.; Feng, J. Y.; Fenaux, M.; Babusis, D.; Park, Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (5), 1040.
- (63) Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. *J. Virol.* **2003**, *77* (19), 10689.

## Bibliographie

- (64) Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A. B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A. L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C. A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L. C.; MacCoss, M.; Olsen, D. B. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (14), 11979.
- (65) Cosson, F.; Faroux, A.; Baltaze, J.; Farjon, J.; Guillot, R.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 755.
- (66) Hertel, L. W.; Kroin, J. S.; Misner, J. W.; Tustin, J. M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (11), 2406.
- (67) Devos, R.; Dymock, B. W.; Hobbs, C. J.; Jiang, W.; Martin, J. A.; Merrett, J. H.; Najera, I.; Shimma, N.; Tsukuda, T. Anti-HCV nucleoside derivatives. 20040110718, June 10, 2004.
- (68) Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (6), 447.
- (69) Clark, J. L.; Hollecker, L.; Mason, J. C.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; Lostia, S.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Furman, P. A.; Stec, W. J.; Patterson, S. E.; Pankiewicz, K. W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (17), 5504.
- (70) Lopes, A. B.; Wagner, P.; Octavio, R.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Bourguignon, J.-J.; Schmitt, M.; Miranda, L. S. M. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4540.
- (71) Walther, R.; Rautio, J.; Zelikin, A. N. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 10.1016/j.addr.2017.06.013.
- (72) Bardsley-Elliot, A.; Noble, S. *Drugs* **1999**, *58* (5), 851.
- (73) Jarvest, R. L.; Sutton, D.; Vere Hodge, R. A. *Pharm. Biotechnol.* **1998**, *11*, 313.
- (74) Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 677.
- (75) Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328.
- (76) Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10400.
- (77) Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (23), 3902.
- (78) Starrett, J. E. J.; Tortolani, D. R.; Russell, J.; Hitchcock, M. J. M.; Whiterock, V.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (12), 1857.
- (79) Choi, J.-R.; Cho, D.-G.; Roh, K. Y.; Hwang, J.-T.; Ahn, S.; Jang, H. S.; Cho, W.-Y.; Kim, K. W.; Cho, Y.-G.; Kim, J.; Kim, Y.-Z. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (11), 2864.
- (80) Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (12), 2521.
- (81) Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Périgaud, C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4* (4), 395.
- (82) Shirasaka, T.; Chokekijchai, S.; Yamada, A.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Mitsuya, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39* (11), 2555.
- (83) Hantz, O.; Périgaud, C.; Borel, C.; Jamard, C.; Zoulim, F.; Trépo, C.; Imbach, J. L.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **1999**, *40* (3), 179.
- (84) Shafiee, M.; Deferme, S.; Villard, A. L.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Lioux, T.; Pompon, A.; Varray, S.; Aubertin, A. M.; van Den Mooter, G.; Kinget, R.; Périgaud, C.; Augustijns, P. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (4), 448.

## Bibliographie

- (85) Peyrottes, S.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Périgaud, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 782.
- (86) De Lombaert, S.; Erion, M. D.; Tan, J.; Blanchard, L.; El-Chehabi, L.; Ghai, R. D.; Sakane, Y.; Berry, C.; Trapani, A. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (4), 498.
- (87) Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. J. *Med. Chem.* **1995**, *38* (8), 1372.
- (88) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J. *Antiviral Res.* **1992**, *17* (4), 311.
- (89) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; de Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048.
- (90) McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (8), 1748.
- (91) Mehellou, Y. *ChemMedChem* **2016**, 1114.
- (92) Erion, M. D.; Reddy, K. R.; Boyer, S. H.; Matelich, M. C.; Gomez-Galeno, J.; Lemus, R. H.; Ugarkar, B. G.; Colby, T. J.; Schanzer, J.; van Poelje, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (16), 5154.
- (93) Reddy, K. R.; Matelich, M. C.; Ugarkar, B. G.; Gómez-Galeno, J. E.; DaRe, J.; Ollis, K.; Sun, Z.; Craigo, W.; Colby, T. J.; Fujitaki, J. M.; Boyer, S. H.; van Poelje, P. D.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 666.
- (94) Yu, B.; Zhao, X.; Lee, L. J.; Lee, R. J. *AAPS J.* **2009**, *11* (1), 195.
- (95) Juliano, R. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (14), 6518.
- (96) Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 108.
- (97) Wittrup, A.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (9), 543.
- (98) Zhu, X.; Xu, Y.; Solis, L. M.; Tao, W.; Wang, L.; Behrens, C.; Xu, X.; Zhao, L.; Liu, D.; Wu, J.; Zhang, N.; Wistuba, I. I.; Farokhzad, O. C.; Zetter, B. R.; Shi, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (25), 7779.
- (99) Nuhn, L.; Hirsch, M.; Krieg, B.; Koynov, K.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Helm, M.; Zentel, R. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2198.
- (100) McBain, S. C.; Yiu, H. H. P.; El Haj, A.; Dobson, J. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2561.
- (101) Zhou, J.; Wu, J.; Hafdi, N.; Behr, J.-P.; Erbacher, P.; Peng, L. *Chem. Commun.* **2006**, *0* (22), 2362.
- (102) Hillaireau, H.; Le Doan, T.; Couvreur, P. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (9/10), 2608.
- (103) Löbenberg, R.; Araujo, L.; von Briesen, H.; Rodgers, E.; Kreuter, J. *J. Control. Release* **1998**, *50* (1–3), 21.
- (104) Lo, C.-L.; Lin, K.-M.; Hsiue, G.-H. *J. Control. Release* **2005**, *104* (3), 477.
- (105) Fresta, M.; Fontana, G.; Bucolo, C.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Puglisi, G. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (3), 288.
- (106) Vinogradov, S. V.; Zeman, A. D.; Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. *J. Control. Release* **2005**,

## Bibliographie

- 107 (1), 143.
- (107) Liu, X.; Wang, W.; Samarsky, D.; Liu, L.; Xu, Q.; Zhang, W.; Zhu, G.; Wu, P.; Zuo, X.; Deng, H.; Zhang, J.; Wu, Z.; Chen, X.; Zhao, L.; Qiu, Z.; Zhang, Z.; Zeng, Q.; Yang, W.; Zhang, B.; Ji, A. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (18), 11805.
- (108) Song, E.; Zhu, P.; Lee, S.-K.; Chowdhury, D.; Kussman, S.; Dykxhoorn, D. M.; Feng, Y.; Palliser, D.; Weiner, D. B.; Shankar, P.; Marasco, W. A.; Lieberman, J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (6), 709.
- (109) McNamara, J. O.; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (8), 1005.
- (110) 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.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K.; Manoharan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958.
- (111) Fiume, L.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Bonino, F.; Torrani-Cerenzia, M.; Verme, G.; Rapicetta, M.; Bertini, M.; Gervasi, G. B. *J. Viral Hepat.* **1997**, *4* (6), 363.
- (112) Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1624.
- (113) Boisguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; O'Donovan, L.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 52.
- (114) Morell, A.; Ashwell, G.; Irvine, A.; Sternlieb, I.; Cheinberg, I. H. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 155.
- (115) Ashwell, G.; Hardford, J. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51* (2), 531.
- (116) Cosset, F. *Virologie* **2006**, *10*, 179.
- (117) Huang, X.; Leroux, J.-C.; Castagner, B. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *27* (2), 283.
- (118) Massarelli, I.; Chiellini, F.; Chiellini, E.; Bianucci, A. M. *Int. J. Mol. Sci* **2010**, *11*, 3867.
- (119) Kolatkar, A. R.; Weis, W. I. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (12), 6679.
- (120) D'Souza, A. A.; Devarajan, P. V. *J. Control. Release* **2015**, *203*, 126.
- (121) Ahmed, M.; Narain, R. *Nanomedicine* **2015**, *10* (14), 2263.
- (122) Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966.
- (123) Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P. S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (2), 1316.
- (124) Robinson, M. A.; Charlton, S. T.; Garnier, P.; Wang, X.; Davis, S. S.; Perkins, A. C.; Frier, M.; Duncan, R.; Savage, T. J.; Wyatt, D. A.; Watson, S. A.; Davis, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (40), 14527.
- (125) Lee, K.; Rafi, M.; Wang, X.; Aran, K.; Feng, X.; Lo Sterzo, C.; Tang, R.; Lingampalli, N.; Kim, H. J.; Murthy, N. *Nat. Mater.* **2015**, *14* (7), 701.
- (126) Zacco, E.; Hütter, J.; Heier, J. L.; Mortier, J.; Seeberger, P. H.; Lepenies, B.; Kocsch, B. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2065.

## Bibliographie

- (127) Biessen, E. A. L.; Beuting, D. M.; Roelen, H. C. P. F.; van de Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1538.
- (128) Lai, C.-H.; Lin, C.-Y.; Wu, H.-T.; Chan, H.-S.; Chuang, Y.-J.; Chen, C.-T.; Lin, C.-C. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (22), 3948.
- (129) Sliedregt, L. A. J. M.; Rensen, P. C. N.; Rump, E. T.; van Santbrink, P. J.; Bijsterbosch, M. K.; Valentijn, A. R. P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (4), 609.
- (130) Khorev, O.; Stokmaier, D.; Schwardt, O.; Cutting, B.; Ernst, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (9), 5216.
- (131) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconj. J.* **1987**, *4*, 317.
- (132) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp 165–221.
- (133) Durham, T. B.; Roush, W. R. *Org. Lett.* **2003**, *5* (11), 1871.
- (134) Helferich, B.; Zirner, J. *Chem. Ber.* **1962**, *95* (11), 2604.
- (135) Wathier, M.; Polidori, A.; Ruiz, K.; Fabiano, A.-S.; Pucci, B. *New J. Chem.* **2001**, *25* (12), 1588.
- (136) Zemplén, G.; Kuntz, A. *Chem. Ber.* **1924**, *57B*, 1357.
- (137) Asai, N.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (9), 1210.
- (138) Koenigs, W.; Knorr, E. *Chem. Ber.* **1901**, *34* (1), 957.
- (139) Moran, L. A.; Horton, H. R.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D. In *Principles of Biochemistry*; Jaworski, A., Ed.; Pearson, 2011; pp 256–293.
- (140) Goodman, S. R. In *Medical Cell Biology*; Goodman, S. R., Ed.; Elsevier, 2007; pp 27–57.
- (141) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 112.
- (142) Kobayashi, T.; Beuchat, M.-H.; Chevallier, J.; Makino, A.; Mayran, N.; Escola, J.-M.; Lebrand, C.; Cosson, P.; Kobayashi, T.; Gruenberg, J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (35), 32157.
- (143) Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N. S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; Parton, R. G.; Vilbois, F.; Gruenberg, J. *Science* **2004**, *303* (5657), 531.
- (144) Scherrmann, J.-M.; Svensson, C. K.; Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92.
- (145) Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (5), 767.
- (146) Tietz, P. S.; Yamazaki, K.; LaRusso, N. F. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40* (6), 1419.
- (147) Komin, A.; Russell, L. M.; Hristova, K. A.; Searson, P. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 52.
- (148) Bechara, C.; Sagan, S. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693.
- (149) Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195.

## Bibliographie

- (150) Frankel, A. D.; Pabo, C. O.; Paskalis, H.; Pavlakis, G. N.; Popovic, M.; Arya, S.; Gallo, R. C.; Haseltine, W. A.; Debouck, C.; Gallo, R. C.; Wong-Staal, F. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189.
- (151) Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (25), 16010.
- (152) Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. *Science* **1999**, *285*, 1569.
- (153) Snyder, E. L.; Dowdy, S. F. *Expert Opin. on Drug Delivery* **2005**, *2* (1), 43.
- (154) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 1864.
- (155) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (14), 10444.
- (156) Joliot, A.; Prochiantz, A. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6* (3), 189.
- (157) Pooga, M.; Soomets, U.; Hällbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J.-X.; Xu, X.-J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Langel, Ü. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16* (9), 857.
- (158) Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (14), 2730.
- (159) Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (12), 1173.
- (160) Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (24), 13003.
- (161) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836.
- (162) Walrant, A.; Correia, I.; Jiao, C.; Lequin, O.; Bent, E. H.; Goasdoué, N.; Lacombe, C.; Chassaing, G.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808* (1), 382.
- (163) Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (27), 4244.
- (164) Jobin, M. L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848* (2), 593.
- (165) Ziegler, A.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2008**, *94* (6), 2142.
- (166) Ziegler, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2011**, *50* (21), 4650.
- (167) Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310.
- (168) Kaplan, I. M.; Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. *J. Control. Release* **2005**, *102* (1), 247.
- (169) Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (15), 15300.
- (170) Ziegler, A.; Nervi, P.; Dürrenberger, M.; Seelig, J. *Biochemistry* **2005**, *44* (1), 138.
- (171) Di Pisa, M.; Chassaing, G.; Swiecicki, J. M. *Biochemistry* **2015**, *54* (2), 194.
- (172) Jiao, C. Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (49), 33957.
- (173) Alves, I. D.; Jiao, C. Y.; Aubry, S.; Aussedat, B.; Burlina, F.; Chassaing, G.; Sagan, S.

## Bibliographie

- Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1798 (12), 2231.
- (174) Swiecicki, J.-M.; Bartsch, A.; Tailhades, J.; Di Pisa, M.; Heller, B.; Chassaing, G.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Lavielle, S. *ChemBioChem* **2014**, 15 (6), 884.
- (175) Alves, I. D.; Correia, I.; Jiao, C. Y.; Sachon, E.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Tollin, G.; Chassaing, G. *J. Pept. Sci.* **2009**, 15 (3), 200.
- (176) Alves, I. D.; Bechara, C.; Walrant, A.; Zaltsman, Y.; Jiao, C. Y.; Sagan, S. *PLoS One* **2011**, 6 (9), e24096.
- (177) Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19 (3), 491.
- (178) Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, 6, 1.
- (179) Andreu, D.; Rivas, L. *Biopolymers* **1998**, 47, 415.
- (180) Hoskin, D. W.; Ramamoorthy, A. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2008**, 1778 (2), 357.
- (181) Shai, Y. *Biopolymers* **2002**, 66 (4), 236.
- (182) Bahar, A. A.; Ren, D. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (12), 1543.
- (183) Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R. E. W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (38), 35714.
- (184) Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, 34 (19), 6521.
- (185) Henriques, S. T.; Melo, M. N.; Castanho, M. A. R. B. *Biochem. J.* **2006**, 399 (1), 1.
- (186) Kobayashi, S.; Chikushi, A.; Tougu, S.; Imura, Y.; Nishida, M.; Yano, Y.; Matsuzaki, K. *Biochemistry* **2004**, 43 (49), 15610.
- (187) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. *J. Control. Release* **2011**, 151 (3), 220.
- (188) Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56 (7), 967.
- (189) Pack, D. W.; Putnam, D.; Langer, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 67 (2), 217.
- (190) Kielian, M. *Virology* **2006**, 344 (1), 38.
- (191) Eckert, D. M.; Kim, P. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70 (1), 777.
- (192) Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. *Nature* **2005**, 436 (7053), 933.
- (193) Meertens, L.; Bertaux, C.; Dragic, T. *J. Virol.* **2006**, 80 (23), 11571.
- (194) Vieyres, G.; Thomas, X.; Duverlie, G.; Patel, A. H.; Dubuisson, J. *J. Virol.* **2010**, 84 (19), 10159.
- (195) Garry, R. F.; Dash, S. *Virology* **2003**, 307 (2), 255.
- (196) Drummer, H. E.; Boo, I.; Maerz, A. L.; Pountourios, P. *J. Virol.* **2006**, 80 (16), 7844.
- (197) Flint, M.; Thomas, J. M.; Maidens, C. M.; Shotton, C.; Levy, S.; Barclay, W. S.; McKeating, J. A. *J. Virol.* **1999**, 73 (8), 6782.
- (198) Drummer, H. E.; Boo, I.; Pountourios, P. *J. Gen. Virol.* **2007**, 88, 1144.
- (199) Lavillette, D.; Pecher, E. I.; Donot, P.; Fresquet, J.; Molle, J.; Corbau, R.; Dreux, M.; Penin,

## Bibliographie

- F.; Cosset, F. L. *J. Virol.* **2007**, *81* (16), 8752.
- (200) Pérez-Berná, A. J.; Moreno, M. R.; Guillén, J.; Bernabeu, A.; Villalaín, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3755.
- (201) Pérez-Berná, A. J.; Pabst, G.; Laggner, P.; Villalaín, J. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788* (10), 2183.
- (202) Li, H.-F.; Huang, C.-H.; Ai, L.-S.; Chuang, C.-K.; Chen, S. S. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 89.
- (203) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149.
- (204) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. In *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press, 1997; pp 19–94.
- (205) Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. *Org. Lett.* **2004**, *7*, 1127.
- (206) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720.
- (207) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1264.
- (208) Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R. L.; Neves, N. M. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140459.
- (209) Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 147.
- (210) Davies, S. M.; Epand, R. F.; Bradshaw, J. P.; Epand, R. M. *Biochemistry* **1998**, *37* (16), 5720.
- (211) Joanne, P.; Galanth, C.; Goasdoué, N.; Nicolas, P.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; El Amri, C.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788* (9), 1772.
- (212) Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 103.
- (213) Ziegler, A.; Blatter, X. L.; Seelig, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9185.
- (214) Piantavigna, S.; McCubbin, G. A.; Boehnke, S.; Graham, B.; Spiccia, L.; Martin, L. L. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808* (7), 1811.
- (215) Beschiaschvili, G.; Seelig, J. *Biochemistry* **1992**, *31* (41), 10044.
- (216) Schote, U.; Ganz, P.; Fahr, A.; Seelig, J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (3), 856.
- (217) Turner, D. C.; Straume, M.; Kasimova, M. R.; Gaber, B. P. *Biochemistry* **1995**, *34* (29), 9517.
- (218) Reshetnyak, Y. K.; Andreev, O. A.; Segala, M.; Markin, V. S.; Engelman, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (40), 15340.
- (219) Swiecicki, J.-M.; Di Pisa, M.; Burlina, F.; Lécorché, P.; Mansuy, C.; Chassaing, G.; Lavielle, S. *Biopolymers* **2015**, *104* (5), 533.
- (220) Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.; Futaki, S. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56* (26), 7644.
- (221) Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Simmons, J. A.; White, J. M.; Tamm, L. K. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 1.
- (222) Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11401.
- (223) Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* **1981**, *20* (14), 4093.

## Bibliographie

- (224) MacDonald, R. I. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (23), 13533.
- (225) Loura, L. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. J. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104* (29), 6920.
- (226) Wadhvani, P.; Reichert, J.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41* (2), 177.
- (227) Meng, S.; Wei, B.; Xu, R.; Zhang, K.; Wang, L.; Zhang, R.; Li, J. *Intervirology* **2009**, *52* (3), 135.
- (228) Moschos, S. A.; Jones, S. W.; Perry, M. M.; Williams, A. E.; Erjefalt, J. S.; Turner, J. J.; Barnes, P. J.; Sproat, B. S.; Gait, M. J.; Lindsay, M. A. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (5), 1450.
- (229) Lo, S. L.; Wang, S. *Biomaterials* **2008**, *29* (15), 2408.
- (230) El-Andaloussi, S.; Järver, P.; Johansson, H. J.; Langel, Ü. *Biochem. J.* **2007**, *407* (2), 285.
- (231) Nagarapu, L.; Karnakanti, S.; Bantu, R. *Tetrahedron* **2012**, *68* (29), 5829.
- (232) Kam, B. L.; Barascut, J.-L.; Imbach, J.-L. *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 285.
- (233) Laurence, C.; Queignec-Cabanetos, M.; Wojtkowiak, B. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 135.
- (234) Witte, P.; Beuerle, F.; Hartnagel, U.; Lebovitz, R.; Savouchkina, A.; Sali, S.; Guldi, D.; Chronakis, N.; Hirsch, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (22), 3599.
- (235) Forsyth, C. J.; Ying, L.; Chen, J.; La Clair, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (12), 3858.
- (236) Poonthiyil, V.; Golovko, V. B.; Fairbanks, A. J.; Fairhurst, S. A.; Innocenti, P.; Fairbanks, A. J.; Donohoe, T. J.; Davis, B. G.; Russell, D. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5215.
- (237) Ramrao Patil, P.; Ravindranathan Kartha, K. P. *Green Chem.* **2009**, *11* (7), 953.
- (238) Loiseau, F. A.; Hii, K. K. M.; Hill, A. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 639.
- (239) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34* (2), 595.
- (240) Bartlett, G. R. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 468.





## **Résumé :**

Le virus de l'hépatite C (VHC) est, encore aujourd'hui, un problème de santé mondiale majeur entraînant dans certains cas des cirrhoses et des hépatocarcinomes. De nombreux efforts ont été fournis depuis les années 80 afin de développer un traitement efficace et sûr de cette infection touchant les hépatocytes. Le traitement interféron/ribavirine, utilisé dans les années 2000, a aujourd'hui été remplacé par des thérapies utilisant des agents antiviraux directs, beaucoup plus efficaces. Ces traitements restent cependant perfectibles notamment du fait de certains effets secondaires, de leur coût élevé et de potentielles interactions médicamenteuses avec d'autres composés thérapeutiques. L'équipe de glycochimie du Laboratoire de Chimie Biologique s'est intéressée à la synthèse de C-nucléosides analogues de la ribavirine. Parmi-eux, un composé, le SRO91, s'est révélé efficace contre des réplicons du VHC et présente une faible toxicité. Dans le but d'améliorer l'activité anti-VHC du SRO91, deux axes ont été développés dans ce projet : l'adressage vers les cellules du foie, et l'amélioration de la pénétration cellulaire. Un premier conjugué entre un galactoside et SRO91 a ainsi été synthétisé, afin de profiter de la forte interaction du galactose avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines, principalement exprimés à la surface des hépatocytes. Afin d'améliorer sa pénétration cellulaire, le nucléoside a également été conjugué à des peptides de fusion du VHC. Ces séquences peptidiques très hydrophobes sont capables de s'insérer dans la membrane cellulaire et de permettre la fusion. Trois peptides ont été sélectionnés en se basant sur la littérature : HCV3 (VFLVG), HCV6 (YVGDLSGSVFL) et HCV7 (SWHINRTALNSNDS), synthétisés par SPPS puis conjugués au nucléoside ou à un fluorophore. L'activité membranotropique des peptides sur des liposomes a alors été étudiée par calorimétrie (DSC et ITC), spectrofluorescence et microscopie à épifluorescence. Ces études ont ainsi permis de montrer que, parmi les séquences sélectionnées, HCV7 semble montrer la meilleure activité en pénétration membranaire alors que HCV6 s'est révélé être la séquence la plus fusogénique.

## **Abstract :**

Hepatitis C virus (HCV) is a global healthcare issue responsible for cirrhosis and hepatocarcinoma. Strong efforts have been made since the 80's to develop efficient and safe treatments for this liver infection. Hence, the treatment based on interferon/ribavirin, developed in 2002, has been replaced by much more efficient therapies involving direct-acting antivirals. However, the different side-effects, high cost and possible drug-drug interactions make room for improvements to this treatment. In the Laboratoire de Chimie Biologique, several C-nucleosides, analogs of ribavirin have been developed. Among them, one compound, named SRO91, seems effective against HCV replicons with low toxicity. This thesis work focused on improving SRO91 anti-HCV activity by implementing a targeting strategy and enhancing cell-penetration. We built our targeting strategy on the strong interaction between galactose and asialoglycoprotein receptors. Thus, a SRO91-galactose conjugate was synthesized, in order to address the antiviral to hepatocytes. To enhance cell-penetration we conjugated our nucleoside to HCV fusion peptides, since these highly hydrophobic sequences are able to anchor in cell membranes, leading to fusion. Three peptides were selected based on the literature: HCV3 (VFLVG), HCV6 (YVGDLSGSVFL) and HCV7 (SWHINRTALNSNDS), synthesized by SPPS and conjugated to SRO91 or a fluorescent tag. Several techniques were used to study the membranotropic activity of these sequences on liposomes as membrane models, including calorimetry (DSC and ITC), spectrofluorescence and epifluorescence microscopy. Thus, among the selected peptides, HCV7 seems to be the more potent as a membrane-penetrating agent but HCV6 shows the best fusogenic activity.