



HAL
open science

Etude de deux ANPs Antiviraux : caractéristiques physico-chimiques du LAVR-289 et formulations innovantes du Ténofovir

Thomas Mathieu

► To cite this version:

Thomas Mathieu. Etude de deux ANPs Antiviraux : caractéristiques physico-chimiques du LAVR-289 et formulations innovantes du Ténofovir. Chimie analytique. Université d'Orléans, 2024. Français. NNT : 2024ORLE1021 . tel-04739165

HAL Id: tel-04739165

<https://theses.hal.science/tel-04739165v1>

Submitted on 16 Oct 2024

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

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

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Thomas MATHIEU

soutenue le : 16 juillet 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Etude de deux ANPs Antiviraux :
Caractéristiques physico-chimiques du
LAVR-289 et formulations innovantes
du Ténofovir**

THÈSE dirigée par :

Luigi A. AGROFOGLIO

Professeur, Université d'Orléans

Encadrée par :

Patrick FAVETTA

Maître de conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Valérie DESVERGNES

Chargée de recherche HDR, CNRS, Université de Bordeaux

Isabelle LEFÈVRE-TOURNIER

Professeure, Université de Montpellier

JURY :

Luigi A. AGROFOGLIO

Professeur, Université d'Orléans

Valérie DESVERGNES

Chargée de recherche HDR, CNRS, Université de Bordeaux

Patrick FAVETTA

Maître de conférences, Université d'Orléans

Isabelle LEFÈVRE-TOURNIER

Professeure, Université de Montpellier – Présidente du Jury

Membre invité :

François CAIRE-MAURISIER

Professeur agrégé du Val-de-Grâce, Pharmacie Centrale
des Armées

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi Agrofoglio et encadré par le Dr Patrick Favetta.

Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Isabelle Lefèbre-Tournier et le Dr Valérie Desvergnès d'avoir accepté d'être rapportrices de ce travail de thèse. Mes remerciements vont également au Colonel François Caire-Maurisier pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité de membre invité.

Je tiens à remercier le Pr. Luigi Agrofoglio de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a portée. Je le remercie pour la liberté qu'il m'a accordée pour conduire les projets qu'il m'a confiés. J'aimerais également le remercier pour son expertise et son aide en synthèse organique.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr Patrick Favetta pour son investissement, son encadrement et sa très grande disponibilité. J'ai grandement apprécié les nombreuses heures que vous avez consacrées à discuter de mes idées (plus ou moins farfelues), à m'apporter de précieux conseils mais également toutes nos discussions « non scientifiques ». Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises en chimie analytique ou sur les MIPs, permettant de mener à bien ce projet de thèse. Votre générosité nous aura permis de trouver du réconfort dans les nombreuses sucreries que vous avez ramenées. Un grand merci car cette thèse et ce manuscrit n'auraient pas été possibles sans vous.

Je souhaite remercier par la suite le Dr Vincent Roy pour sa contribution et ses précieux conseils en chimie organique.

Je tiens également à remercier le Colonel François Caire-Maurisier ainsi que le Lieutenant-colonel Michael Pasteur, pour leur accueil à la Pharmacie Centrale des Armées et de m'avoir permis d'assister à la formation sur les systèmes lipidiques.

Je tiens aussi à remercier les membres de la plateforme analytique et en particulier le Dr Cyril Colas pour les différentes analyses. Je remercie également le personnel administratif de l'ICOA, sans qui le travail au quotidien serait bien difficile, et notamment, Christophe Dubois, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif, Sophie Nicourt et Laurent Robin.

La suite de mes remerciements va évidemment aux membres du labo 6, que j'ai pu côtoyer au quotidien pendant ces trois années de thèse. Je remercie tout d'abord Milène qui a commencé sa thèse en même temps que la mienne et qui s'est révélée d'un grand soutien durant ces trois années. Je tiens ensuite à remercier « El Koulal » d'avoir réalisé son stage de Master 2 à mes côtés ainsi que pour son aide dans la réalisation de ce projet. Je remercie également Mohammed, mon voisin de paillasse au labo 7, pour son extrême gentillesse, ses nombreux conseils et les nombreux moments de rigolade que nous avons partagés. Mes remerciements vont également à Carolina et Kathleen. Carolina, j'aimerais te remercier pour tous tes conseils en synthèse, ta gentillesse et de m'avoir permis de pratiquer l'anglais pendant 2 ans. Merci Kathleen pour tes conseils, ton écoute dans les moments difficiles et de doute et pour nos nombreuses discussions sur le parking de l'ICOA. Un grand merci pour ton aide dans le projet et j'espère que tu t'épanouiras dans ton nouveau travail, tu le mérites. Enfin, un énorme merci à Mathias qui est arrivé dans ma dernière année de thèse et qui m'a beaucoup aidé dans le projet. Je te remercie pour ton aide et tes nombreux conseils pertinents dans la rédaction de ce manuscrit de thèse. J'adresse particulièrement mes remerciements aux membres du labo 7, Rémi et Julien de m'avoir accepté et supporté dans leur laboratoire. Une mention spécial à Julien pour les fous rires, ta bonne humeur ainsi que pour nos nombreuses discussions diverses et variées. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et surtout pour la rédaction.

Je tiens ensuite à remercier les membres des autres labos. En particulier Marion et Kévin pour les diverses sorties, les parties de jeux de société et les soirées foot qui nous ont permis de mieux nous connaître. Je remercie également Elodie, même si cela avait mal commencé, pour son énorme gentillesse, sa bienveillance et son altruisme. Je te souhaite également un bon courage pour cette fin de thèse mais je ne me fais pas de soucis connaissant tes capacités de travail. Sans oublier Modou, Khalid, Rayan, Simon, Thibaut, Angelo, Jonathan, et Martin avec qui j'ai apprécié discuter et partager de bons moments le midi et à l'extérieur. Enfin, nous n'aurions pas dû nous rencontrer mais un grand merci à Pierre pour ton court passage à l'ICOA, ce fût une agréable rencontre.

Je tiens à adresser un énorme merci à Khalid, Jonathan, Mathias et Benjamin, la « team padel », qui m'ont permis de découvrir ce magnifique sport, et de me permettre de décompresser dans les moments importants. Un immense merci à Benjamin, mon coéquipier, d'avoir partagé ces nombreux moments à mes côtés (j'espère qu'on gagnera prochainement un p25).

La suite de mes remerciement vont à Mathias, Benjamin, Elisa et Milène qui sont devenus de véritables amis. Merci pour tous les moments passés ensemble au labo et surtout en dehors qui m'ont permis de

me relaxer. Je suis content d'avoir pu partager avec vous ma passion pour les jeux de société et pour les escape games. Elisa, je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.

Des remerciements particuliers vont à mes amis d'enfance, Choupin, Alex et PQ avec qui j'ai grandi et mûri et que je considère comme des frères. Merci pour les nombreuses soirées consoles (malgré mon niveau) et pour tous les moments passés ensemble durant toutes ces années. Malgré la distance durant cette dernière année, je tiens à vous remercier pour votre soutien indéfectible et votre amitié sincère.

Je n'oublie pas également mes amis de « Bordeaux » qui m'ont permis de me ressourcer à chaque instant passé en leur compagnie. Merci à Thibaud, Seb et Brian pour les nombreuses heures passées à jouer aux jeux de société et pour les randos plus au moins praticables. Une mention spéciale pour Aurélie et Elodie pour leurs immenses soutiens durant ces 3 ans et en particulier durant la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, rien n'aurait été possible sans le soutien de ma famille. Un grand merci à mes tatas. Merci, Sandrine, ma confidente, d'avoir toujours été présente, dans les moments difficiles et de doute, ainsi que pour tes conseils avisés et sans jugement que cela soit pendant la thèse ou ultérieurement. Un grand merci également pour ton sens de l'humour. Merci, Phany de nous avoir accueillis chez toi pendant les vacances et de me permettre de me changer les idées surtout grâce à nos passions communes pour les jeux de société et les énigmes ! Merci pour ta grande disponibilité, nos discussions et ta gentillesse. Je tiens à remercier du fond du cœur mes grands-mères et mes parents sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenu et encouragé et d'avoir essayé de comprendre ce que je faisais. Je remercie aussi ma petite sœur, Camille, qui a toujours cru en moi. Je suis fier d'être ton grand frère.

Je tiens bien sûr à remercier profondément celle avec qui j'ai commencé la thèse et qui est devenue plus qu'une simple collègue. Merci Milène, d'avoir partagé nos moments de doutes, de stress mais aussi de joies et de rires. Cela n'aura pas été facile de rédiger en même temps mais cela nous a renforcé. Merci de partager ta vie avec moi depuis 3 ans.

Pour finir, je remercie du fond du cœur tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Table des matières

Abréviations	13
Conventions et nomenclature	16
Liste des figures	17
Liste des tableaux	23
Liste des schémas	25
Introduction Générale	27
Chapitre 1 : Développement d'un acyclonucléoside phosphonate : Approches et Stratégies Thérapeutiques	29
1. Les acyclonucléosides phosphonate (ANPs)	30
1.1. Découvertes des acyclonucléosides phosphonates	30
1.2. Mécanisme d'action et limitations des ANPs	33
2. Approche pronucléotide ou prodrogue	35
2.1. Qu'est qu'une prodrogue ?	35
2.2. Les prodrogues de type carbonyloxyméthyle { <i>Bis</i> (POM) et <i>Bis</i> (POC)}	37
2.3. Les prodrogues de types phosphate alcoxyalkyles	39
2.4. Phosphoramidates et phosphonamidates	42
2.5. Les prodrogues de type mixte HDP/POC	45
3. Les ANPs portant une nucléobase de type O-diaminopyrimidine	47
4. Les ANPs de squelette oléfinique, une nouvelle famille	49
5. Généralités sur le développement d'un médicament	51
5.1. Rappel sur le développement d'un médicament	51
5.2. Les objectifs de la pré-formulation	52
5.3. Voies d'administration des médicaments	53
6. Systèmes de délivrance des antiviraux	55
6.1. Système de Classification Biopharmaceutique (BCS)	55
6.2. Stratégies pour augmenter la solubilité de la classe II	57
7. « Objectifs de la thèse »	59
Chapitre 2 : Etudes préliminaires du LAVR-289 et détermination de ses paramètres physico-chimiques	63
1. Le LAVR-289, un antiviral à large spectre	64
1.1. Rappel sur la synthèse du LAVR-289	64
1.2. Données antivirales	67
1.3. Caractéristiques de la structure	68
2. Méthodes analytiques	72
2.1. Mise en place d'une méthode analytique	72

2.2.	Identification de deux impuretés	76
2.3.	Mise au point du changement d'échelle pour purification HPLC semi-préparative du LAVR-289	78
2.3.1.	Séparation du LAVR-289	78
2.3.2.	Séparation à l'échelle semi-préparative d'un analogue du LAVR-289	80
2.4.	Séparation des stéréoisomères du LAVR-289 dus au phosphore chiral	83
3.	Stabilité plasmatique du LAVR-289	85
3.1.	Métabolites théoriques	85
3.2.	Méthode de traitement de l'échantillon	86
3.3.	Choix de la longueur d'onde d'analyse	88
3.4.	Choix de l'étalon interne	89
3.5.	Protocole des expériences de stabilité plasmatique	90
3.6.	Gamme du LAVR-289 dans le plasma	91
3.7.	Résultats des expériences de stabilité plasmatique du LAVR-289	92
3.7.1.	Préparation de l'expérience	92
3.7.2.	Analyse des échantillons	93
3.8.	Couplage UPLC-HRMS	95
3.8.1.	Synthèse d'un nouvel étalon interne	95
3.8.2.	Mise en place de la méthode analytique	96
3.9.	Comparaison de la stabilité plasmatique de deux analogues du LAVR-289	100
3.9.1.	Analogue <i>bis</i> (POC)-LAVR	100
3.9.2.	Analogue LAVR-290	105
4.	Stabilité au pH du LAVR-289	110
4.1.	Mode opératoire	110
4.2.	Stabilité en conditions basiques et acides forts	110
4.3.	Stabilité en fonction du pH	111
4.4.	Identification des produits de dégradation	113
5.	Détermination du Log P du LAVR-289	119
5.1.	Détermination du Log P par la méthode « shake flask »	120
5.1.1.	Principe	120
5.1.2.	Application au LAVR-289	121
5.2.	Détermination du Log P par chromatographie	122
5.2.1.	Principe	122
5.2.2.	Application au LAVR-289	123
6.	Stabilité aux solvants	124
6.1.	Mode opératoire	125

6.2.	Résultats	125
7.	Détermination du pKa de LAVR-289.....	129
7.1.	Détermination par spectroscopie UV-visible	130
7.2.	Application au LAVR-289.....	131
7.2.1.	Etudes préliminaires et mode opératoire	131
7.2.2.	Exploitation des résultats	132
8.	Détermination de la « concentration d'agrégation critique » (CAC)	136
8.1.	Le pyrène	138
8.2.	Mode opératoire	139
8.3.	Résultats	139
9.	Essais de formulation en micelles	141
9.1.	Mode opératoire	141
9.2.	Caractérisation de la solution.....	142
9.3.	Test <i>in vitro</i>	143
9.4.	Alternatives au SDS	144
	Conclusions et perspectives	146
	Chapitre 3 : Les polymères à empreintes moléculaires	151
1.	Généralité sur les polymères à empreintes moléculaires.....	152
2.	Les MIPs comme systèmes de libération contrôlée de bioactifs	154
3.	Synthèse des polymères à empreinte moléculaire	158
3.1.	Les différentes méthodologies de synthèse.....	158
3.1.1.	Approche covalente	159
3.1.2.	Approche non-covalente	160
3.1.3.	Approche semi-covalente.....	161
3.2.	Choix des réactifs pour la synthèse des MIPs	162
3.2.1.	Le template.....	163
3.2.2.	Les monomères	165
3.2.3.	Le réticulant.....	167
3.2.4.	Le solvant porogène	168
3.3.	Les différentes formes de polymères imprimés.....	171
3.3.1.	Polymère monolithique ou en bulk.....	172
3.3.2.	La polymérisation par précipitation	173
3.3.3.	Core-shell.....	176
4.	Caractérisations des polymères imprimés	179
4.1.	Etude de la recapture par Batch.....	180
4.2.	Les modèles d'isothermes d'adsorption	181

Chapitre 4 : Développement de polymères à empreintes moléculaires pour la délivrance du Ténofovir	185
1. Données préliminaires	186
1.1. Synthèse du LAVR-289 sous sa forme phosphonate	186
1.2. Choix du template	190
1.3. Choix des monomères	192
2. Méthode analytique	194
2.1. Mise en place de la séparation	194
2.2. Gamme d'étalonnage	196
Partie A : Synthèse de divers MIPs par polymérisation par précipitation	201
1. Choix du solvant	201
2. Choix des monomères reconnaissant l'adénine du ténofovir	204
2.1. Monomères commerciaux	204
2.2. Synthèse des analogues <i>N1</i> -(méth)acrylamide uracile	204
3. Comparaison des solvants de synthèse ou porogènes	207
4. Synthèse du dérivés <i>N1</i> -[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine	210
5. Synthèses des polymères à empreintes moléculaires dans le mélange ACN/H ₂ O	212
5.1. Choix du ratio monomère : template pour l'interaction échange d'ions	212
5.2. Polymérisation avec des monomères de type allyle	214
5.3. Polymérisation avec des monomères de types acrylates	217
5.3.1. Synthèse d'un polymère avec l'acide méthacrylique	217
5.3.2. Synthèse de polymères avec le composé 119	218
5.3.3. Extraction du ténofovir	219
5.3.4. Analyse microscopique de la formulation 2	220
5.3.5. Etude de l'adsorption du ténofovir	220
5.3.6. Etude de la cinétique de relargage du ténofovir	224
6. Utilisation d'un « dummy-template »	228
6.1. Synthèse des dérivés de ténofovir	229
6.2. Méthode analytique	229
6.3. Polymérisation par précipitation	229
6.4. Utilisation d'un analogue DAPy 31 comme « dummy-template »	231
Conclusions et perspectives	232
Partie B : Développement d'un core-shell imprimé à base de polydopamine	234
1. Pourquoi la polydopamine ?	234
2. Synthèse des nanoparticules	235
2.1. Synthèse de la polydopamine	235

2.2.	Synthèse de poly-(<i>N</i> -méthacrylamide)dopamine	238
2.2.1.	Synthèse de la <i>N</i> -méthacrylamide dopamine	238
2.2.2.	Polymérisation de la <i>N</i> -méthacrylamide dopamine.....	239
2.2.3.	Synthèse d'un copolymère à base de dopamine et <i>N</i> -méthacrylamide dopamine....	240
2.3.	Synthèse de L-polydopamine (L-PDA)	241
3.	Modification de surface de la polydopamine.....	244
3.1.	Synthèse des électrophiles.....	245
3.2.	Modification de la surface des nanoparticules de PDA.....	247
4.	Synthèse du core-shell-imprimé	248
4.1.	Vérification de l'adsorption du ténofovir	248
4.2.	Synthèse du core-shell	249
5.	Isothermes d'adsorption	253
5.1.	Etude de la formulation 1.....	254
5.2.	Etude de la formulation 3.....	254
5.2.1.	Recapture du ténofovir	254
5.2.2.	Etude cinétique de relargage du ténofovir	257
6.	Synthèse de dérivés analogues d'uracile comportant une fonction acrylate et électrophile	259
6.1.	Dérivés de l'uracile portant les fonctions en <i>N1</i> et en <i>C5</i>	259
6.1.1.	A partir du 5-aminouracile 150	259
6.1.2.	A partir du 5-bromouracile 153	260
6.2.	Synthèse du <i>N1</i> -[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile	261
	Conclusions et perspectives	264
	Conclusion générale et perspectives.....	269
	Experimental part.....	273
	General.....	274
1.	Organic synthesis.....	275
2.	Degradation of LAVR-289 in basic conditions	306
3.	Synthesis of imprinted polymer by precipitation polymerization	308
4.	Synthesis of PDA nanoparticles.....	308
5.	Surface derivatization of polydopamine	308
6.	Core-shell synthesis.....	309
7.	Extraction and quantification of tenofovir or dummy-template	309
8.	Rebinding of tenofovir.....	309
9.	Kinetic study of tenofovir release	310
10.	Préparation of pH solutions	310
10.1.	Stock solution	310

10.2. Solution at different pH values.....	310
Annexes	313
Articles et communications.....	321

Abréviations

A

A : adénine
AA : acrylamide
ACN : Acétonitrile
ACPA : 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid)
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination
ADN : Acide 2'-désoxyribonucléique
AIBN : 2,2'-azobis(isobutyronitrile)
AMAP : 1-(Acryloyloxy)-3-(methacryloyloxy)-2-propanol
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANP : Acyclonucléoside phosphonate
APS : Ammonium persulfate
Ar : Aryle
ARN : Acide ribonucléique

B

B : Base hétérocyclique
BCS : Système de classification biopharmaceutique
BHE : Barrière hématoencéphalique
Boc : *tert*-Butoxycarbonyl
BSA : *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide

C

C : Cytosine
CAC : Concentration d'agrégation critique
CAL-B : lipase B de *Candida Antarctica*
CC₅₀ : Concentration cytotoxique pour réduire de 50% des cellules saines
CCM : Chromatographie sur couche mince
CMR : Cancérigène, mutagène, reprotoxique
CMV : Cytomégalovirus

D

DA : Dopamine
DA-L : Dopamine Lactolysé
DAPy : 2,4-Diaminopyrimidine
DCC : *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide
DCE : 1,2-Dichloroéthane
DCM : Dichlorométhane

DDS : « Drug Delivery System » - Système de délivrance de médicaments
DHI : 5,6-dihydroxyindole
DHPA : 9-(2,3-dihydroxypropyl)adénine
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMAEM : 2-(Diméthylamino)ethyl methacrylate
DME : 1,2-Diméthoxyéthane
DMF : *N,N*-Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde

E

EGDMA : Ethylène glycol diméthacrylate
ESI : Ionisation par électronébuliseur
EtOH : Ethanol

F

F : Freundlich
F-L : Freundlich-Langmuir
FDA : Food and Drug Administration

G

G : Guanine

H

HBV : Virus de l'hépatite B
HCMV : Cytomégalovirus Humain
HDP : 3-(Héxadécyloxy)-1-propanol
HEMA : méthacrylate d'hydroxyéthyle
HLB : Balance hydrophile et lipophile
HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMDS : hexaméthylidisilazane
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
HPMPA : 9-[3-Hydroxy2-(phosphonométhoxy)propyl]adénine
HPMPC : 1-[3-Hydroxy2-(phosphonométhoxy)propyl]cytosine
HPMPO-DAPy : 2,4-Diamino-6-(*R*)-[3-Hydroxy-2-(phosphonométhoxy)propoxy] pyrimidine
HRMS : Spectroscopie de masse à haute résolution

HSV : Virus de l'Herpès simplex
hTMPK : *Thymidine monophosphate kinase*
humaine

I

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%
IPDI : Isophorone diisocyanate
IV : Intraveineuse

L

L : Langmuir
LC : Chromatographie liquide
L-Dopa : Levodopa
LLE : Extraction liquide-liquide
LPC : lysophosphatidylcholine
L-PDA : Levo-polydopamine

M

MAA : acide méthacrylique
MEB : Microscopie à balayage électronique
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MIP : Polymère à empreintes moléculaires
(Molecularly Imprinting Polymer)
MPXV : virus de la variole du singe
MS : Spectrométrie de masse
MSV : Virus de la striure du maïs

N

MeOH : Méthanol
NaOtBu : *tert*-butanoate de sodium
NHS : *N*-Hydroxysuccinimide
NIP : Polymère non imprimé (Non Imprinting
Polymer)
NOESY : *Nuclear overhauser effect*
spectroscopy

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PBS : Phosphate buffered Saline
PCA : Acide perchlorique
PDA : Polydopamine
PETRA : pentaérythritol triacrylate
PLDA : Poly-L-dopamine
PLE : Estérase de foie de porc (Pig Liver
esterase)

PMEA : 9-[2-
(phosphonométhoxy)éthyl]adénine
PMEO-DAPy : 2,4-diamino-6-[2-
(phosphonométhoxy)éthoxy]pyrimidine
PMPA : 9-(2-
phosphonométhoxy)propyl]adénine
PMPO : 2,4-diamino-6-[2-
(phosphonométhoxy)propoxy]pyrimidine
POC : *iso*Propyl oxyméthyl carbonate
POCCI : chlorométhyl *isopropyl* carbonate
POM : pivaloyloxyméthyle
PPT : Précipitation des protéines

Q

Q : Quantité

R

RMN : Résonance magnétique nucléaire

S

SAR : Relation Structure Activité
SDS : Dodecyl sulfate de sodium
SLE : Extraction liquide-liquide assistée par un
support solide
SNC : Système nerveux central
SPE : Phase solide d'extraction

T

T : Thymine
TA : Température ambiante
TAF : Ténofovir alafenamide
t-BuOH : *tert*-butanol
TCA : Acide trichloroacétique
TDF : Ténofovir disoproxyl
TFA : l'acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TMP : Thymidine monophosphate
TMS : Triméthylsilyle
TNF : Ténofovir
Ts : Tosyle

U

U : Uracile
UPLC : Chromatographie liquide ultra-
performance
UV : Ultra-violet

V

VHB : Virus de l'hépatite B

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

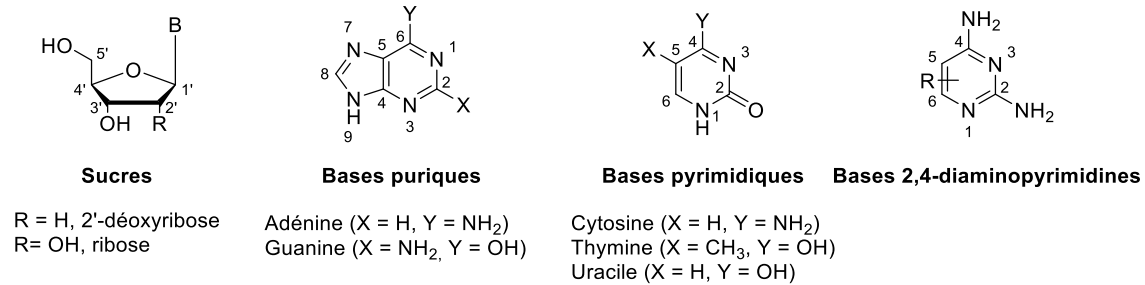
VIS : Virus de l'immunodéficience simienne

VSM : Virus du sarcome murin

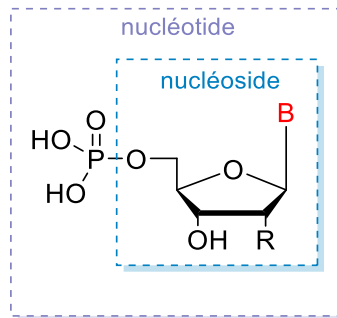
VZV : Virus varicelle-zona

Conventions et nomenclature

Les conventions et règles internationales utilisées pour la nomenclature et la numérotation des nucléosides sont résumées dans le schéma suivant :



Les nucléosides sont des molécules constituées d'une base nucléique (purine ou pyrimidine) liées à un sucre (ribose ou 2'-déoxyribose) par son carbone anomère. L'ajout d'un groupement phosphate en position 5' du sucre conduit à la formation d'un nucléotide.



Structures d'un nucléotide et d'un nucléoside

Les nucléobases sont liées à la partie osidique *via* une liaison *N*-glycosidique, impliquant l'azote N9 des bases puriques ou N1 des bases pyrimidiques.

Dans les structures des analogues nucléosidiques, les bases puriques (adénine, guanine) ou pyrimidiques (cytosine, thymine, uracile) peuvent être abrégées respectivement par A,G,C,T,U tandis que l'abréviation B ou base est utilisée pour une base hétérocyclique.

Liste des figures

Figure 1 : Genèse des ANPs développés (Les produits commerciaux sont encadrés).....	32
Figure 2 : Mécanisme d'action du cidofovir et de l'adéfovir.....	34
Figure 3 : Illustration du concept de prodrogue	35
Figure 4 : Structures des différentes prodrogues sur la fonction phosphate (adapté de Heidel <i>et al.</i> ¹⁶)	36
Figure 5 : Structures des prodrogues étudiées	36
Figure 6 : Prodrogues du ténofovir et de l'adéfovir	37
Figure 7 : Mécanismes de dégradation des prodrogues <i>bis</i> (POM) et <i>bis</i> (POC).....	38
Figure 8 : Modifications de la LCP	39
Figure 9 : Métabolisme des prodrogues de type HDP	40
Figure 10 : Structures du brincidofovir et deux de ses métabolites	41
Figure 11 : Structure du CMX-157.....	42
Figure 12 : Structure générale d'une ProTide	43
Figure 13 : Phosphor(n)amidates antiviraux approuvés par la FDA	43
Figure 14 : Structure du TAF et de son énantiomère.....	44
Figure 15 : Mécanisme proposé pour le métabolisme des aryloxyphosphor(n)amidates ⁴²	45
Figure 16 : Structures des premières prodrogues mixtes HDP/POC.....	45
Figure 17 : Mécanisme proposé pour les prodrogues mixtes HDP/POC	46
Figure 18 : Similarité de structure entre la nucléobase adénine et la DAPy.....	47
Figure 19 : Structures des premiers ANPs-DAPy.....	47
Figure 20 : Analogues DiaminoPyrimidines (DAPys).....	48
Figure 21 : ANPs de type oléfinique.....	50
Figure 22 : ANPs oléfiniques développés par notre équipe.....	50
Figure 23 : Comparaison structurale entre TMP et le composé (<i>E</i>) but-2'-ényle	51
Figure 24 : Structure du LAVR-289	51
Figure 25 : Les deux principales voies d'administration du médicament.....	54
Figure 26 : Classification biopharmaceutique.....	55
Figure 27 : Diagramme de répartition des antiviraux en fonction de la BCS (adapté de Chen <i>et al.</i>) ..	56
Figure 28 : Les stratégies communément utilisées pour augmenter la solubilité de principes actifs hydrophobes ⁷⁹	57
Figure 29 : Différents systèmes lipidiques	58
Figure 30 : Méthode analytique séparant les isomères Z et E du LAVR-289	59
Figure 31 : Etudes des différentes stabilités.....	59
Figure 32 : Paramètres physico-chimiques déterminés.....	60
Figure 33 : Ressemblances structurales entre le LAVR-289-monosphosphate et le ténofovir.....	60
Figure 34 : Synthèse d'un MIP par précipitation.....	61
Figure 35 : Synthèse d'un core-shell-imprimé moléculairement.....	61
Figure 36 : Spectre NOESY d'un mélange Z/E du LAVR-289.....	66
Figure 37 : Plaque CCM des deux isomères Z et E du LAVR-289.....	66
Figure 38 : Résultats <i>in vivo</i> du LAVR-289 sur des souris infectées par le VZV.....	67
Figure 39 : Inhibition de la réplication du virus de la vaccine par le composé LAVR-289.....	68
Figure 40 : Identification des verrous analytiques.....	68
Figure 41 : Structures des métabolites intra- et extracellulaires théoriques du LAVR-289.....	70
Figure 42 : Identification des paramètres physico-chimiques liés à la structure du composé d'intérêt	71

Figure 43 : Structure de la gemcitabine-squalène	71
Figure 44 : Spectre UV du LAVR-289 dans le méthanol	72
Figure 45 : Gamme d'étalonnage UV du LAVR-289 à 230 et 267 nm	73
Figure 46 : Séparation LC-UV des isomères <i>Z</i> et <i>E</i> du LAVR-289 sur la colonne Kromasil® (267 nm) ...	74
Figure 47 : Séparation LC-UV des isomère <i>Z</i> et <i>E</i> du LAVR-289 sur la colonne Bonus RP (267 nm)	75
Figure 48 : Chromatogramme LC-UV du LAVR <i>Z</i> - majoritaire (267 nm)	75
Figure 49 : Chromatogramme d'un mélange d'isomères <i>Z/E</i> (65/35) à 230 nm	76
Figure 50 : Spectres UV du LAVR-289 et des produits de dégradation.....	77
Figure 51 : Structures des produits de dégradation du LAVR-289.....	77
Figure 52 : Chromatogramme de surcharge du LAVR-289	79
Figure 53 : Etude de surcharge du LAVR-289 en phase normale par la société Kyrpharm.....	80
Figure 54 : Chromatogramme analytique de surcharge du <i>bis(isopropyle)</i> -LAVR (230 nm)	81
Figure 55 : Séparation semi-préparative des isomères du <i>bis(isopropyle)</i> -LAVR	82
Figure 56 : RMN ¹ H du <i>Z-bis(isopropyle)</i> -LAVR (zoom entre 4,30 et 5 ppm)	82
Figure 57 : Chromatogramme du <i>Z-bis(isopropyle)</i> -LAVR après purification (267 nm)	83
Figure 58 : Structures des diastéréoisomères du LAVR-289.....	83
Figure 59 : Séparation chirale du LAVR-289 à 267 nm.....	84
Figure 60 : Clivage du LAVR-289 par différentes enzymes	85
Figure 61 : Métabolites théoriques du LAVR-289 dans le plasma humain	86
Figure 62 : Structures chimiques des phospholipides les plus abondants dans le plasma.....	87
Figure 63 : Structures des étalons internes	89
Figure 64 : Séparation chromatographique et structures des standards internes (210 nm)	90
Figure 65 : Ratio des aires en fonction de la concentration du LAVR-289 dans l'eau et dans le plasma	92
Figure 66 : Cinétique de dégradation du LAVR-289 dans le plasma humain.....	94
Figure 67 : Séparation chromatographique et structures des dérivés alkyles du DAPy (210 nm)	96
Figure 68 : Structures des métabolites plasmatiques du LAVR-289	98
Figure 69 : LAVR-289 et ses analogues : (<i>Z</i>)- <i>bis</i> (POC)-LAVR (41) et (<i>E</i>)-LAVR-290 (42).....	100
Figure 70 : Métabolites théoriques de l'analogue <i>bis</i> (POC)-LAVR.....	101
Figure 71 : Séparation LC-UV du <i>bis</i> (POC)-LAVR et du diméthylphénol (210 nm).....	103
Figure 72 : Cinétique de dégradation du <i>bis</i> (POC)-LAVR	104
Figure 73 : Ressemblance structurale entre le LAVR-289 et l'analogue LAVR-290.....	105
Figure 74 : Structures théoriques des métabolites du LAVR-290.....	106
Figure 75 : LC-UV séparation du LAVR-290 et de son isomère	107
Figure 76 : Cinétique de dégradation du LAVR-290.....	109
Figure 77 : Courbe de stabilité du LAVR-289 en présence de NaOH et HCl à 0,1 M et 0,01 M	111
Figure 78 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 2,34 et 4,03.....	111
Figure 79 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 2,34 et 4,03.....	112
Figure 80 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 6,71 et 8,4.....	112
Figure 81 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 9,22 et 10,21.....	112
Figure 82 : Chromatogramme du LAVR-289 après 8 h dans NaOH (0,01 M).....	113
Figure 83 : Spectres UV du LAVR-289 et de ses produits de dégradation	113
Figure 84 : Structures des diènes 21 et 34	114
Figure 85 : Signaux RMN ¹ H des protons des diènes en α et en β du phosphore.....	114
Figure 86 : Structures potentielles du composé de formule brute C ₂₈ H ₅₁ N ₄ O ₅ P	117
Figure 87 : Exemples de prodrogues cycliques dans la littérature	118
Figure 88 : Sel de trifluoracétate de LAVR-289	119
Figure 89 : Log P = f(Log k)	123

Figure 90 : Chromatogrammes du LAVR-289 à t_0 dans les quatre solvants ($\lambda = 230$ nm)	125
Figure 91 : Chromatogramme du LAVR-289 à t_0 dans le DCM ($\lambda = 230$ nm).....	128
Figure 92 : Pourcentages des espèces du LAVR-289 en fonction du pH.....	129
Figure 93 : Valeurs théoriques des pKa des azotes du noyau de la DAPy.....	131
Figure 94 : Formes mésomères des dérivés 2,4-diaminopyrimidine	132
Figure 95 : Intermédiaire de synthèse 9 pour la détermination du pKa.....	132
Figure 96 : Spectre UV du composé 9 (pH acide & pH basique)	133
Figure 97 : Tracé de l'absorbance en fonction du pH et sa dérivée à 281 nm.....	134
Figure 98 : pH en fonction de $\log AI - AA - Am$ à 281 nm	135
Figure 99 : Comparaison du pKa trouvé expérimentalement avec le pKa de la 6-methoxy-2,4-diaminopyrimidine	135
Figure 100 : Le LAVR-289, un tensioactif ?.....	137
Figure 101 : Structure et spectre d'absorbance UV-visible du pyrène	138
Figure 102 : Spectres d'émission du pyrène en fonction de l'environnement hydrophobe ou hydrophile	138
Figure 103 : Courbes représentant le ratio des intensités I_{372}/I_{382} en fonction du Log de la concentration du LAVR-289	140
Figure 104 : Courbes représentant le ratio des intensités I_{372}/I_{382} en fonction du Log de la concentration du LAVR-290	140
Figure 105 : Structures du SDS et du Tween® 80.....	141
Figure 106 : Spectre UV de la solution de LAVR-289 avec le SDS	142
Figure 107 : Pourcentage d'infection des cellules en fonction de l'échantillon et de la concentration	143
Figure 108 : Nombre de cellules viables après 24 h de mise en contact avec les différentes solutions	144
Figure 109 : Représentation plausible de la micelle SDS-LAVR-289	144
Figure 110 : Structure chimique d'un acide carboxylique (exemple avec l'acide laurique)	145
Figure 111 : Impuretés systématiques dans les lots du LAVR-289	147
Figure 112 : Résumé des résultats analytiques.....	147
Figure 113 : Résumé des résultats des paramètres physico-chimiques	148
Figure 114 : Synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires : formation des différentes interactions entre le template et les différents monomères fonctionnels : (A-B) interactions covalentes réversibles, (C) interactions électrostatiques, (D) interactions hydrophobes ou de type Van der Waals, (E) interactions de type métal-ligand ; ces interactions sont formées respectivement avec les groupes fonctionnels adéquats de la molécule cible (a-e). (Adaptée de Whitcombe et al. ¹³⁸).....	153
Figure 115 : Différents templates reconnus pour la synthèse des MIPs (adapté de Cui <i>et al.</i> ¹⁴¹).....	154
Figure 116 : Avantages des MIPs comme DDS (adapté de Bărăian <i>et al.</i>).....	155
Figure 117 : Profils de relargage de la théophylline à partir des polymères imprimés chargés en mg de théophylline par gramme de MIP	157
Figure 118 : Structures des énantiomères du propranolol.....	157
Figure 119 : Représentation des approches covalente et non covalente dans la conception des MIPs (Adapté de Yan <i>et al.</i>).....	159
Figure 120 : Schéma de la complexation entre le galactose et l'acide 4-vinylphényl boronique.....	159
Figure 121 : Illustration de l'approche semi covalente lors de l'impression moléculaire du cholestérol en utilisant l'ester de carbonate de cholestéryle (4-vinyl)phényle comme monomère/template	162
Figure 122 : Changements potentiels des cavités induits par le processus d'extraction du template (adapté de Lorenzo <i>et al.</i> ¹⁷³)	163
Figure 123 : Exemples de « dummy-templates » utilisés dans le développement de MIPs.....	165

Figure 124 : Différents monomères fonctionnels utilisés dans la synthèse des MIPs-DDS.....	166
Figure 125 : Structures des réticulants les plus couramment utilisés dans la conception de MIPs ...	167
Figure 126 : Analyses microscopiques des polymères obtenus par différentes méthodes de polymérisation ¹⁹⁹	172
Figure 127 : Tailles des particules en fonction de la voie d'administration (adapté de Shekunov <i>et al.</i>).....	173
Figure 128 : Schéma descriptif des différents stades de la polymérisation par précipitation. (A) Initialement, seul le réticulant et l'initiateur sont dans le milieu de façon aléatoire. (B) la polymérisation radicalaire est initiée et des oligomères se forment et s'agglomèrent. (C) La réaction continue et les agglomérats continuent à croître par addition de monomères ou d'oligomères. A partir d'une certaine taille ces agglomérats (sphériques) vont précipiter (adapté de Talha Gokmen <i>et al.</i>).....	175
Figure 129 : Synthèse d'un core-shell imprimé (inspiré de Bhogal <i>et al.</i> ²¹³).....	178
Figure 130 : Etude de la recapture par Batch.....	180
Figure 131 : Représentation standard des isothermes d'absorption d'un MIP et du NIP correspondant.....	181
Figure 132 : Distribution des sites actifs proposés pour chaque modèle d'isotherme d'adsorption (adapté de Umpleby <i>et al.</i> ²²⁴).....	183
Figure 133 : Suivi HPLC-UV de la dégradation enzymatique du <i>bis</i> (POC)-ténofovir en fonction du temps d'incubation.....	187
Figure 134 : Chromatogrammes du LAVR-289 après 16 h d'incubation avec et sans la PLE.....	188
Figure 135 : Ressemblance structurale entre le ténofovir et le LAVR-289 phosphonate libre.....	190
Figure 136 : Structures du TDF et du TAF.....	191
Figure 137 : Sites d'interactions potentiels avec les monomères fonctionnels sur le ténofovir.....	192
Figure 138 : Appariements des bases nucléiques (les atomes donneurs et accepteurs de LH sont représentés en bleu et rouge, respectivement).....	193
Figure 139 : Pourcentage des formes du Tenofovir en fonction du pH.....	193
Figure 140 : Spectres UV des bases nucléiques (GMP = guanosine monophosphate, AMP = adénosine monophosphate, UMP = uridine monophosphate et CMP = cytosine monophosphate).....	194
Figure 141 : Estimation par le logiciel Marvin Sketch® des pKa et du Log D _{7,4} du ténofovir.....	195
Figure 142 : Chromatogramme du ténofovir à 260 nm.....	195
Figure 143 : Profils de linéarité (ligne pointillée rouge : ligne d'identité ; lignes noires : lignes de régression linéaire, lignes bleues : intervalles de tolérance).....	199
Figure 144 : Répartition des résidus en fonction de la concentration pour les 3 gammes.....	199
Figure 145 : Profil d'exactitude (en rouge : limites d'acceptations ; en bleu : intervalles de tolérance).....	200
Figure 146 : Evolution des paramètres de solubilité de Hansen en fonction du pourcentage d'eau dans un mélange acétonitrile/eau ¹⁹⁶	202
Figure 147 : Interactions de type échange d'ion entre le ténofovir et un monomère possédant une fonction amine.....	203
Figure 148 : Monomères commerciaux envisageables possédant une fonction amine : 2-(acryloyloxy)éthyl triméthylammonium chloride (94) ; 3-(acrylamidopropyl) triméthylammonium chloride (95) ; allylamine (96) ; 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate (97) ; 2-(méthacryloyloxy)éthyl triméthylammonium chloride (98) ; diallyldiméthylammonium chloride (99).....	203
Figure 149 : Structure du diallyle <i>isocyanurate</i>	204
Figure 150 : Corrélation HMBC du composé 108 dans le DMSO-d ₆	206
Figure 151 : Représentation de la complémentarité entre l'adénine du ténofovir et les monomères fonctionnels dérivés d'uracile en utilisant une complexation 1 : 1 (T : M).....	206

Figure 152 : Monomères et réticulants utilisés pour la synthèse des polymères dans 100% H ₂ O (encadré noirs), dans 100% ACN (encadré roses), dans ACN/H ₂ O (encadré rouges).....	208
Figure 153 : Analyse microscopique des polymères synthétisés dans différents solvants (A gauche : 100% H ₂ O, au milieu : 100% ACN et à droite : mélange binaire ACN/H ₂ O)	209
Figure 154 : Chromatogramme d'une solution d'uracile méthacrylate dans 100% d'eau à t = 1 min (210 nm)	209
Figure 155 : Corrélation Cosy dans le DMSO-d ₆ du composé 116	211
Figure 156 : Synthèse du composé <i>N1</i> -[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine 119	211
Figure 157 : Interaction de type électrostatique	212
Figure 158 : Rappels des pKa du ténofovir et des monomères 94 et 95 estimé par le logiciel Marvin Sketch®	212
Figure 159 : Valeur théorique du pH d'un mélange binaire eau/acétonitrile en fonction du pourcentage d'acétonitrile (adapté de Deleebeeck <i>et al.</i> ²⁵⁷)	213
Figure 160 : Constante diélectrique de la solution en fonction du pourcentage d'acétonitrile dans l'eau à 25°C (adapté de Gagliardi <i>et al.</i> ²⁶⁰)	214
Figure 161 : Complexe de pré-polymérisation avec les monomères allyles.....	214
Figure 162 : Structures des différents initiateurs	215
Figure 163 : Taux de conversion des monomères diallyl alkyl isocyanurates par polymérisation en bulk en utilisant 0,05 mol/L d'AIBN à 60 °C. ²⁶¹	216
Figure 164 : Structure du 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-trione	216
Figure 165 : Complexe de pré-polymérisation entre le ténofovir, le MAA et le DMAEM	218
Figure 166 : Estimation des pKa par le logiciel Marvin Sketch®	218
Figure 167 : Complexe de pré-polymérisation.....	219
Figure 168 : Analyse microscopique de la formulation 2 (à gauche : MIP-2 ; à droite : NIP-2)	220
Figure 169 : Isothermes d'adsorptions du MIP/NIP.....	222
Figure 170 : Relargage du ténofovir (exprimé en %) en fonction du temps dans le PBS à 25 °C	225
Figure 171 : Relargage du ténofovir (exprimé en %) en fonction du temps dans le PBS à 37 °C	226
Figure 172 : Structures des « dummy-templates » du ténofovir	228
Figure 173 : Interactions entre le « dummy-template » 31 et le monomère 117	231
Figure 174 : Récapitulatif des monomères synthétisés	232
Figure 175 : Interactions entre la forme phosphonate libre du LAVR-289 et les deux monomères fonctionnels.....	233
Figure 176 : Structure de la dopamine.....	234
Figure 177 : Tailles des particules de PDA en fonction de la quantité de NH ₄ OH ²⁸⁶	236
Figure 178 : Les deux voies de synthèses de la PDA ²⁸⁸	237
Figure 179 : Analyse MEB de trois lots de Polydopamine (Lot 1 et Lot 2, d = 180-200 nm et lot 3, d = 280 nm)	238
Figure 180 : Polymérisation des particules dérivées de PDA.....	238
Figure 181 : Propriété de la L-PDA en fonction du pH (En haut adsorption et en bas désorption)....	242
Figure 182 : Chromatogrammes du ténofovir avant et après contact avec la L-PDA (260 nm)	243
Figure 183 : Estimation des pKa par le logiciel Marvin Sketch® de la lévodopa 128 , du DMAEM 97 et du ténofovir 88	243
Figure 184 : Clichés de microscopie de la L-PDA.....	244
Figure 185 : Réactivité de la fonction amine de la PDA	245
Figure 186 : Dérivés pyrimidiques souhaités	245
Figure 187 : Produits secondaires observés dans la réaction de <i>N</i> -acylation.....	246
Figure 188 : Corrélations HMBC du composé 144	246
Figure 189 : Chromatogramme du composé 148 (260 nm).....	248

Figure 190 : Chromatogramme de la solution de ténofovir et du DAMEM (210 nm)	249
Figure 191 : Complexe de pré-polymérisation.....	250
Figure 192 : Analyses MET du MIP-1 (Gauche et milieu) et du NIP-1 (droite).....	252
Figure 193 : Analyses TEM du MIP-3 (Gauche) et du NIP-3 (droite).....	253
Figure 194 : Isothermes d'adsorption pour le MIP et le NIP de la formulation 3.....	255
Figure 195 : Profils de relargage du ténofovir de la formulation 3.....	257
Figure 196 : Profils de relargage du Ténofovir à 25 °C.....	258
Figure 197 : Profils de relargage du ténofovir à 37 °C	258
Figure 198 : Structures recherchées des nouveaux monomères.....	259
Figure 199 : Chromatogramme du bromouracile avant et après contact avec la PDA à 260 nm	262
Figure 200 : Objectifs de greffage sur la PDA.....	262
Figure 201 : Dérivation de surface des nanoparticules de PDA avec une molécule possédant une fonctionnalité uracile et méthacrylate.....	265
Figure 202 : Modulation de la surface de la PDA.....	266
Figure 203 : Analyse microscopique des nanoparticules de polyurée.....	267
Figure 204 : Récapitulatif des paramètres physico-chimiques déterminés du LAVR-289	269
Figure 205 : Structures des produits de dégradations du LAVR-289	270

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des activités et de la pharmacocinétique du ténofovir et de ses prodrogues	33
Tableau 2 : Activités des composés possédant une base DAPy en comparaison avec les ANPs de référence	48
Tableau 3 : Activités antivirales du PMEO-DAPy et de ses prodrogues.....	49
Tableau 4 : Quelques données antivirales du LAVR-289 en comparaison avec d'autres antiviraux	67
Tableau 5 : Absorbances du LAVR-289 à 230 et 267 nm à différentes concentrations.....	73
Tableau 6 : Résumé des conditions et coût de la séparation du LAVR-289 à l'échelle semi-préparative	79
Tableau 7 : Résultats des analyses HPLC-UV de la gamme du LAVR-289 dans le plasma et dans l'eau	91
Tableau 8 : Données des études plasmatiques.....	93
Tableau 9 : Gradient utilisé en UPLC-HRMS.....	97
Tableau 10 : Résultats du plasma <i>bis</i> (POC)-LAVR	104
Tableau 11 : Résultats de l'incubation du LAVR-290 avec du plasma humain	108
Tableau 12 : Impact du Log de D sur le développement d'un médicament (adapté de Comer <i>et al.</i> ¹¹¹)	120
Tableau 13 : Valeurs de Log P de plusieurs molécules synthétisées au laboratoire	123
Tableau 14 : Pourcentage relatif du LAVR-289 à t ₀ et à 3 semaines dans le DMSO à 25 °C.....	126
Tableau 15 : Pourcentage relatif du LAVR-289 après différents temps d'incubation dans le mélange binaire ACN/H₂O à 25 °C	126
Tableau 16 : Pourcentage relatif du LAVR-289 dans l'éthanol et le méthanol à 25 °C.....	127
Tableau 17 : Pourcentage relatif du LAVR-289 après 24 h dans le méthanol à différentes températures	127
Tableau 18 : Pourcentages relatifs du LAVR-289 dans le DCM et le mélange DCM/MeOH (9/1, v/v) à 25 °C	128
Tableau 19 : Relation entre le pKa et la force de l'acide ou de la base dans l'eau ¹⁰⁷	129
Tableau 20 : pKa de différents 2,4-diaminopyrimidines-6-substituées.....	131
Tableau 21 : Différence d'absorbance entre la forme neutre et la forme protonée en fonction de la longueur d'onde	133
Tableau 22 : Absorbance en fonction du pH à 281 nm.....	134
Tableau 23 : Absorbance du composé 9 à 281 nm et calcul du ratio <i>logAI – AA – Am</i>	135
Tableau 24 : Valeur de HLB de la forme neutre et protoné du LAVR-289	136
Tableau 25 : Résultats des mesures de fluorescence pour le LAVR-289	139
Tableau 26 : Résultats des mesures de fluorescence pour le LAVR-290 (42)	140
Tableau 27 : Evolution de la température de Krafft avec la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras et de la nature du contre-ion.....	145
Tableau 28 : Log P et Log D _{7,4} théorique du LAVR-289 et des analogues à 6 et 10 carbones.....	148
Tableau 29 : Pourcentage relargué de 5-fluorouracile au bout de 40 h en fonction du pH et du réticulant	168
Tableau 30 : Exemple de la variation des tailles de pores en fonction du solvant porogène dans la synthèse d'un MIP spécifique de la L-phénylalanine anilide.	169
Tableau 31 : Constantes diélectriques et paramètres de solubilité de Hansen de différents solvants utilisés pour la synthèse de MIPs.	170
Tableau 32 : Comparaison des différentes techniques de polymérisation	174

Tableau 33 : Comparaison des MIP-core shell avec les polymères synthétisés par polymérisation par bulk.....	178
Tableau 34 : Modèles utilisé pour caractériser les MIPs ²²³	184
Tableau 35 : Résultats des tests de Student sur le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine....	198
Tableau 36 : Résultats des tests de Cochran et de Fisher.....	198
Tableau 37 : Estimation de la justesse, de la fidélité intermédiaire et du recouvrement de la méthode d'analyse.....	200
Tableau 38 : Impact des contre-ions de différents agents de paire d'ions sur la solubilité du ténofovir dans l'acétonitrile.....	203
Tableau 39 : Récapitulatif des formulations des polymères et résultats morphologiques en fonction du porogène utilisé.....	208
Tableau 40 : Essais de polymérisation des allyles en faisant varier le réticulant	215
Tableau 41 : Formulation des MIP-1/NIP-1 et MIP-2/NIP-2	219
Tableau 42 : Résultats de l'étude d'adsorption du Ténofovir avec les matériaux MIP-1 et NIP-1	221
Tableau 43 : Résultats de l'étude d'adsorption du Ténofovir avec les matériaux MIP-2 et NIP-2	222
Tableau 44 : Valeurs des constantes d'affinités (K_a ; $L.mol^{-1}$), nombre de site actifs (N ; $mol.g^{-1}$), coefficient de détermination (R^2), valeur du test statistique de Fisher (F_{value}), valeur du Chi carré (χ^2)obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP de la formulation 2.....	223
Tableau 45 : Quantités initiales de ténofovir dans les matériaux pour l'étude cinétique à 25 °C et 37 °C	224
Tableau 46 : paramètres obtenus à la suite de la régression non linéaire sur le MIP et NIP	227
Tableau 47 : Conditions d'analyses des analogues du ténofovir	229
Tableau 48 : Formulation MIP-3/NIP-3	230
Tableau 49 : Résultats de l'étude d'absorption du MIP-3/NIP-3	230
Tableau 50 : Formulation du MIP-4/NIP-4.....	231
Tableau 51 : Résultats de recapture du ténofovir par le MIP-4/NIP-4	232
Tableau 52 : Synthèses des différents core-shell.....	251
Tableau 53 : Résultats de recapture de la formulation 1	254
Tableau 54 : Résultats de recapture de la formulation 3	255
Tableau 55 : Valeurs des constantes d'affinités (K_a ; $L.mol^{-1}$), nombre de site actifs (N ; $g.g^{-1}$), coefficient de détermination (R^2), valeur du test statistique de Fisher (F_{value}), valeur du Chi carré (χ^2) obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP de la formulation 3.....	256
Tableau 56 : preparation of different pH solutions	311

Liste des schémas

Schéma 1 : Synthèse du synthon HDP/POC allyle phosphonate	64
Schéma 2 : Synthèse du précurseur énéoxy-pyrimidine-2-4-diamine.....	65
Schéma 3 : Métathèse croisée conduisant au LAVR-289.....	65
Schéma 4 : Synthèse du <i>bis(isopropyle)</i> -LAVR et stratégie pour obtenir le composé 17	81
Schéma 5 : Synthèse des standards internes pour l'analyse du LAVR-289 en UPLC-HRMS	95
Schéma 6 : Synthèse du synthon <i>bis(POC)</i> allyle phosphonate.....	102
Schéma 7 : Synthèse de l'analogue <i>bis(POC)</i> -LAVR.....	102
Schéma 8 : Préparation du dérivé 67	106
Schéma 9 : Synthèse du LAVR-290.....	107
Schéma 10 : Mécanisme de formation du diène 34 en milieu basique.....	115
Schéma 11 : Structures des diènes rapportés dans la littérature.....	116
Schéma 12 : Proposition du mécanisme pour la formation du composé 36	117
Schéma 13 : Proposition de mécanisme pour la formation des composés 20 et 21	136
Schéma 14 : Enzymes pouvant cliver les groupements biolabiles du LAVR-289 et conduire à la formation du composé 17	186
Schéma 15 : Dégradation enzymatique du <i>bis(POC)</i> -ténofovir ⁸	187
Schéma 16 : Dégradation enzymatique du LAVR-289	188
Schéma 17 : Synthèse des analogues (<i>bis</i>)méthyle et (<i>bis</i>)éthyle du LAVR-289 et hydrolyse du phosphonate	189
Schéma 18 : Synthèse des dérivés uraciles <i>N1</i> -acylés	205
Schéma 19 : <i>N3</i> -Benzoylation de la thymine	210
Schéma 20 : Synthèse des analogue <i>bis</i> (Me) et <i>bis</i> (Et) du Ténofovir	229
Schéma 21 : Schéma de synthèse de la polydopamine	236
Schéma 22 : Synthèse de la <i>N</i> -méthacrylamide dopamine 131	239
Schéma 23 : Synthèse des nanoparticules de poly(<i>N</i> -méthacrylamide)dopamine	239
Schéma 24 : Oxydations de dérivés <i>N</i> -dopamine ²⁹⁰	240
Schéma 25 : Synthèse d'un copolymère de P(DA-L)DA ²⁹³	241
Schéma 26 : Synthèse du copolymère polydopamine-poly(<i>N</i> -méthacrylamide)dopamine	241
Schéma 27 : Synthèse de la L-PDA	242
Schéma 28 : Synthèse des dérivés <i>N1</i> -acide-acétique pyrimidique	246
Schéma 29 : Synthèse des dérivés <i>N1</i> -acide-acétique pyrimidique en une étape	247
Schéma 30 : Dérivation de la polydopamine	247
Schéma 31 : Synthèse des nanoparticules core-shell imprimées	251
Schéma 32 : Modification du 5-aminouracile	260
Schéma 33 : Modification du 5-bromouracile	261
Schéma 34 : Dérivation attendue de la polydopamine par le bromouracile.....	261
Schéma 35 : Première voie de synthèse du composé <i>N1</i> -[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile	263
Schéma 36 : Protection sélective du bromouracile en <i>N3</i>	263
Schéma 37 : Deuxième voie de synthèse du composé <i>N1</i> -[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile	264
Schéma 38 : Synthèse de la polyurée à partir du IPDI	266

Introduction Générale

Au cours des siècles, l'humanité a été confrontée à de nombreuses pandémies virales très meurtrières (rage, fièvre jaune, variole, grippe espagnole, grippe asiatique, sida...). L'exemple le plus récent est la pandémie de COVID-19 causée par le virus SARS-CoV-2. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), au 9 août 2023, ce virus aurait contaminé 760 millions d'individus et provoqué la mort de 6,9 millions d'entre eux. De plus, la (ré)émergence de nouveau virus à ARN, tels que le virus Ebola, de la Dengue, du virus de la grippe A (H1N1) ..., la résistance aux antiviraux actuels et la zoonose (en lien avec le réchauffement climatique) font des infections virales un problème majeur de santé publique. Ainsi, la recherche en infectiologie, dont le développement de nouveaux antiviraux est partie prenante, est essentielle pour limiter la propagation des virus et soigner les personnes les plus vulnérables, comme les enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées.

Le développement préclinique d'un nouveau médicament-candidat implique plusieurs phases dont la mesure de son activité thérapeutique et de sa toxicité, *in vitro* et *in vivo*. Il inclut également le développement d'une formulation, nécessaire à son administration, ainsi que la détermination de certains paramètres physico-chimiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, consacré à l'étude pré-clinique d'un nouvel antiviral à large spectre, le LAVR-289, appartenant à la famille des acyclonucléosides phosphonates (ANPs) prodrogues.

Le chapitre I introduira cette famille d'antiviraux devenue cruciale dans la lutte contre des infections virales de souches variées. Cette présentation s'appuiera sur les molécules phares ayant obtenues une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Après avoir discuté des diverses prodrogues de ces nucléosides, nous présenterons une nouvelle famille d'ANPs oléfiniques issue de notre laboratoire dont le LAVR-289 fait partie. La deuxième partie de ce chapitre commencera par un rappel sur le processus de développement d'un médicament suivi des différentes données attendues dans le cadre d'une étude pré-clinique. Quelques formulations et systèmes de délivrance associés aux ANPs seront présentés avant de finir ce chapitre d'introduction par les **objectifs de cette thèse**.

Le **second chapitre** de ce manuscrit sera consacré au LAVR-289, avec un rappel de sa synthèse et de ses activités biologiques. La mise au point d'une méthode analytique, la détermination de différents paramètres physico-chimiques de ce composé (pKa, Log P, CAC...), ainsi que ses stabilités (chimiques et plasmatique) seront présentées et leur importance dans la conception d'une formulation sera discutée.

Au cours des dernières années, grâce au développement de la galénique, un progrès significatif a été accompli dans le domaine des systèmes de délivrance de médicaments. Parmi ces différents systèmes, **le chapitre III**, présentera la technologie des polymères à empreintes moléculaires en tant

que systèmes « transporteurs » et de libération prolongée de médicaments. La synthèse et la caractérisation de ses polymères ainsi que les mécanismes de libération associés seront également discutés.

Après avoir introduit les notions globales de ces polymères en tant que systèmes de délivrance de médicament ou « drug delivery systems », nous décrirons, dans un **dernier chapitre** la synthèse de systèmes de libération imprimés moléculairement. Ces études exploratoires ont été menées non pas sur le LAVR-289 ou son nucléotide parent mais sur un autre ANP, le ténofovir.

Ce chapitre sera divisé **en deux parties**, présentant chacune une approche différente dans la conception d'un polymère à empreintes moléculaires.

- ✓ La partie A sera consacrée au développement d'un polymère à empreintes moléculaires (MIP) par polymérisation par précipitation selon une approche non covalente. Cette approche utilise des monomères synthétisés au laboratoire permettant de reproduire les interactions naturelles de types « Watson-Crick » au niveau des nucléobases. Le choix des monomères et leur synthèse seront présentés et discutés.
- ✓ La partie B présentera un système de délivrance basé sur une approche innovante à base de nanoparticules de type core-shell (particules superficiellement imprimées) constituées d'un noyau polydopamine portant une couche polymérique imprimée moléculairement. La synthèse de ces nanoparticules complexes, la dérivation de la surface ainsi que la création d'un core-shell seront discutées.

Pour chacun de ces deux systèmes, les études d'adsorption et de cinétique de libération seront présentées et corrélées aux modèles mathématiques issus de la littérature.

La **conclusion générale** regroupera les résultats marquants de cette thèse et inclura quelques perspectives concernant les systèmes de libération prolongée imprimés moléculairement obtenus ainsi que sur la poursuite du développement pré-clinique du LAVR-289.

Chapitre 1 : Développement d'un acyclonucléoside phosphonate : Approches et Stratégies Thérapeutiques

1. Les acyclonucléosides phosphonate (ANPs)

1.1. Découvertes des acyclonucléosides phosphonates

Les acyclonucléosides phosphonates représentent une grande classe de médicaments (nucléotides dits de deuxième génération) qui a été développée, dans les années 1980, par le groupe du chimiste A. Holý (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry – Prague, République Tchèque), et celui du virologue E. De Clercq (Rega Institute for Medical Research – Leuven, Belgique). Les ANPs sont constitués d'une nucléobase liée à une chaîne comportant un éther oxyde et un groupement phosphonate (liaison P-C-O) qui se substitue au groupement phosphate (liaison P-O-C) des mononucléotides. Ainsi les ANPs sont plus stables aux hydrolyses chimiques et enzymatiques (*phosphodiesterases* et *phosphatases*) que leur analogues monophosphates. L'absence de la liaison N-glycosidique dans leur structure augmente encore leur résistance à la dégradation chimique et biologique. Le motif phosphonate, quant à lui, permet aux ANPs de contourner l'étape souvent limitante de la monophosphorylation (*note : le nucléoside est une prodrogue qui doit être convertie en son analogue 5'-triphosphate par trois phosphorylations enzymatiques successives, pour atteindre sa forme active*). Ainsi, un ANP n'aura besoin que de deux, au lieu de trois, étapes de phosphorylations pour être converti en diphosphate-phosphonate, le métabolite actif, analogue d'un nucléoside triphosphate.

En rapportant pour la première fois, en 1986, le 9-[3-hydroxy-2-(phosphonométhoxy)propyl]adénine ou **(S)-HPMPA** comme antiviral à large spectre contre les virus à ADN dont l'herpès (HSV), la variole (Poxvirus) ainsi que les rétrovirus (IC₅₀ comprise entre 0,004 et 3 µg/mL), A. Holy et E. De Clercq ont été à l'origine du développement de cette classe d'antiviraux.¹

Le **(S)-HPMPA**, considéré comme le prototype des ANPs, a été synthétisé, à partir de l'analogie nucléosidique acyclique nommé (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adénine ou (S)-DHPA, par l'ajout d'un groupement phosphonométhyle. Par la pharmacomodulation de ce dernier, 3 principes actifs ont été développés (Figure 1) :

- ✓ **Le cidofovir ou (S)-HPMPC**, (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonométhoxy)propyl]cytosine, est un analogue du (S)-HPMPA pour lequel la nucléobase adénine a été remplacée par la cytosine. Ce nouvel ANP, moins toxique que le (S)-HPMPA, a montré des activités similaires à ce dernier sur un large panel de virus à ADN dont les HSV, le VZV et le CMV.² En effet sur ce dernier virus, le (S)-HPMPC présente une IC₅₀ de 0,08 µg/mL et une CC₅₀ de 50 µg/mL tandis que pour le (S)-

¹ De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. A Novel Selective Broad-Spectrum Anti-DNA Virus Agent. *Nature*. **1986**, *323*, 464–467.

² De Clercq, E. D.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; *et al.* Antiviral Activity of Phosphonylmethoxyalkyl Derivatives of Purine and Pyrimidines. *Antiviral Res.* **1987**, *8*, 261–272.

HPMPA les valeurs sont de 0,15 µg/mL et de 20 µg/mL. Ce composé a été le premier ANP approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en juin 1996 dans le traitement des cytomégalovirus rétinien, sous le nom commercial Vistide® ; il a été retiré du marché en 2014 mais conserve une AAC (autorisation d'accès occasionnel ou dérogoaire).

- ✓ **L'adéfovir ou PMEA**, 9-[2-(phosphonométhoxy)éthyl]adénine, conserve la structure du (S)-HPMPA, dont seul le groupement hydroxyméthyle a été retiré. Contrairement au (S)-HPMPC ou au (S)-HPMPA, le PMEA est principalement actif contre les rétrovirus dont le VIH. En effet, ce composé a montré des résultats *in vitro*³ (IC₅₀ 2 µM) sur le VIH et *in vivo*⁴ sur le virus murin du sarcome (une dose de 20 ou 50 mg/kg par jour offre 90-100% de protection). Afin d'augmenter sa biodisponibilité orale (< 12% chez l'Homme⁵), cette molécule a été formulée sous forme de prodrogue (voir paragraphe 2.1), l'adéfovir dipivoxil ou bis(POM)-PMEA, pour l'administration par voie orale permettant d'augmenter sa biodisponibilité à 35% chez l'Homme⁶. Initialement prévue, pour le traitement du VIH, celle-ci a été considérée trop néphrotoxique pour un traitement à long terme (> 6 mois) à la dose nécessaire (62,5 ou 125 mg/jour) pour inhiber la réplication de ce virus. Par la suite, cette prodrogue de l'adéfovir s'est montrée efficace sur le virus de l'hépatite B à une dose plus faible que pour le VIH (10 mg/jour) permettant ainsi de diminuer également sa néphrotoxicité. De plus, les patients initialement traités avec la β-L-2',3'-didéoxy-3'-thiacytidine ou lamivudine (considérée longtemps comme le médicament de référence pour le traitement de l'hépatite B) développaient une résistance au traitement qui s'est retrouvée ralentie avec l'utilisation de l'adéfovir dipivoxil.

³ Pauwels, R.; Balzarini, J.; Schols, D.; Baba, M.; Desmyter, J.; Rosenberg, I.; *et al.* Phosphonylmethoxyethyl Purine Derivatives, a New Class of Anti-Human Immunodeficiency Virus Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1025–1030.

⁴ Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; *et al.* Marked in Vivo Antiretrovirus Activity of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine, a Selective Anti-Human Immunodeficiency Virus Agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 332–336.

⁵ Cundy, K. C.; Barditch-Crovo, P.; Walker, R. E.; Collier, A. C.; Ebeling, D.; Toole, J.; *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Adefovir in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2401–2405.

⁶ Barditch-Crovo, P.; Toole, J.; Hendrix, C. W.; Cundy, K. C.; Ebeling, D.; Jaffe, H. S.; *et al.* Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Adefovir Dipivoxil (9-[2-(Bis-pivaloyloxymethyl)-phosphonylmethoxyethyl]Adenine) in HIV-Infected Patients. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176*, 406–413.

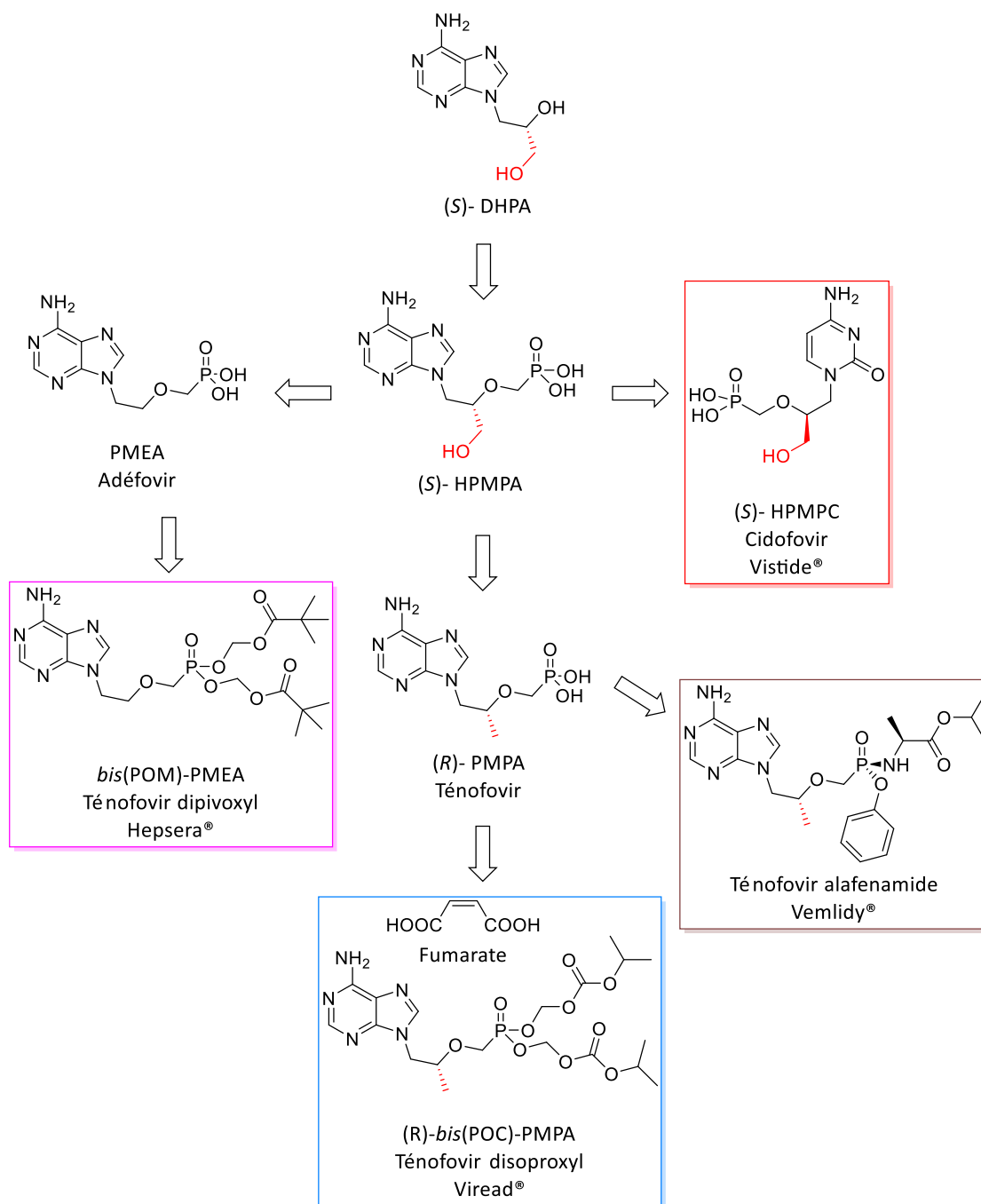


Figure 1 : Genèse des ANPs développés (Les produits commerciaux sont encadrés)

- ✓ **Le ténofovir ou (R)-PMPA**, (R)-[9-(2-phosphonométhoxy)propyl]adénine, est un dérivé du (S)-HPMPA, dont le groupement hydroxyméthyle a été remplacé par un groupement méthyle tout en conservant la configuration absolue du carbone asymétrique, particulièrement importante pour conserver l'activité⁷ sur le VIH. En effet, seul l'isomère R du ténofovir possède une activité sur le VIH ($IC_{50}(\text{VIH-1}) = 5,9 \mu\text{M}$ et $IC_{50}(\text{VIH-2}) = 4,9 \mu\text{M}$) mais est dépourvu de toute activité

⁷ Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; *et al.* Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus Effects of the (S) and (R) Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates: Potent and Selective in Vitro and in Vivo Antiretrovirus Activities of (R)-9-(2-Phosphonomethoxypropyl)-2,6-Diaminopurine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 332–338.

contre les virus à herpès ($IC_{50} > 240 \mu M$). Cette nouvelle molécule est spécifique aux rétrovirus (VIH) et aux hepadnavirus (VHB). Souffrant, comme l'adéfovir, d'une faible biodisponibilité orale (~2%⁸), le ténofovir a été développé sous forme de prodrogue, le ténofovir disoproxyl ou *bis*(POC)-PMPA (TDF) permettant d'augmenter sa biodisponibilité orale à 20%.⁸ Ce composé a été formulé sous la forme d'un sel de fumarate et a été approuvé pour le traitement du VIH en 2001 puis pour le traitement des infections du VHB en 2008 sous le nom commercial Viread®. Cette prodrogue a ensuite été commercialisée en thérapie combinée, contre les infections au VIH, sous plusieurs noms commerciaux tels que Complera® approuvé en 2011 (association avec l'emtricitabine, l'efavirenz et la rilpivirine hydrochloride) ou plus récemment Delstrigo® approuvé en 2018 (association avec la doravirine et la lamivudine).

Une seconde prodrogue du PMPA, le ténofovir alafénamide (TAF)⁹, a été développée sous forme de phosphoramidate et approuvée par la FDA en 2015 pour le traitement du VIH puis en 2016 contre les infections au HBV. En comparaison au PMPA et au TDF, le TAF a montré des meilleures activité et sélectivité sur le VIH ($IC_{50} = 0,005 \mu M$), une meilleure stabilité plasmatique ($t_{1/2}$ de 90 min) et une diminution de la néphrotoxicité (Tableau 1)¹⁰.

Tableau 1 : Comparaison des activités et de la pharmacocinétique du ténofovir et de ses prodrogues

Composés	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	Sélectivité	$t_{1/2}$ plasmatique	Biodisponibilité orale
Ténofovir	5	6	1,25	Stable	2%
TDF	0,05	50	1	0,41 min	20%
TAF	0,005	40	8	90 min	> 70%

1.2. Mécanisme d'action et limitations des ANPs

Pour devenir actifs, les analogues de nucléosides doivent être convertis intracellulairement par une série de phosphorylations enzymatiques *via* diverses nucléos(t)ides kinases en dérivés triphosphates. Cependant, pour de nombreux nucléosides, la première phosphorylation est limitante. L'administration d'un analogue nucléoside monophosphate a pour objectif de contourner cette première étape de monophosphorylation. Cependant, la liaison P-O-C est instable et peut être hydrolysée par des phosphatases ou des phosphodiesterases ce qui diminue l'activité du médicament.

⁸ Naesens, L.; Bischofberger, N.; Augustijns, P.; Annaert, P.; Van Den Mooter, G.; Arimilli, M. N.; *et al.* Antiretroviral Efficacy and Pharmacokinetics of Oral Bis(Isopropoxyloxycarbonyloxymethyl)9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)Adenine in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1568–1573.

⁹ Ray, A. S.; Fordyce, M. W.; Hitchcock, M. J. M. Tenofovir Alafenamide: A Novel Prodrug of Tenofovir for the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res.* **2016**, *125*, 63–70.

¹⁰ Lee, W. A.; He, G.-X.; Eisenberg, E.; Cihlar, T.; Swaminathan, S.; Mulato, A.; *et al.* Selective Intracellular Activation of a Novel Prodrug of the Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Inhibitor Tenofovir Leads to Preferential Distribution and Accumulation in Lymphatic Tissue. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1898–1906.

Les chimistes médicaux ont donc décidé de synthétiser des ANPs, mimes de nucléotides acycliques monophosphates, possédant les avantages suivants :

- La liaison P-C-O, au contraire de la liaison P-O-C, ne peut pas être hydrolysée par les enzymes et confère à la molécule une plus grande stabilité.
- Contournement de l'étape limitante de monophosphorylation.
- Obtention de la molécule active sous la forme di-phosphate-phosphonate, au sein de la cellule, en seulement 2 étapes successives de phosphorylation.

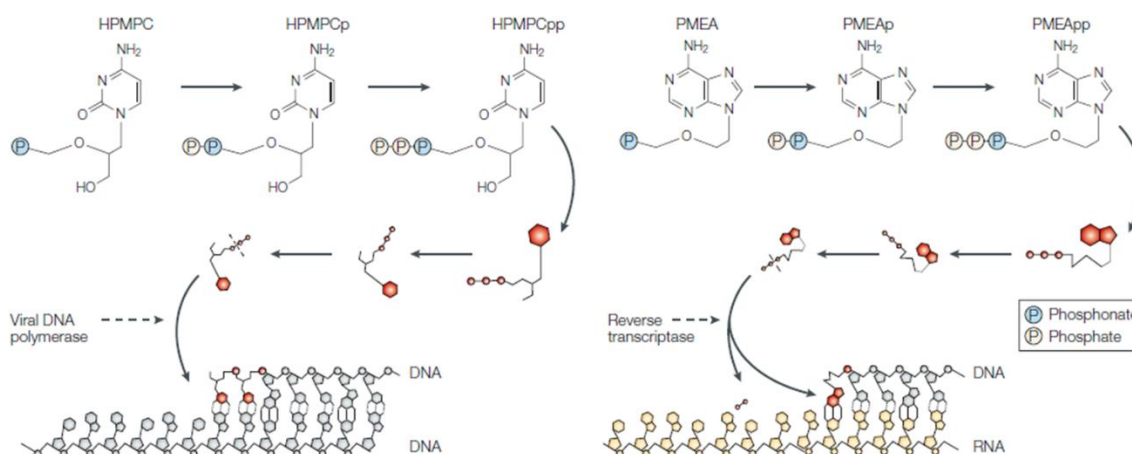


Figure 2 : Mécanisme d'action du cidofovir et de l'adéfovir¹¹

La Figure 2, illustre le mécanisme d'action du cidofovir et de l'adéfovir, qui est similaire à celui du ténofovir. Après avoir été convertis en leur forme diphosphate-phosphonate, ces analogues peuvent s'incorporer dans leur cible biologique. Le cidofovir cible la polymérase ADN virale, et nécessite l'incorporation de deux unités pour inhiber son action. En revanche, l'adéfovir, qui cible la transcriptase inverse du VIH, n'a besoin d'incorporer qu'une seule unité pour inhiber sa cible biologique.

Cependant, les ANPs présentent plusieurs inconvénients : ils souffrent d'une faible biodisponibilité, d'une faible prise en charge par les cellules (faible perméabilité), et s'accumulent dans le foie engendrant une toxicité hépatique.^{12,13,14} A titre d'exemple, le cidofovir et l'adéfovir présentent une biodisponibilité orale chez l'homme inférieure à 5% et 12%, respectivement.¹³ Ces faibles valeurs s'expliquent par le fait que les nucléosides de type phosphonates traversent peu ou pas la membrane cellulaire en raison des charges négatives portées par les fonctions acides phosphoniques au pH

¹¹ De Clercq, E.; Holý, A. Acyclic Nucleoside Phosphonates: A Key Class of Antiviral Drugs. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **2005**, *4*, 928–940.

¹² Mandíková, J.; Volková, M.; Pávek, P.; Česnek, M.; Janeba, Z.; Kubíček, V.; *et al.* Interactions with Selected Drug Renal Transporters and Transporter-Mediated Cytotoxicity in Antiviral Agents from the Group of Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Toxicology*. **2013**, *311*, 135–146.

¹³ Cundy, K. C. Clinical Pharmacokinetics of the Antiviral Nucleotide Analogues Cidofovir and Adéfovir. *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, *36*, 127–143.

¹⁴ Izzedine, H.; Launay-Vacher, V.; Deray, G. Antiviral Drug-Induced Nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* **2005**, *45*, 804–817.

physiologique. Pour améliorer cette perméabilité, une approche consiste à cacher la fonction phosphonate en greffant sur les fonctions OH phosphoniques des groupements biolabiles. Cette technique est plus communément nommée « approche pronucléotide ».

2. Approche pronucléotide ou prodrogue

2.1. Qu'est qu'une prodrogue ?

Une prodrogue¹⁵ est une molécule qui n'a pas ou peu d'activité pharmacologique et qui est convertie en forme actives *in vivo* par activation enzymatique ou via des réactions chimiques, voire la combinaison des deux (Figure 3). Les prodrogues peuvent être aussi bien des petites molécules que des macromolécules, comme les polymères par exemple. Elles permettent de pallier les problèmes de formulation, de pharmacocinétique ou de bio-distribution, en modifiant les propriétés physico-chimiques du médicament tout en diminuant la toxicité. En effet, les nouvelles molécules découvertes sont souvent associées à des propriétés physicochimiques défavorables qui vont limiter leur distribution jusqu'à la cible biologique.

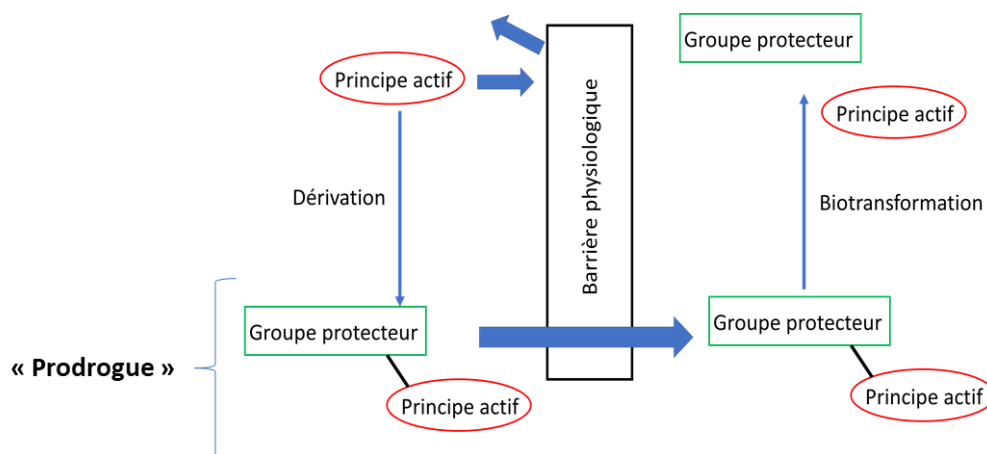


Figure 3 : Illustration du concept de prodrogue

Concernant les nucléosides monophosphates ou les acyclonucléosides phosphonates, le développement de prodrogues permet de masquer les charges négatives portées par les oxygènes du phosphore une fois déprotonés. Il existe un grand nombre de groupements protecteurs permettant de créer des prodrogues mono- ou di- substituées, pouvant être asymétriques ou non¹⁶ (Figure 4). Ces groupements diffèrent par leurs structures, leurs mécanismes de dégradation intracellulaires et donc leurs métabolites.

¹⁵ Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The Expanding Role of Prodrugs in Contemporary Drug Design and Development. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **2018**, *17*, 559–587.

¹⁶ Heidel, K. M.; Dowd, C. S. Phosphonate Prodrugs: An Overview and Recent Advances. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1625–1643.

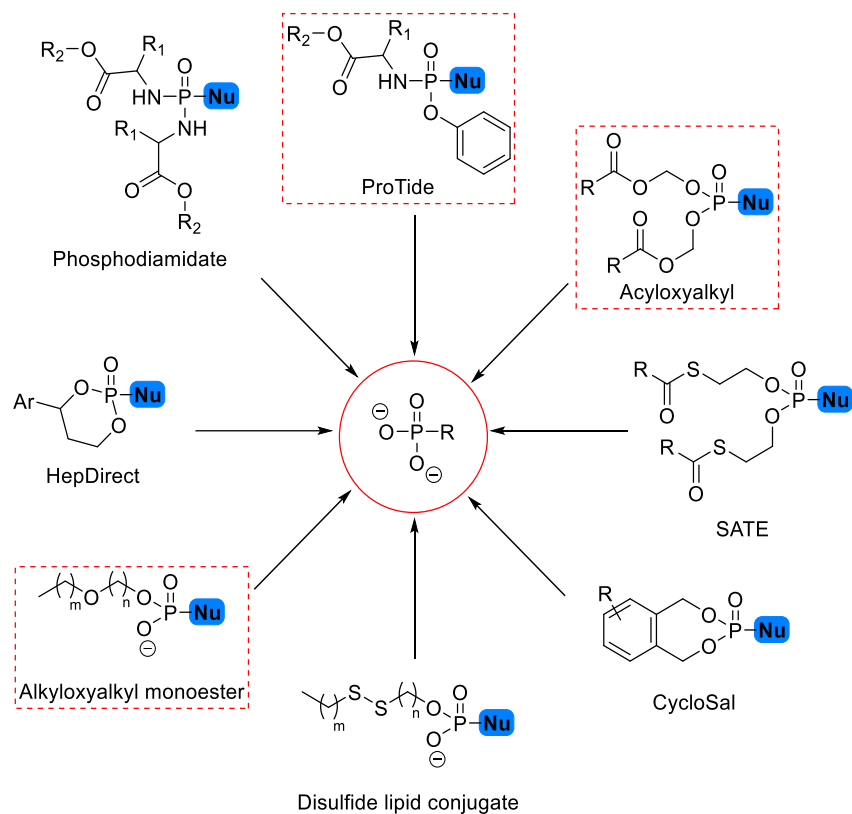


Figure 4 : Structures des différentes prodrogues sur la fonction phosphate (adapté de Heidel *et al.*¹⁶)

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés particulièrement aux prodrogues de type carbonyloxyméthyle (*bis*(POC)/*bis*(POM)), aux chaînes lipophiles de type 3-(hétéradécyloxy)-1-propanol (HDP), et à la technologie ProTide (Figure 5). En effet, l'application de ces groupements biolabiles aux ANPs a conduit à la mise sur le marché de 4 médicaments antiviraux.

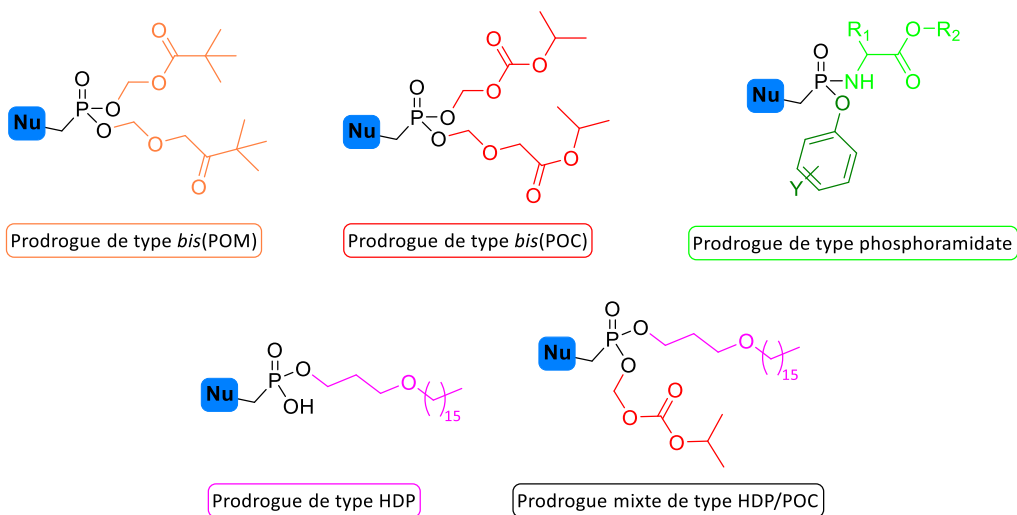


Figure 5 : Structures des prodrogues étudiées

2.2. Les prodrogues de type carbonyloxyméthyle {*Bis*(POM) et *Bis*(POC)}

Le développement des ANPs sous forme de prodrogues acyloxy ester et alkoxy-carbonyl ester a été un succès. Parmi ces prodrogues, deux médicaments ont été commercialisés pour des thérapies antivirales (Figure 6). L'adéfovir a été développé dans le cadre du traitement de l'hépatite B et commercialisé en 2002, sous la forme *bis*(pivaloyloxyméthyle) (*bis*(POM)PMEA ou adéfovir dipivoxy, Hepsera®). Le ténofovir a été commercialisé en 2001 pour le traitement du VIH, sous la forme prodrogue *bis*(isopropoxyéthyle) carbonate (*bis*(POC)PMPA ou ténofovir disoproxyl, Viread®), et approuvé également en 2008 pour le traitement des infections chroniques de l'hépatite B.

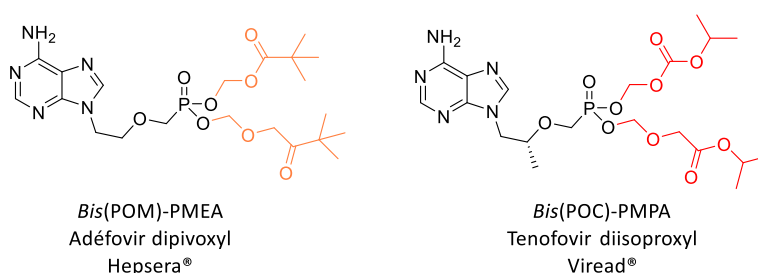


Figure 6 : Prodrogues du ténofovir et de l'adéfovir

La prodrogue de l'adéfovir, sélectionnée parmi une large série de prodrogues de type acyloxyméthyle ester,¹⁷ a tout d'abord été considérée comme un possible candidat dans le traitement du VIH en raison de sa capacité à réduire la charge virale dans le plasma. Cependant, une certaine toxicité a été observée, due aux produits de dégradation comme le formaldéhyde qui est néphrotoxique et l'acide pivalique qui est responsables de l'homéostasie de la carnitine.¹⁸ L'altération de cette dernière va perturber les fonctions musculaire et neuronale mais aussi le métabolisme des lipides et des acides gras.

De plus, bien que la biodisponibilité de la prodrogue, administrée chez le singe par voie orale, est accrue d'un facteur 5 par rapport à l'adéfovir, le groupement biolabile *bis*(POM) est très instable chimiquement. Il est susceptible d'être hydrolysé dans le sang ce qui limite son potentiel thérapeutique par administration intraveineuse dans le cadre du traitement du VIH.¹⁹ C'est pourquoi, ce médicament n'est proposé que par voie orale dans le traitement de l'hépatite B.

Les prodrogues de type *bis*(POC), comparativement au *bis*(POM), confèrent l'avantage de ne pas générer d'acide pivalique, pendant leur bioconversion. La Figure 7 illustre le mécanisme de

¹⁷ Starrett, J. E. Jr.; Tortolani, D. R.; Russell, J.; Hitchcock, M. J. M.; Whiterock, V.; Martin, J. C.; *et al.* Synthesis, Oral Bioavailability Determination, and in Vitro Evaluation of Prodrugs of the Antiviral Agent 9-[2-(Phosphonomethoxy)Ethyl]Adenine (PMEA). *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1857–1864.

¹⁸ Brass, E. P. Pivalate-Generating Prodrugs and Carnitine Homeostasis in Man. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 589–598.

¹⁹ Srinivas, R. V.; Robbins, B. L.; Connelly, M. C.; Gong, Y. F.; Bischofberger, N.; Fridland, A. Metabolism and in Vitro Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyloxymethyl) Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2247–2250.

dégradation des prodrogues de types *bis*(POM) et *bis*(POC). Les prodrogues subissent dans un premier temps l'action d'une carboxylestérase qui va libérer de l'acide pivalique, pour les prodrogues *bis*(POM) et du propanol suivi d'une décarboxylation pour les prodrogues *bis*(POC). Dans un second temps, l'intermédiaire formé, similaire pour les deux types de prodrogue, est instable et va spontanément générer du formaldéhyde et libérer l'espèce intermédiaire *mono*(POM) ou *mono*(POC). Un même cycle de dégradation identique sur le second groupe biolabile conduit alors aux analogues phosphonates.

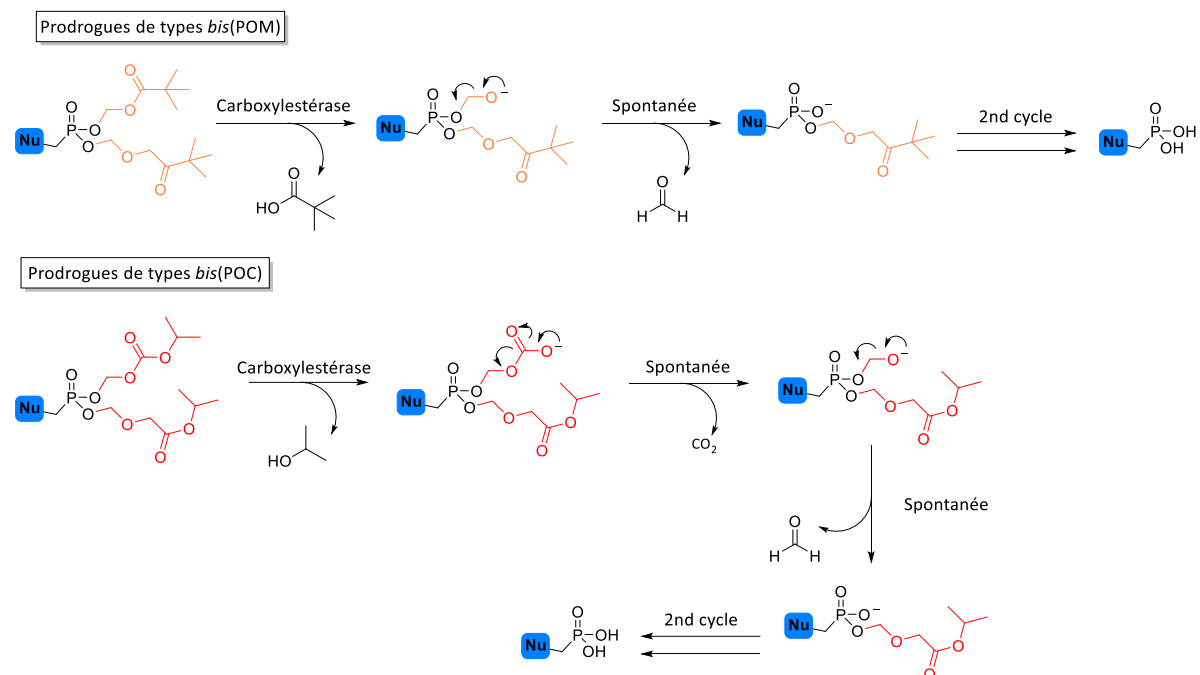


Figure 7 : Mécanismes de dégradation des prodrogues *bis*(POM) et *bis*(POC)

Ces deux motifs ont été appliqués au ténofovir. Le ténofovir *bis*(POC) a présenté une meilleure activité et une plus faible toxicité, ainsi qu'une meilleure stabilité intestinale chez le chien, comparé au dérivé *bis*(POM).²⁰ Le motif *bis*(POC) a permis d'augmenter la solubilité aqueuse d'un facteur 2,5, de multiplier par 100 l'efficacité du ténofovir ainsi que d'augmenter sa biodisponibilité orale chez la souris et le chien, de 20 et 36% respectivement.²¹ Cette prodrogue, formulée avec un sel de fumarate, a obtenu une autorisation de mise sur le marché pour lutter contre les infections du virus au VIH (2001) puis au VHB (2008). Par la suite, ce médicament a été commercialisé en thérapie combinée : double avec l'emtricitabine (Truvada®) ou triple avec l'emtricitabine et l'efavirenz (Atripla®) (voir paragraphe 1.1).

²⁰ Shaw, J.; Sueoka, C. M.; Oliyai, R.; Lee, W. A.; Arimilli, M. N.; Kim, C. U.; *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[(R)-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) in dogs. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1824–1829.

²¹ Robbins, B. L.; Srinivas, R. V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9- R -(2Phosphonomethoxypropyl)Adenine (PMPA), Bis(Isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 612–617.

2.3. Les prodrogues de types phosphate alcoxyalkyles

L'approche prodrogue de type phosphate alcoxyalkyle a été développée par le groupe d'Hostetler.²² Dans cette approche, un seul des oxygènes du groupement phosphate est masqué par une longue chaîne lipidique, permettant ainsi d'augmenter considérablement la stabilité ainsi que l'absorption orale de la molécule.

C'est en se basant sur les études de l'absorption intestinale chez le rat d'une lysophosphatidylcholine (LPC)²³, qui ont montré que 40% de celle-ci est absorbée sans subir de clivage enzymatique, l'approche prodrogue de type phosphonate alcoxyalkyle a été développée.

En ayant connaissance que la LPC peut être clivée par les phospholipases A1, C, D et la lysophospholipase à 3 endroits différents,²⁴ les modifications suivantes ont été apportées (Figure 8) :

- ✓ Le remplacement de la liaison acyle ester par un éther, afin de prévenir l'hydrolyse et d'augmenter la stabilité,
- ✓ La substitution du groupement hydroxyle par un atome d'hydrogène afin de prévenir la ré-acylation par la lysophosphatidylcholine transférase présente dans l'intestin et les autres tissus,
- ✓ La substitution du groupement phosphate par un groupement phosphonate permettant d'éviter l'hydrolyse par la phospholipase D.

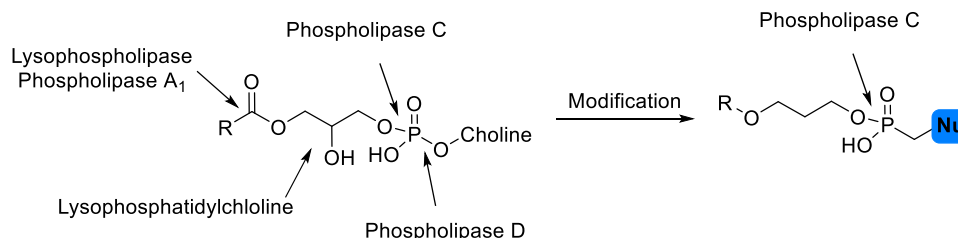


Figure 8 : Modifications de la LCP

Ces modifications ont permis d'obtenir un groupement biolabile clivable uniquement par la phospholipase C. Cette enzyme n'étant présente ni dans le plasma ni dans les sécrétions pancréatiques,²⁵ ces prodrogues demeureraient stables lors de l'absorption orale et durant le transport dans le plasma vers les tissus. Afin de déterminer la longueur de chaîne optimale, plusieurs analogues du cidofovir, portant des chaînes alcoxyalkyles variant de 12 à 24 atomes, ont été

²² Hostetler, K. Y. Alkoxyalkyl Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates Enhance Oral Antiviral Activity and Reduce Toxicity: Current State of the Art. *Antiviral Res.* **2009**, *82*, A84–A98.

²³ Scow, R. O.; Stein, Y.; Stein, O. Incorporation of Dietary Lecithin and Lysolecithin into Lymph Chylomicrons in the Rat. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 4919–4924

²⁴ Van Den Bosch, H. Chapter 9 Phospholipases. In *New Comprehensive Biochemistry*; Hawthorne, J. N., Ansell, G.B., Eds.; vol. 4; Elsevier, 1982; pp 313–357.

²⁵ Matsuzawa, Y.; Hostetler, K. Y. Properties of Phospholipase C Isolated from Rat Liver Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 646–652.

synthétisés.^{26,27} Ainsi, la variation de la taille du *linker*, de la longueur de la chaîne ainsi que la synthèse d'analogues cyclisés couplés associés à l'évaluation de leur activité *in vivo* sur les cytomégalo virus ont apporté les conclusions suivantes :

- ✓ Les composés sans *linker* sont moins actifs que ceux avec un *linker* oxypropyle.
- ✓ Pour une même chaîne carbonée, les analogues comportant un motif oxyéthyle sont plus actifs que ceux comportant un linker oxypropyle.
- ✓ La longueur de chaîne optimale est de 20 atomes, plus précisément une chaîne hexadécane lié à un *linker* de type oxypropyle (**groupement HDP**).
- ✓ Les dérivés avec des chaînes courtes (entre 12 et 16 atomes) ou avec des chaînes longues (24 atomes) ont une activité plus faible. En effet, les courtes chaînes sont plus hydrophiles engendrant une perméabilité membranaire réduite. Les longues chaînes, quant à elles, ont une fluidité plus faible ce qui peut également altérer le passage des membranes cellulaires ou bien diminuer l'activité enzymatique de la phospholipase C.

Les prodrogues de types monoester HDP, sont donc métabolisées en phosphonate par la phospholipase C (Figure 9). Ainsi, plusieurs prodrogues portant la fonction biolabile HDP ont été synthétisées par la société Chimerix dont deux d'entre elles ont atteint une phase de développement avancée.

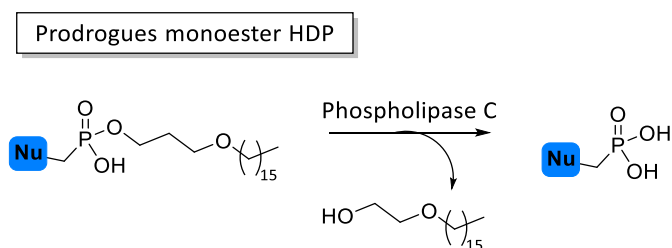


Figure 9 : Métabolisme des prodrogues de type HDP

✓ Le brincidofovir

Le brincidofovir, (HDP-HPMPC), également appelé CMX-001, est une prodrogue du cidovofir. Cette molécule présente une activité contre un grand nombre de virus à ADN, tels que le cytomégalo virus

²⁶ Wan, W. B.; Beadle, J. R.; Hartline, C.; Kern, E. R.; Ciesla, S. L.; Valiaeva, N.; Hostetler, K. Y. Comparison of the Antiviral Activities of Alkoxyalkyl and Alkyl Esters of Cidofovir against Human and Murine Cytomegalovirus Replication In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 656–662.

²⁷ Williams-Aziz, S. L.; Hartline, C. B.; Harden, E. A.; Daily, S. L.; Prichard, M. N.; Kushner, N. L.; Beadle, J. R.; Wan, W. B.; Hostetler, K. Y.; Kern, E. R. Comparative Activities of Lipid Esters of Cidofovir and Cyclic Cidofovir against Replication of Herpesviruses In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3724–3733.

ou les adénovirus.²⁸ A titre de comparaison, le brincidofovir, *in vivo*, est 12 fois plus actif que le cidovofir sur le papillomavirus humain et 4250 fois plus actif sur le virus Epstein-Barr. De plus, il possède une biodisponibilité orale de 88% chez la souris²⁹ (< 5% pour le cidovofir) tout en diminuant la toxicité néphrotique du cidovofir en n'étant pas substrat du transporteur anionique 1.³⁰ En effet, le cidovofir présente une concentration dans les reins 30 fois supérieure à celle dans le plasma chez le singe. Après plusieurs échecs en phase clinique par administration orale, le brincidofovir a obtenu en 2021, par la FDA, une AMM comme antiviral spécifique des poxvirus (Tembexa®),³¹ pour faire face à une éventuelle attaque bioterroriste ou à un accident dans un laboratoire dédié à l'étude des agents pathogènes de classe 4. Ce dernier est disponible sous deux formulations,³² en suspension orale ou sous la forme de comprimé, présentant une biodisponibilité de 16,8% et 13,4%, respectivement. En parallèle, lors des études de pharmacocinétique, deux métabolites inactifs du brincidofovir ont pu être caractérisés sous le nom de CMX-064 et CMX-103 (Figure 10).

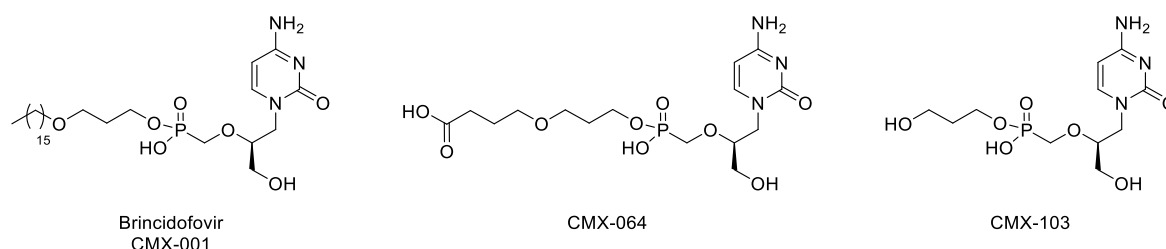


Figure 10 : Structures du brincidofovir et deux de ses métabolites

Ces deux métabolites, retrouvés aussi bien chez le singe, le rat que les humains,³³ représentent 75% des produits de la métabolisation du brincidofovir dans le plasma entre 0 et 24 h post administration. L'enzyme responsable de ce phénomène n'a cependant pas encore été identifiée. Néanmoins, l'incubation du brincidofovir en contact d'hépatocytes humains et en présence d'un inhibiteur du cytochrome P450 (CYP450), le 1-aminobenzotriazole, a permis de diminuer de 50% l'obtention du CMX-103 suggérant ainsi que sa formation puisse être partiellement médiée par le CYP450.³³

²⁸ Florescu, D. F.; Keck, M. A. Development of CMX001 (Brincidofovir) for the Treatment of Serious Diseases or Conditions Caused by DsDNA Viruses. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1171–1178.

²⁹ Ciesla, S. L.; Trahan, J.; Wan, W. B.; Beadle, J. R.; Aldern, K. A.; Painter, G. R.; *et al.* Esterification of Cidovofir with Alkoxyalkanols Increases Oral Bioavailability and Diminishes Drug Accumulation in Kidney. *Antiviral Res.* **2003**, *59*, 163–171.

³⁰ Tippin, T. K.; Morrison, M. E.; Brundage, T. M.; Momméja-Marin, H. Brincidofovir Is Not a Substrate for the Human Organic Anion Transporter 1: A Mechanistic Explanation for the Lack of Nephrotoxicity Observed in Clinical Studies. *Ther. Drug Monit.* **2016**, *38*, 777–786.

³¹ FDA approves drug to treat smallpox. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-drug-treat-smallpox> (accessed 2023-08-15).

³² Chimerix. Tembexa (brincidofovir) [package insert]. U.S. Food and Drug Administration website. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/214460s000,214461s000lbl.pdf. Revised June 2021 (accessed 2023-08-15).

³³ Lanier, R.; Trost, L.; Tippin, T.; Lampert, B.; Robertson, A.; Foster, S.; Rose, M.; Painter, W.; O'Mahony, R.; Almond, M.; Painter, G. Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses.* **2010**, *2*, 2740–2762.

✓ CMX-157

Une autre prodrogue comportant le groupement HDP a également été développée sous le nom de CMX-157 ou ténofovir exiladex³⁴ (Figure 11) et a donné lieu à une collaboration entre Chimerix et Contravir. Cette prodrogue, analogue du ténofovir, est 300 et 4,5 fois plus active que celui-ci sur les virus du VIH et du VHB respectivement.³⁵ Néanmoins, le développement de cette prodrogue s'est arrêté en phase 1 aux USA³⁶ et lors de la phase 2 en Thaïlande³⁷ bien que cette prodrogue fût non toxique et bien tolérée chez les sujets sains ou atteint du VHB. La fin de la collaboration entre Chimerix et Contravir peut expliquer l'arrêt prématuré des essais cliniques de cette molécule.³⁸

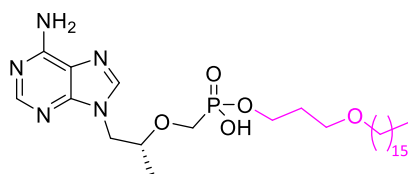


Figure 11 : Structure du CMX-157

2.4. Phosphoramidates et phosphonamidates

La technologie Protide (Prodrug + nucleotide) est la stratégie de prodrogue la plus aboutie pour les anti-cancéreux et les antiviraux. Cette technologie a été développée par le groupe de Christopher McGuigan^{39,40,41} dans les années 90, après un long travail de SAR⁴² (Relation Structure Activité). Elle

³⁴ Painter, G. R.; Almond, M. R.; Trost, L. C.; Lampert, B. M.; Neyts, J.; De Clercq, E.; *et al.* Evaluation of Hexadecyloxypropyl-9- R -[2-(Phosphonomethoxy)Propyl]- Adenine, CMX157, as a Potential Treatment for Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis B Virus Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3505–3509.

³⁵ Lanier, E. R.; Ptak, R. G.; Lampert, B. M.; Keilholz, L.; Hartman, T.; Buckheit, R. W.; *et al.* Development of Hexadecyloxypropyl Tenofovir (CMX157) for Treatment of Infection Caused by Wild-Type and Nucleoside/Nucleotide-Resistant HIV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2901–2909.

³⁶ A Phase 1, Randomized, Partial-Blind, Placebo-controlled, Sequential Dose Group, Ascending, Multiple Dose Study of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics, With Food Effect, of CMX157 in Healthy Subjects. Identifier NCT02585440. U.S. National Library of Medicine, 2015 [updated February 2, 2017]. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02585440> (accessed 2023-08-17).

³⁷ A Phase 2, Randomized, Open-label, Ascending, Sequential Dose Group, Multiple Dose Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Antiviral Activity of CMX157 in HBV-infected Subjects. Identifier NCT02710604. U.S National Library of Medicine, 2016 [updated September 13, 2017]. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02710604?term=CMX157&cntry=TH&draw=2&rank=2> (accessed 2023-08-17).

³⁸ Sun, S.; Yang, Q.; Sheng, Y.; Fu, Y.; Sun, C.; Deng, C. Investigational Drugs with Dual Activity against HBV and HIV (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *21*, 35.

³⁹ McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Intracellular Delivery of Bioactive AZT Nucleotides by Aryl Phosphate Derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048–1052.

⁴⁰ McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Aryl Phosphate Derivates of AZT Inhibit HIV Replication in Cells Where the Nucleoside Is Poorly Active. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 701–704.

⁴¹ Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: A Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem.* **2009**, *4*, 1779–1791.

⁴² Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2211–2226.

consiste à masquer les deux charges négatives d'un nucléoside monophosphate (ou phosphonate) en ajoutant sur le phosphore un aryloxy et un ester d'acide aminé lié par une liaison P-N au phosphore (Figure 12).

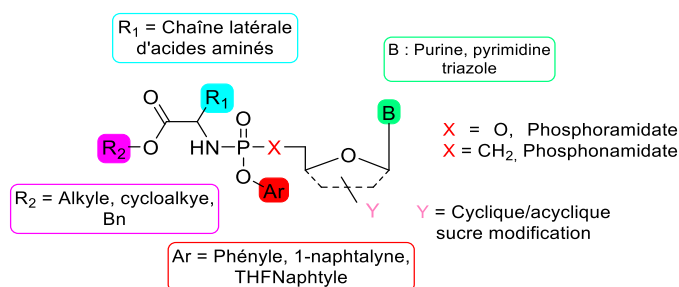


Figure 12 : Structure générale d'une ProTide

Par cette approche, une grande diversité structurale peut être obtenue en faisant varier :

- ✓ L'acide aminé (R_1), naturel ou non. De manière générale, la *L*-alanine s'est relevée être le plus efficace.
- ✓ La fonction ester (R_2), qui peut être un groupe alkyle linéaire (méthyle, éthyle, pentyle...), ramifié (isopropyle, néopentyle) ou aromatique.
- ✓ Le groupement aryle (Ar) dont le phényle ou le 1-naphtyle sont les plus couramment utilisés.

En 2016, Mehellou⁴³ rapporte qu'au moins 10 prodrogues développées avec cette technologie ont fait l'objet d'essais cliniques et que trois d'entre elles ont été approuvées par la FDA. Parmi les composés approuvés, deux sont des analogues nucléosidiques, le sofosbuvir et le remdesivir, et le troisième est un ANP, le ténofovir alafénamide (TAF) (Figure 13)

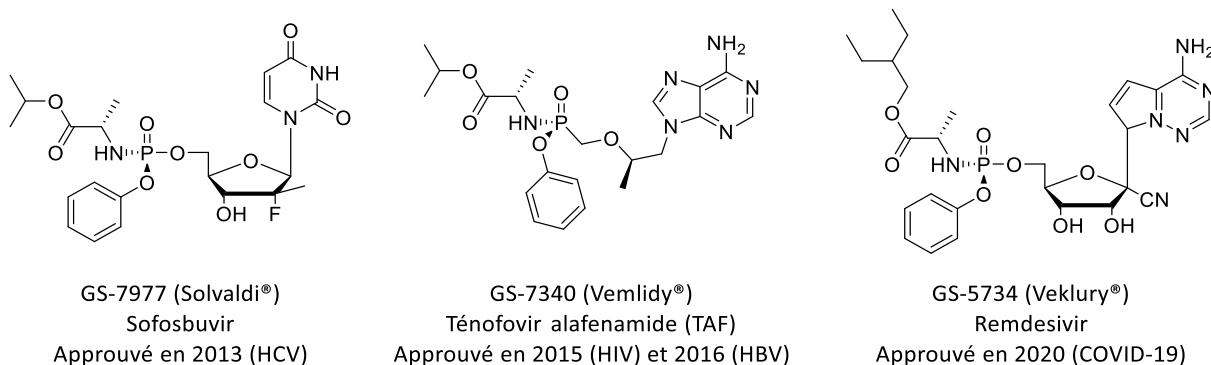


Figure 13 : Phosphor(n)amidates antiviraux approuvés par la FDA

L'ANP approuvé a été développé par Gilead et est considérée comme le successeur du ténofovir disoproxyle.⁴⁴ Le succès de cette nouvelle prodrogue est dû à sa grande stabilité plasmatique ($t_{1/2} \sim 90$ min) et à son activité antivirale (EC_{50} (VIH) = 5 nM) qui est 1000 et 10 fois plus importante que celle du

⁴³ Mehellou, Y. The ProTides Boom. *ChemMedChem*. **2016**, *11*, 1114–1116.

⁴⁴ De Clercq, E. Tenofovir Alafenamide (TAF) as the Successor of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF). *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *119*, 1–7.

TFV et du TDF, respectivement.⁹ Grâce à ces propriétés, 25 mg de TAF, administrés par voie orale, permettent d'offrir une meilleure activité anti-VIH que 300 mg de TDF (dose commerciale), tout en réduisant de 86% le taux plasmatique du ténofovir,⁹ diminuant ainsi la toxicité de ce médicament.⁴⁵ En effet, après administration par voie orale, la majorité du TDF est rapidement convertie en ténofovir dans le plasma ou en ténofovir diphosphate intracellulairement. L'accumulation de ténofovir dans le plasma après administration du TDF est responsable de la néphrotoxicité du TDF et celui-ci doit être utilisé avec précaution chez les patients atteints d'insuffisance rénale.⁴⁶

La synthèse de ce composé a été décrite dans de nombreux brevets et a abouti initialement à la formation de deux diastéréoisomères (GS-7340 et GS-7339) au niveau du phosphore (Figure 14).

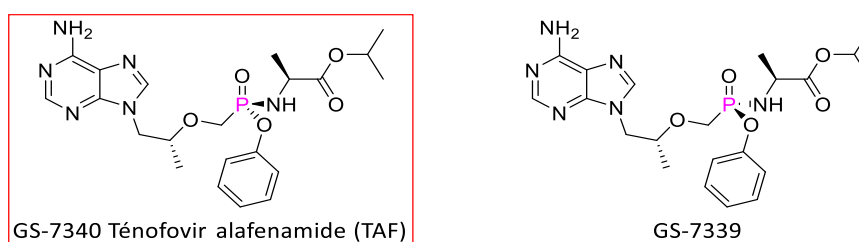


Figure 14 : Structure du TAF et de son énantiomère

La séparation chirale de ces deux diastéréoisomères a été développée⁴⁷ permettant d'évaluer leurs activités respectives. L'isomère Ps (GS-7340) a ainsi montré une activité sur le VIH 10 fois supérieure au composé GS-7339 (P_R).¹⁰ Ces données suggèrent que le métabolisme intracellulaire est sensible à la stéréochimie au niveau du phosphore et qu'il est donc important de la contrôler lors de la synthèse d'un nouvel antiviral de type ProTide.

Concernant le métabolisme de ces prodrogues, les groupements bioloabiles du phosphoramidate (ou du phosphonamidate) sont clivés, après pénétration cellulaire, en deux étapes enzymatiques libérant l'analogue nucléosidique monophosphate ou le phosphonate (Figure 15).

⁴⁵ Fernandez-Fernandez, B.; Montoya-Ferrer, A.; Sanz, A. B.; Sanchez-Niño, M. D.; Izquierdo, M. C.; Poveda, J.; *et al.* Tenofovir Nephrotoxicity: 2011 Update. *AIDS Res. Treat.* **2011**, *2011*, 1–11.

⁴⁶ Wassner, C.; Bradley, N.; Lee, Y. A Review and Clinical Understanding of Tenofovir: Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Tenofovir Alafenamide. *JAPAC.* **2020**, *19*, 232595822091923.

⁴⁷ Chapman, H.; Kernan, M.; Prisbe, E.; Rohloff, J.; Sparacino, M.; Terhorst, T.; *et al.* Practical synthesis, separation and stereochemical assignment of the PMPA pro-drug GS-7340. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids.* **2001**, *20*, 621–628.

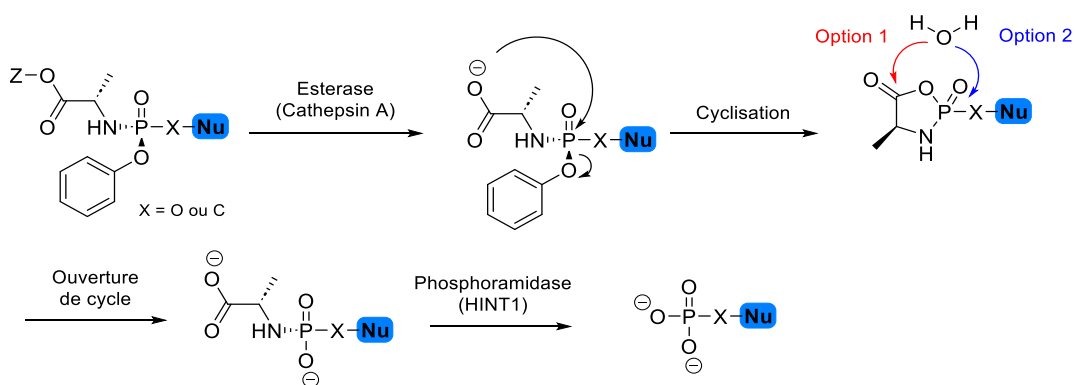


Figure 15 : Mécanisme proposé pour le métabolisme des aryloxyphosphor(n)amidates⁴²

Lors du métabolisme des ProTides, l'acide aminé est tout d'abord clivé par une estérase intracellulaire, identifiée comme étant la cathepsine A ou bien la carboxylestérase 1 (CES1). Le carboxylate généré effectue une attaque nucléophile intramoléculaire sur le phosphore provoquant l'élimination du groupement aryle, conduisant à la formation d'un cycle instable à 5 chaînons. La formation du métabolite cyclique est suivie d'une attaque nucléophile de l'eau sur le carbonyle ou le phosphore conduisant à l'ouverture du cycle générant l'intermédiaire phosphoramidate. La dernière étape est le clivage de la liaison P-N par une seconde enzyme de type phosphoramidase ou phosphodiesterase, « l'histidine triad nucleotide binding protein 1 » (HINT1), aboutissant à la formation du monophosphate (ou phosphonate).

2.5. Les prodrogues de type mixte HDP/POC

Dans l'optique de poursuivre le développement de prodrogues nucléosides, notre équipe a décrit pour la première fois la synthèse d'une prodrogue mixte de type HDP/POC⁴⁸ (Figure 16).

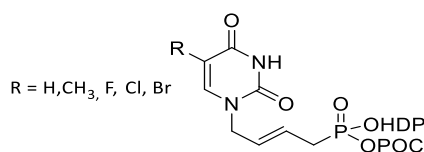


Figure 16 : Structures des premières prodrogues mixtes HDP/POC

Parmi les analogues de type HPD/POC synthétisés au laboratoire, un composé a récemment présenté une activité contre le virus de l'hépatite B. Sur une culture cellulaire de type Huh7, la molécule a engendré 62% d'inhibition du virus, à 10 μ M, sans montrer de cytotoxicité apparente.⁴⁹ Ce composé possède une meilleure activité que son analogue *bis*(POC). Le métabolisme de ces prodrogues mixtes diffère de celui des analogues *bis*(POC). Le groupement POC peut être clivé en milieu intra et

⁴⁸ Pradère, U.; Clavier, H.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio L. A. The shortest strategy for generating phosphonate prodrugs by olefin cross-metathesis – application to acyclonucleoside phosphonates. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 7324–7330.

⁴⁹ Abuduaini, T.; Roy, V.; Marlet, J.; Gaudy-Graffin, C.; Brand, D.; Baronti, C.; *et al.* Synthesis and Antiviral Evaluation of (1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazol)-(E)-2-Methyl-but-2-Enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs. *Molecules.* **2021**, 26, 1493.

extracellulaire, formant le composé mono-HDP (encadré en noir sur Figure 17) tandis que le groupement HDP n'est clivé qu'en milieu intracellulaire, libérant la forme phosphonate libre (Figure 17). Il se peut également que les métabolites de l'oxydation de la chaîne HDP, observés pour le brincidofovir, puissent être présents avec cette molécule.

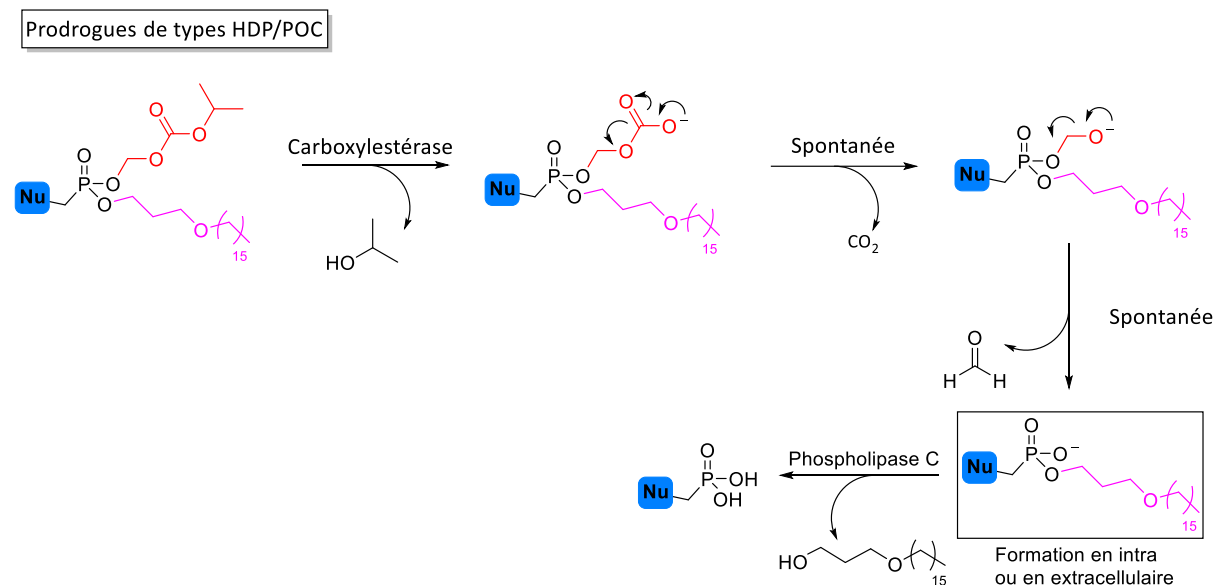


Figure 17 : Mécanisme proposé pour les prodrogues mixtes HDP/POC

De même, un autre composé, triple prodrogue, issu de notre laboratoire, le LAVR-289, a présenté des activités remarquables (de l'ordre de quelques nM) sur de nombreux virus à ADN. Par exemple, sur le HCMV le LAVR-289 est 10 fois plus actif que le cidofovir, qui est la molécule de référence. Cette triple prodrogue porte un groupements POC et HDP sur le phosphonate et un groupement acétate masquant une fonction hydroxyle.

Ce composé synthétisé pour la première fois par à l'échelle du milligramme (thèse du Dr Maxime Bessièrès⁵⁰), puis à l'échelle du gramme (thèse du Dr Tuniyazi Abudaini⁵¹) a conduit au dépôt d'un brevet⁵² et est actuellement en développement pré-clinique. Cette molécule appartient à la famille des ANPs possédant une nucléobase de type O-(2,4-diaminopyrimidine) et un squelette oléfinique.

⁵⁰ M. Bessière. Synthèse métallo-catalysée de phosphonates trans-but-2'-ényl de nucléosides sous forme prodrogue. Thèse de doctorat. Université d'Orléans, 2016.

⁵¹ T. Abudaini. Génération de nouveaux acyclonucléosides phosphonates oléfiniques et de 1-c-arylglycosides. Thèse de doctorat. Université d'Orléans, 2021.

⁵² Agrofoglio, L. A. ; Roy, V. ; De Schutter, C.; Bessières, M.; Gallardo, F. New antiviral acyclonucleosides analogues. WO2019206907, A1, 2019.

3. Les ANPs portant une nucléobase de type O-diaminopyrimidine

En 2002, Antonin Holý *et al.*⁵³ ont synthétisé et mesuré l'activité antivirale d'une nouvelle classe d'ANPs, la famille des 6-[2-(phosphonométhoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidine. Dans cette nouvelle famille, la nucléobase est une pyrimidine, préférentiellement la 2,4-diaminopyrimidine (DAPy), liée à une chaîne latérale phosphonate aliphatique par une fonction éther en C6 du cycle pyrimidine. Bien que la DAPy soit une base pyrimidine celle-ci, par sa structure, agit comme un mime d'une purine. En effet, la chaîne aliphatique phosphonate étant reliée au carbone C6 (non le N1) du cycle pyrimidique par un oxygène, cet enchaînement d'atomes mime le cycle imidazole incomplet d'une purine où une fonction éther remplace le N9 (Figure 18). De plus, Herman *et al.*⁵⁴ ont validé cette hypothèse en montrant que la DAPy, agit comme un mime de purine envers la transcriptase inverse du VIH. En effet, la DAPy établit des liaisons hydrogène avec la thymine pour former une paire de bases au sein de l'ADN viral. Cette paire de bases est maintenue *via* des interactions de type Watson Crick entre le O4 de la thymine et le 4-NH₂ de la DAPy mais aussi entre le N3-H de la thymine et le N3 de la DAPy. Ce système peut aussi établir une troisième liaison hydrogène entre C4-O de la thymine et le C4-NH₂ de la DAPy, ce qui peut expliquer que les dérivés possédant une base DAPy sont incorporés dans l'ADN viral de façon plus stable et plus efficacement que leurs analogues purines (Figure 18).

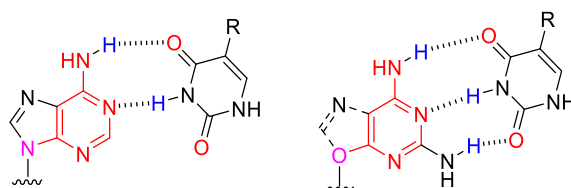


Figure 18 : Similarité de structure entre la nucléobase adénine et la DAPy

Les composés ci-dessous (Figure 19), la 2,4-diamino-6-[2-(phosphonométhoxy)éthoxy]pyrimidine ou PMEO-DAPy, la 2,4-diamino-6-(R)-[2-(phosphonométhoxy)propoxy]pyrimidine ou (R)-PMPO-DAPy et la 2,4-diamino-6-(R)-[3-hydroxy-2-(phosphonométhoxy)propoxy]pyrimidine ou (R)-HPMPO-DAPy ont été les premières références dans cette famille d'ANPs.

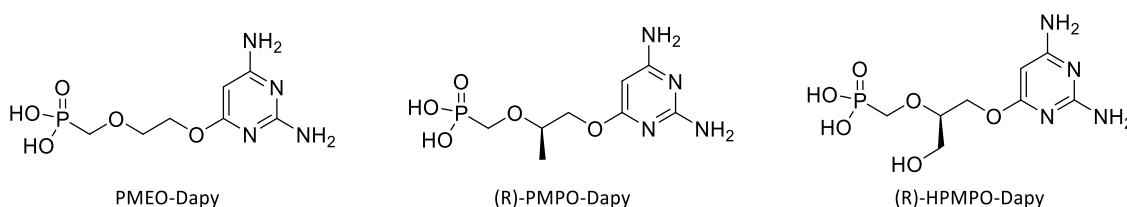


Figure 19 : Structures des premiers ANPs-DAPy

⁵³ Holý, A.; Votruba, I.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Naesens, L.; *et al.* 6-[2-(Phosphonomethoxy)Alkoxy]Pyrimidines with Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1918–1929.

⁵⁴ Herman, B. D.; Votruba, I.; Holý, A.; Sluis-Cremer, N.; Balzarini, J. The Acyclic 2,4-Diaminopyrimidine Nucleoside Phosphonate Acts as a Purine Mimetic in HIV-1 Reverse Transcriptase DNA Polymerization. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12101–12108.

Ces composés possèdent un fort potentiel antiviral sur une large variété de virus à ADN et sur les rétrovirus^{55,56} :

- Le HPMPO-DAPy est très actif sur les papilloma-, adéno-, herpès et poxvirus tout comme le cidofovir ou encore le (S)-HPMPA (Tableau 2).
- Le PMEO-DAPy et le (R)-PMPO-DAPy ont montré des activités, notamment sur les rétrovirus (VIH) et la famille des hépadnavirus (HBV), similaires à celles du ténofovir et de l'adéfovir (Tableau 2).

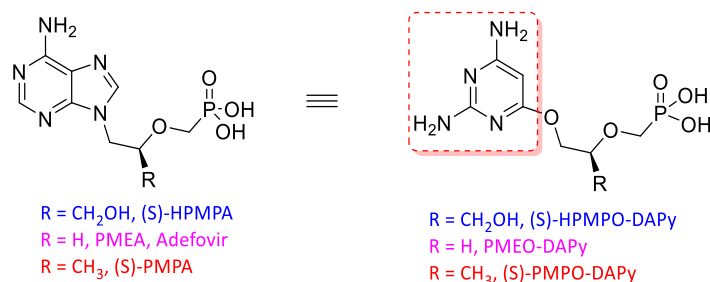


Figure 20 : Analogues DiaminoPyrimidines (DAPys)

Tableau 2 : Activités des composés possédant une base DAPy en comparaison avec les ANPs de référence

Composés	IC ₅₀ (µg/mL) VIH ⁵⁷	IC ₅₀ (µM) HBV ⁵⁸
Ténofovir	0,79	0,17
Adéfovir	1,5	0,07
(R)-PMPO-DAPy	1,8	4,3
PMEO-DAPy	1,1	0,3
Composés	IC ₅₀ (µg/mL) Adénovirus type 2 ⁵⁵	IC ₅₀ (µg/mL) Virus de la variole ⁵⁵
Cidofovir	0,64	4,6
(S)-HPMPA	0,20	0,23
(R)-HPMPO-DAPy	1,60	1,65

⁵⁵ De Clercq, E.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Leyssen, P.; Naesens, L.; Neyts, J.; *et al.* Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4- diaminopyrimidines . *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*. **2005**, *24*, 331–341.

⁵⁶ Balzarini, J.; Pannecouque, C.; Naesens, L.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; *et al.* 6-[2-Phosphonomethoxy]Alkoxy]-2,4-Diaminopyrimidines: A New Class of Acyclic Pyrimidine Nucleoside Phosphonates with Antiviral Activity. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*. **2004**, *23*, 1321–1327.

⁵⁷ Balzarini, J.; Schols, D.; Van Laethem, K.; De Clercq, E.; Hockova, D.; Masojdkova, M.; *et al.* Pronounced in Vitro and in Vivo Antiretroviral Activity of 5-Substituted 2,4-Diamino-6-[2-(Phosphonomethoxy)Ethoxy] Pyrimidines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *59*, 80–86.

⁵⁸ Ying, C.; Holý, A.; Hocková, D.; Havlas, Z.; De Clercq, E.; Neyts, J. Novel Acyclic Nucleoside Phosphonate Analogues with Potent Anti-Hepatitis B Virus Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1177–1180.

De plus, d'autres dérivés du PMEODAPy substitués en position 5 possèdent des activités antivirales significatives, de l'ordre du μM , sur les rétrovirus.^{59,57} Parmi ceux-ci, le dérivé 5-méthyl-PMEODAPy présente les meilleures activités sur le VIH et le virus du sarcome murin (VSM), de 0,32 μM et 0,18 μM respectivement,⁵⁶ tout en étant moins toxique que l'adéfovir.⁵⁷ De même, De Castro *et al.*⁶⁰ ont montré que l'analogue triazine du PMEODAPy permettait de conserver son activité antivirale. Le PMEODAPy a également été développé sous différentes prodrogues,⁶¹ *bis*(POM), *bis*(POC) et phosphoramidate, qui ont permis d'augmenter l'activité antivirale de la molécule parente (Tableau 3).

Tableau 3 : Activités antivirales du PMEODAPy et de ses prodrogues

Composés	IC ₅₀ (μM) HSV-1 ⁶¹
PMEODAPy	45
<i>bis</i> (POM)-PMEODAPy	10
<i>bis</i> (POC)-PMEODAPy	2,62
Phosphoramidate-PMEODAPy	3,9

4. Les ANPs de squelette oléfinique, une nouvelle famille

Même si la famille des acyclonucléosides phosphonates comportant un motif phosphonométhoxy est la seule présentant des composés approuvés dans le cadre de traitement antiviraux, de nombreux analogues ont été synthétisés et leurs activités biologiques évaluées. Les ANPs possédant une chaîne alkyle insaturée entre la nucléobase et le phosphore n'ont été que très peu explorés depuis leur création dans les années 1990. En 1992, Megati *et al.*⁶² ont proposé la synthèse d'ANPs insaturés *via* une réaction anormale de Michaelis-Arbuzov ou Michaelis-Becker en présence d'un système insaturé. Harnden *et al.*⁶³, quant à eux, ont décrit la synthèse de plusieurs phosphonoalcènes dont plusieurs ont présenté une activité antivirale prometteuse, mais aussi une certaine toxicité. De même, Lazrek *et al.*⁶⁴

⁵⁹ Hocková, D.; Holý, A.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; *et al.* 5-Substituted-2,4-Diamino-6-[2-(Phosphonomethoxy)Ethoxy]Pyrimidines Acyclic Nucleoside Phosphonate Analogues with Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5064–5073.

⁶⁰ De Castro, S.; Fernández-Cureses, G.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Sánchez-Murcia, P. A.; Korba, B.; *et al.* Conservation of Antiviral Activity and Improved Selectivity in PMEODAPy upon Pyrimidine to Triazine Scaffold Hopping. *Antiviral Res.* **2015**, *122*, 64–68.

⁶¹ Krečmerová, M.; Dračinský, M.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Pomeisl, K.; Andrei, G. New Prodrugs of Two Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates: Synthesis and Antiviral Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4637–4648.

⁶² Megati, S.; Phadtare, S.; Zemlicka, J. Unsaturated Phosphonates as Acyclic Nucleotide Analogs. Anomalous Michaelis-Arbuzov and Michaelis-Becker Reactions with Multiple Bond Systems. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2320–2327.

⁶³ Harden, M. R.; Parkin, A.; Parratt, M.J.; Perkins, R.M. Novel acyclonucleotides: synthesis and antiviral activity of alkenyl phosphonic acid derivatives of purines and a pyrimidine. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1343–1355.

⁶⁴ Lazrek, H.B.; Rochdi, A.; Khaider, H.; Barascut, J.L.; Imbach, J.L.; Balzarini, M.; *et al.* Synthesis of (Z) and (E) α -alkenylphosphonic acid derivatives of purines and pyrimidines. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3807–3816.

ont présenté la synthèse d'ANPs de type vinylphosphonates (*Z* et *E*), qui, malheureusement, étaient dépourvus d'activité antivirale.

Depuis plus d'une dizaine d'années, notre équipe a décrit la synthèse d'ANPs possédant un squelette oléfinique dont la formule générale est donnée en Figure 21. Leur conception consiste à remplacer la fonction éther par des fonctions bioisostères comme une fonction méthylène *trans*.

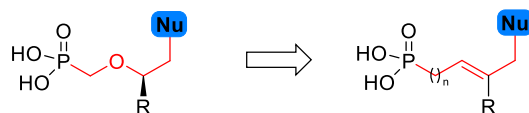


Figure 21 : ANPs de type oléfinique

Ainsi, plusieurs analogues de longueur de chaîne et de stéréochimie différentes ont donc été synthétisés (Figure 22). La capacité d'un nouvel ANP insaturé, à être phosphorylé par les nucléosides kinases présentes dans les cellules humaines est mesurée par un test enzymatique avec l'enzyme recombinante hTMPK. Ce test enzymatique a mis en évidence que l'ANP possédant une chaîne but-2'-ényle est le meilleur substrat pour cette enzyme et que l'isomère *E* présente une meilleure affinité enzymatique que l'isomère *Z*.⁶⁵

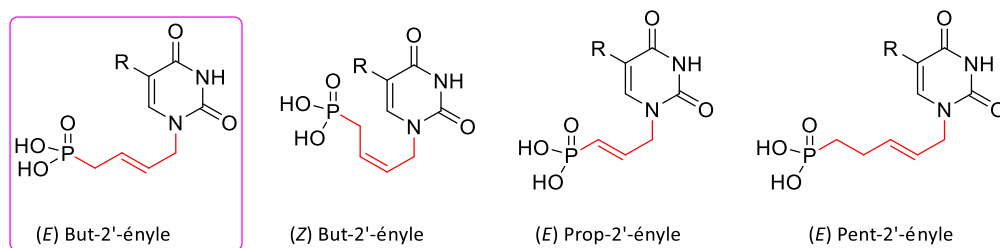


Figure 22 : ANPs oléfiniques développés par notre équipe

Afin d'établir et de comprendre l'agencement structural au niveau du site de phosphorylation de l'enzyme, le composé a été co-cristallisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Meyer (Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale – Gif-sur-Yvette). La co-cristallisation, du composé « lead » (encadré en rose dans la Figure 22), au sein du site actif de l'enzyme hTMPK a montré que le squelette but-2'-ényle mime la conformation des atomes C1', O4', C4' et C5' de la thymidine monophosphate (TMP). Il a également été mis en évidence que la chaîne but-2'-ényle apporte une meilleure affinité de la molécule envers l'enzyme (Figure 23).

⁶⁵ Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J. *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 222–232.

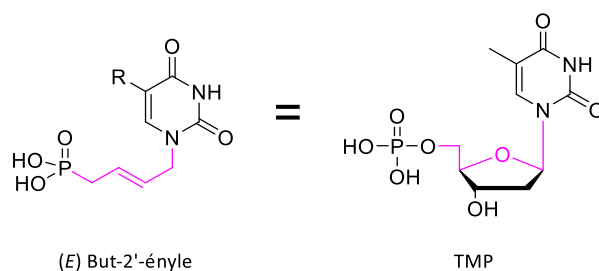
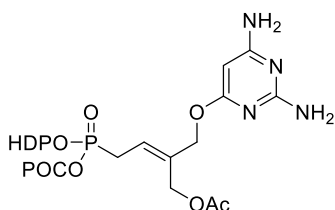


Figure 23 : Comparaison structurale entre TMP et le composé (E) but-2'-ényle

Au cours de ces dernières années, notre équipe a ainsi développé une nouvelle famille d'ANPs de type *trans* but-2'-ényle. Un grand nombre de composés a été synthétisé et évalué sur différents virus à ADN et ARN. Parmi eux, plusieurs composés ont présenté des activités antivirales marquées et le LAVR-289, triple prodrogue hydrophobe active sur un large panel de virus à ADN, a été sélectionné pour un développement pré-clinique.



LAVR-289

Figure 24 : Structure du LAVR-289

Les études de pré-formulation pour véhiculer cette prodrogue ou la forme active feront l'objet de cette thèse. Néanmoins, avant de présenter ces résultats, il est nécessaire de faire un rappel sur les grandes étapes de développement d'un médicament.

5. Généralités sur le développement d'un médicament

5.1. Rappel sur le développement d'un médicament

Si les nouvelles approches permettant la mise au point d'un candidat médicament associent maintenant de manière cyclique (et moins linéaire) les divers acteurs impliqués (chimistes, biologistes, pharmacologues, modélisateurs, intelligence artificielle, ...) dans le but de réduire le risque d'échec, mais son développement reste un processus coûteux et toujours risqué. Une fois un « hit » trouvé, les essais pré-cliniques, *in vitro* puis *in vivo*, permettent de confirmer l'intérêt du « hit » en tant que « lead ». Plusieurs étapes restent nécessaires avant d'envisager un passage en phase clinique. On peut citer la problématique du scale-up aux normes en vigueur « BPL » (bonnes pratiques de laboratoires),

la formulation, l'évaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) ainsi que les études ADME-TOX (Absorption, distribution, métabolisation, élimination et toxicité) sur divers modèles.⁶⁶

Cependant, un grand nombre de candidats médicaments échouent pendant les phases cliniques à cause de leur inefficacité ou bien d'une toxicité apparue lors des essais sur l'homme. Pour rappel, les essais cliniques sont réalisés sur des êtres humains volontaires et se déroulent en 4 phases. La phase I cherche à déterminer la toxicité et les paramètres pharmacocinétiques de la molécule étudiée. La phase II vise à établir l'efficacité de la molécule et à déterminer sa posologie optimale. La phase III, évalue l'intérêt thérapeutique du médicament en étudiant son apport bénéfices/risques. Enfin, la phase 4, appelée pharmacovigilance, se déroule après la commercialisation du médicament et permet de recueillir des informations concernant la sécurité de celui-ci en temps réel et permet, si nécessaire, de le retirer du marché. Entre 2013 et 2015, 52% des molécules ont échoué à cause de leur inefficacité tandis que 24% des molécules ont présenté une toxicité trop importante pour poursuivre les essais cliniques de phase II et III.⁶⁷

Afin de s'assurer que l'administration et la formulation de ces médicaments ne soient pas responsables de ces échecs, il est nécessaire de procéder, en amont de la phase de développement, à des études de pré-formulation. Ce sont ces études galéniques qui vont définir les choix de la formulation, de fabrication et de contrôles analytiques des différents lots. En effet, l'optimisation des hits, à savoir leur bonne efficacité, leur stabilité et leur biodisponibilité dépend grandement de la forme galénique.

5.2. Les objectifs de la pré-formulation

La pré-formulation est un concept important qui a émergé entre les années 1950 et 1960 et qui joue un rôle prépondérant dans les différentes étapes de développement d'un médicament. Durant cette période, un changement d'orientation s'est opéré dans le développement de produits pharmaceutiques industriels. Ces études, dont le coût est estimé à \$100 000⁶⁶ ont pour principaux objectifs de⁶⁸ :

- ✓ Générer des informations utiles pour le formulateur afin qu'il puisse développer une formulation stable, efficace, biocompatible et pouvant être produite en grande quantité.
- ✓ Améliorer la biodisponibilité et augmenter la stabilité du candidat médicament, aussi bien durant le processus de fabrication que lors du transport ou du stockage.

⁶⁶ Strovel, J.; Sittampalam, S.; Coussens, N.P.; *et al.* Early Drug Discovery and Development Guidelines: For Academic Researchers, Collaborators, and Start-up Companies. **2012** [Updated 2016-07-1]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92015/> (accessed 2023-09-12).

⁶⁷ Harrison, R. K. Phase II and Phase III Failures: 2013–2015. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 817–818.

⁶⁸ Ahirwar, K.; Shukla, R. Preformulation Studies: A Versatile Tool in Formulation Design. In *Drug Formulation Design*; Shukla, R., Kuznetsov, A., Ali, A., Eds.; IntechOpen, 2023.

- ✓ Sélectionner des excipients qui soient compatibles avec la substance active.
- ✓ Établir le profil pharmacocinétique et de biodistribution du candidat médicament.
- ✓ Déterminer les propriétés physico-chimiques d'une nouvelle entité chimique ou biologique.

Ces études valident le choix du « lead » en vue de la faisabilité de sa formulation et de sa manutention future. En effet, parmi les candidats médicaments, tous n'auront pas les propriétés physico-chimiques adéquates pour conduire à une formulation stable et donc devenir un médicament.

Les études de pré-formulation reposent sur 3 grands axes de recherche⁶⁹ :

- ✓ **Les études de solubilité** : détermination du pKa, du coefficient de partage (Log P), la solubilité dans l'eau et des solvants organiques,
- ✓ **Les études de stabilité** : la compatibilité avec les excipients, les stabilités au pH, en milieu oxydant, sous UV, plasmatique,
- ✓ **Les différentes caractérisations** : hygroscopicité, polymorphisme, structure cristalline.

Pour mener à bien ces études, il est indispensable de développer une méthode analytique afin de pouvoir suivre la stabilité du principe actif dans différents milieux. La méthode analytique est aussi utilisée aussi pour déterminer les métabolites intra et extracellulaires pouvant se former durant les étapes de (pré)-cliniques afin d'anticiper ceux présents chez le petit animal puis chez l'Homme. Les connaissances de la solubilité, de la perméabilité, ainsi que la voie d'administration sont également des atouts lors du développement d'une formulation.

5.3. Voies d'administration des médicaments

Les voies d'administrations des médicaments sont variées.⁷⁰ Le choix de la voie d'administration est déterminé par les propriétés de la molécule et par sa cible thérapeutique (le besoin d'une action rapide, d'une administration à long terme, traitement chronique...). Ces voies d'administration diffèrent en sécurité, coût et en fonction du confort du patient. La voie orale est la plus couramment utilisée avec pas moins de 90% des médicaments présents sur le marché mondial.⁷¹ La voie intraveineuse, quant à elle, est requise pour obtenir une action rapide du médicament et est utilisée majoritairement en médecine d'urgence (Figure 25).

⁶⁹ Bhise, M. G., Lahane, A. R., Kohale, N. B., Shende, S.G. A review on preformulation studies. *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* **2022**, 9, 609-625.

⁷⁰ Bolger, G. T. Routes of Drug Administration. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2018; p 1-3.

⁷¹ Alqahtani, M. S.; Kazi, M.; Alsenaidy, M. A.; Ahmad, M. Z. Advances in Oral Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 618411.

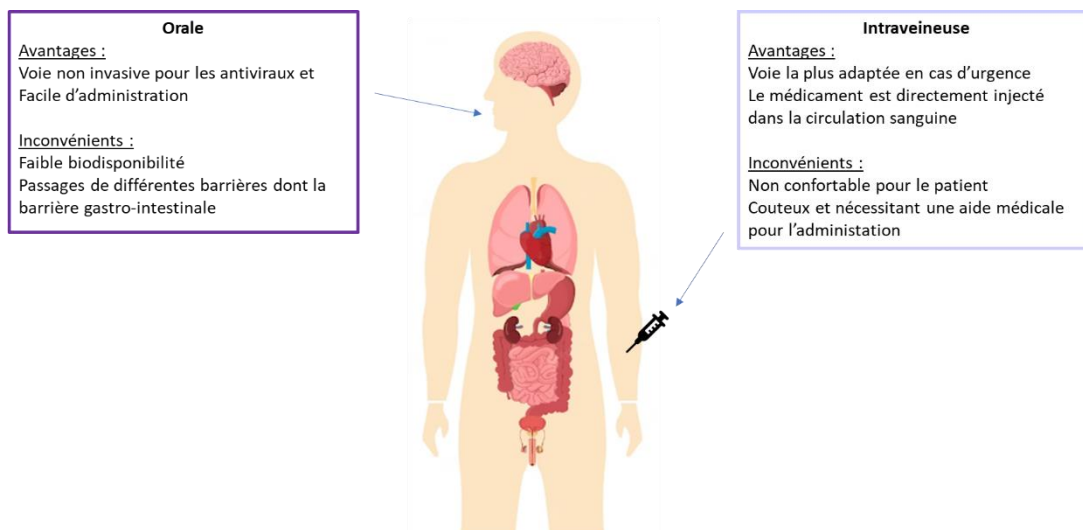


Figure 25 : Les deux principales voies d'administration du médicament

Chaque voie a ses avantages et ses inconvénients. La voie orale permet le recours à des formes galéniques variées telles que des comprimés, des capsules molles ou dures ou bien des préparations liquides. Cette voie d'administration est considérée comme la voie la plus pratique pour les patients, car non invasive, mais n'est adaptée que pour des molécules montrant une grande hydrosolubilité et résistantes à l'acidité de l'estomac. De plus, le passage des médicaments à travers la barrière gastro-intestinale varie en fonction des individus. La voie orale est aussi limitée par des biodisponibilités faibles ou variables qui ne permettent pas un contrôle précis de la dose rejoignant la circulation systémique.

La voie intraveineuse (IV), qui consiste en l'administration directe dans la circulation systémique ou les tissus vasculaires, permet à la molécule active de passer les barrières de défense. Cette voie d'administration est contraignante pour le patient car elle est invasive et l'expose à de fortes concentrations en principe actif, pouvant entraîner une toxicité systémique au moment de l'injection. Cette voie est également la plus utilisée pour le traitement des maladies cancéreuses (chimiothérapie), ou bien en urgence lorsqu'une action rapide est nécessaire. En plus de ces premières contraintes, le volume d'injection, le pH, l'osmolalité, ... sont des paramètres à maîtriser afin d'éviter les effets secondaires importants. D'autres voies d'administration moins communes peuvent être utilisées comme la voie vaginale qui est utilisée dans les thérapies contre le VIH⁷² ou encore la voie oculaire dans le cadre des infections liées au virus de l'herpès⁷³ (HSV).

⁷² Valamla, B.; Thakor, P.; Phuse, R.; Dalvi, M.; Kharat, P.; Kumar, A.; *et al.* Engineering Drug Delivery Systems to Overcome the Vaginal Mucosal Barrier: Current Understanding and Research Agenda of Mucoadhesive Formulations of Vaginal Delivery. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2022**, *70*, 103162.

⁷³ Pandey, M.; Choudhury, H.; Abdul-Aziz, A.; Bhattamisra, S. K.; Gorain, B.; Su, J. S. T.; *et al.* Advancement on Sustained Antiviral Ocular Drug Delivery for Herpes Simplex Virus Keratitis: Recent Update on Potential Investigation. *Pharmaceutics.* **2020**, *13*, 1.

À chacune des voies d'administration est associée une barrière biologique pouvant réduire l'effet du principe actif. Par exemple, il peut être nécessaire de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE), pour délivrer des antiviraux au niveau du système nerveux central (SNC). Ces barrières diminuent d'autant plus la distribution du médicament.⁷⁴ En effet, les molécules hydrophiles ne vont pas avoir la capacité de franchir la BHE en raison des domaines lipidiques qui la constitue. Ainsi, connaître la cible biologique est également primordiale dans le cadre du développement d'un médicament car elle impacte fortement le choix de la voie d'administration et donc la formulation du médicament.

6. Systèmes de délivrance des antiviraux

6.1. Système de Classification Biopharmaceutique (BCS)

Comprendre les propriétés biopharmaceutiques et physico-chimiques d'un médicament est la clef dans le développement de sa formulation et le choix de la voie d'administration. Le système de classification biopharmaceutique (BCS), développé en 1995 par l'équipe de J.R Crison,⁷⁵ est un outil précieux dans le développement d'une formulation. Ce système catégorise les molécules en 4 groupes (Figure 26), en fonction de leur solubilité et de leur perméabilité cellulaire. Une haute perméabilité alliée à une haute solubilité positionne la molécule dans la classe I ; une haute perméabilité associée à une faible solubilité relie la molécule à la classe II ; une faible perméabilité additionnée à une haute solubilité amène la molécule dans la classe III ; enfin une faible perméabilité accompagnée d'une faible solubilité case la molécule en classe IV.

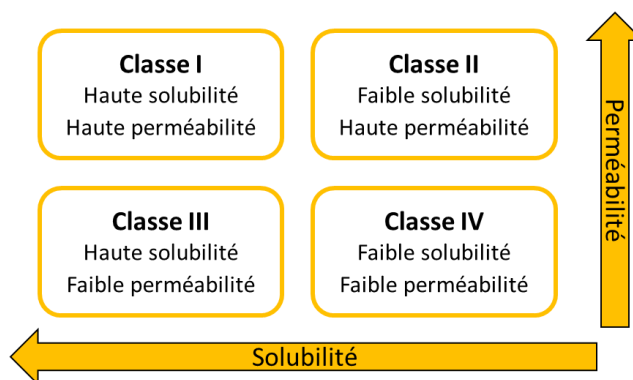


Figure 26 : Classification biopharmaceutique

Plus précisément, un composé est considéré hautement perméable si l'adsorption de la molécule est $\geq 90\%$, tandis qu'un composé est considéré hautement soluble si sa plus haute dose est soluble dans un volume ≤ 250 mL d'une solution aqueuse dont le pH est compris entre 1 et 7,5 à 37 °C.

⁷⁴ Delshadi, R.; Bahrami, A.; McClements, D. J.; Moore, M. D.; Williams, L. Development of Nanoparticle-Delivery Systems for Antiviral Agents: A Review. *J. Control Release*. **2021**, *331*, 30–44.

⁷⁵ Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res*. **1995**, *12*, 413–420.

Les antiviraux appartiennent pour 50% à la classe II (à cause de leur faible solubilité), 44% sont regroupés dans la classe III (à cause de leur faible perméabilité) et 6% appartiennent à la classe IV (où ils montrent une faible perméabilité et une faible solubilité). Cependant, aucun n'appartient à la classe I (Figure 27).

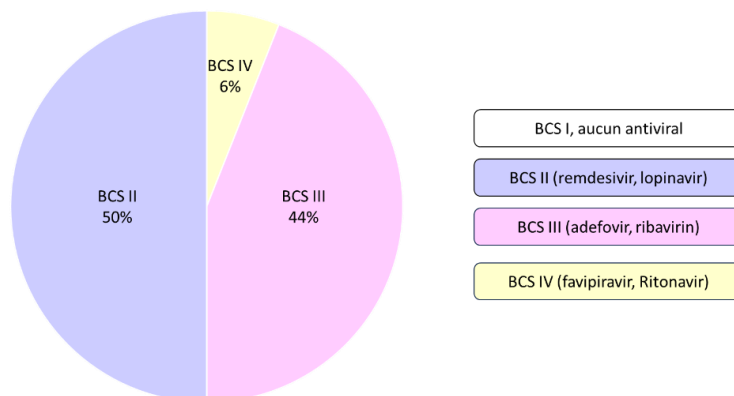


Figure 27 : Diagramme de répartition des antiviraux en fonction de la BCS (adapté de Chen *et al.*⁷⁶)

La plupart des ANPs (sous leur forme acide phosphonique libre) tels que l'adéfovir, le ténofovir et le cidofovir appartiennent à la classe III. Nous avons vu précédemment que l'utilisation de prodrogues et en particulier de groupements lipidiques⁷⁷ aidait à surmonter les problèmes de perméabilité afin d'augmenter la biodisponibilité et maintenir ou améliorer l'activité antivirale.

Le classement BSC est appliqué uniquement aux molécules actives et non aux prodrogues de médicaments. Cependant, pour un souci de clarté, nous assimilerons le LAVR-289, comme molécule active positionnée en classe II. En effet, ses trois groupements biolabiles, dont la chaîne lipidique HDP en particulier, lui confère une grande perméabilité mais diminue drastiquement sa solubilité. Cette hydrophobie (poor water-soluble) qui est un problème important des antiviraux concerne aussi 60 à 70% des médicaments en développement et 35% de ceux actuellement sur le marché.⁷⁸ La faible hydrosolubilité de ces molécules engendre une faible biodisponibilité et une diminution des effets thérapeutiques *per os*, notamment en raison de leur excrétion du tractus gastro-intestinal avant totale dissolution, et premier passage intestinal. Augmenter la solubilité de ces principes actifs est un enjeu crucial. Cela passe par le recours à une formulation adéquate afin d'administrer la dose suffisante lors des essais (pré)cliniques en vue de la mise sur le marché.

⁷⁶ Chen, R.; Wang, T.; Song, J.; Pu, D.; He, D.; Li, J.; *et al.* Antiviral Drug Delivery System for Enhanced Bioactivity, Better Metabolism and Pharmacokinetic Characteristics. *Int. J. Nanomedicine*. **2021**, *16*, 4959–4984.

⁷⁷ Takalani, F.; Kumar, P.; Kondiah, P. P. D.; Choonara, Y. E.; Pillay, V. Lipid–Drug Conjugates and Associated Carrier Strategies for Enhanced Antiretroviral Drug Delivery. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 267–280.

⁷⁸ Bhalani, D. V.; Nutan, B.; Kumar, A.; Singh Chandel, A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. **2022**, *10*, 2055.

6.2. Stratégies pour augmenter la solubilité de la classe II

La biodisponibilité et l'efficacité thérapeutique d'un principe actif sont directement liées à sa solubilité. Pour les molécules peu solubles, une simple variation de la dissolution du principe actif peut affecter sa biodisponibilité et donc diminuer son activité. C'est pourquoi, afin d'augmenter la solubilité des agents thérapeutiques de classe II, différentes stratégies de nature chimiques ou physiques, ont été explorées^{78,79} (Figure 28).

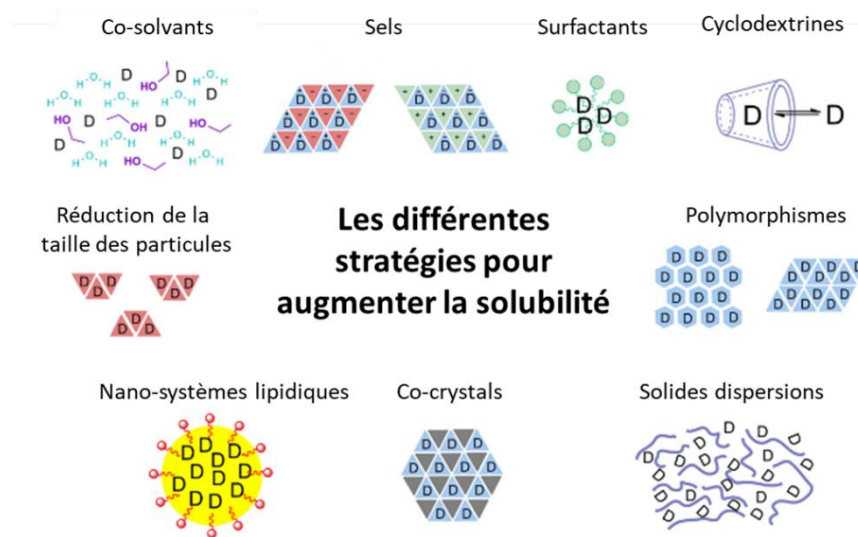


Figure 28 : Les stratégies communément utilisées pour augmenter la solubilité de principes actifs hydrophobes⁷⁹

Un système de délivrance de médicaments doit permettre :

- ✓ L'encapsulation du principe actif à la concentration efficace adéquate sans engendrer de toxicité ou d'effets indésirables majeurs.
- ✓ Le recours à la voie d'administration optimale : orale ou parentérale (pour un fluide à faible viscosité), topique ou orale (pour un fluide visqueux) ou orale (pour une poudre, une capsule ou une pilule).
- ✓ La protection de la molécule active face aux dégradations susceptibles d'advenir durant le transport, le stockage et lors de l'administration jusqu'à sa cible biologique.
- ✓ L'augmentation de la perméabilité de la molécule active en l'aidant à passer les membranes biologiques.
- ✓ De véhiculer le médicament jusqu'à sa cible, parfois même en contrôlant et en régulant son relargage.

Les systèmes lipidiques sont les systèmes de délivrance les plus répandus (Figure 29) car ils sont généralement faciles à développer et à mettre en œuvre, biocompatibles, biodisponibles et

⁷⁹ Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; *et al.* Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 315–499.

possèdent une capacité de chargement en médicaments très variée. De plus, les propriétés physico-chimiques de ces systèmes peuvent être aisément contrôlées afin de moduler la libération du principe actif. C'est pour ces raisons que les systèmes nano-lipidiques représentent la classe de nano-transporteurs la plus approuvée par la FDA.

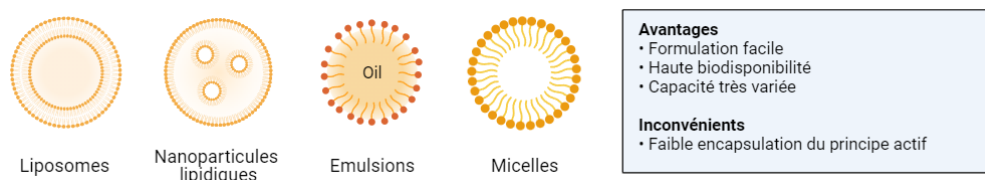


Figure 29 : Différents systèmes lipidiques

Parmi ces systèmes, nous pouvons citer les micelles polymériques ou bien les émulsions qui ont fait l'objet d'études d'encapsulations d'antiviraux ou de dérivés nucléosidiques. Pour exemple, Guareschi *et al.*⁸⁰ ont développé un spray nasal pour la délivrance de la cyclosporine, qui a été incorporée dans des micelles de α -tocophéryl-polyéthylène-glycol succinate, pour traiter les infections au SARS-CoV-2. En 2014, Sawdon *et al.*⁸¹ ont synthétisé une prodrogue micellaire pour la délivrance de l'aciclovir à base de chitosane ou de méthoxy poly(éthylène glycol). Concernant les émulsions, Nemade *et al.*⁸² ont encapsulé le Ténofovir dans une nanoémulsion pour une administration par voie nasale afin de délivrer le Ténofovir directement dans le cerveau dans le cadre des infections au VIH. Brouillard *et al.*⁸³ ont également reporté des nanoémulsions pour l'encapsulation, la protection et la délivrance par voie intraveineuse de dérivés nucléosides lipophiles. Une revue récente⁸⁴ présente des exemples de nanoémulsions utilisées dans le traitement de différents virus tels que les Hépatites B et C, le VIH ou encore les virus de l'herpès.

Ainsi, les travaux de cette thèse porteront sur les études pré-cliniques d'un ANP sous forme de prodrogue et le développement d'une formulation innovante permettant la vectorisation et la délivrance d'un ANP.

⁸⁰ Guareschi, F.; Del Favero, E.; Ricci, C.; Cantù, L.; Brandolini, M.; Sambri, V.; *et al.* Cyclosporine A Micellar Nasal Spray Characterization and Antiviral Action against SARS-CoV-2. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2024**, *193*, 106673.

⁸¹ Sawdon, A. J.; Peng, C.-A. Polymeric Micelles for Acyclovir Drug Delivery. *Colloids Surf., B.* **2014**, *122*, 738–745.

⁸² Nemade, S. M.; Kakad, S. P.; Kshirsagar, S. J.; Padole, T. R. Development of Nanoemulsion of Antiviral Drug for Brain Targeting in the Treatment of Neuro-AIDS. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2022**, *11*, 138.

⁸³ Brouillard, M.; Kinet, R.; Joyeux, M.; Dehay, B.; Crauste-Manciet, S.; Desvergnès, V. Modulating Lysosomal pH through Innovative Multimerized Succinic Acid-Based Nucleolipid Derivatives. *Bioconjug. Chem.* **2023**, *34*, 572–580.

⁸⁴ Franklyne, J. S.; Gopinath, P. M.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Nanoemulsions: The Rising Star of Antiviral Therapeutics and Nanodelivery System—Current Status and Prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2021**, *54*, 101458.

7. « Objectifs de la thèse »

Les travaux développés au cours de cette thèse sont présentés en deux grandes parties. La première partie s'inscrit dans les étapes d'une étude pré-clinique du LAVR-289, un ANP sous forme de prodrogue. La seconde partie concerne le développement d'un système de libération du ténofovir (sous sa forme phosphonate libre), en utilisant la technologie de l'impression moléculaire, qui servira de modèle pour les ANPs notamment pour la forme phosphonate libre du LAVR-289.

➤ Partie 1 : Etude du LAVR-289

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que le LAVR-289, isomère de configuration *Z*, est une molécule très active avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire sur un grand nombre de virus à ADN. La synthèse n'étant pas diastéréosélective, elle conduit à un mélange 1/1 d'isomère *Z/E* avant purification. La synthèse permettant d'obtenir le mélange 1/1 à l'échelle de quelques grammes a été développée précédemment, mais l'obtention du LAVR-289 (isomère *Z* et pureté > 95%) à l'échelle du gramme nécessite une purification fractionnée et laborieuse. Ainsi, notre premier objectif a été de mettre en place une méthode de suivi analytique HPLC-UV, permettant d'estimer la pureté des lots de synthèse en isomère *Z* par rapport à l'isomère *E* après purification (Figure 30).

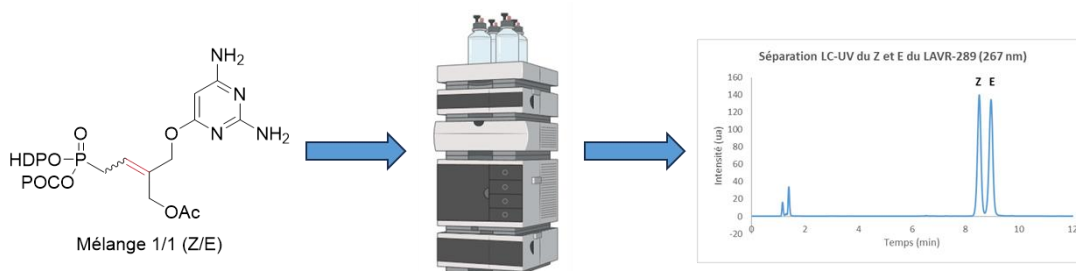


Figure 30 : Méthode analytique séparant les isomères *Z* et *E* du LAVR-289

La méthode analytique développée a permis d'étudier la stabilité chimique et enzymatique de cette molécule ainsi que d'identifier et caractériser plusieurs produits de dégradation et métabolites (Figure 31).

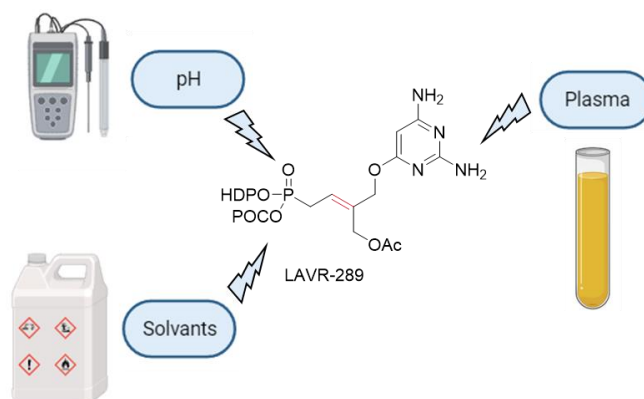


Figure 31 : Etudes des différentes stabilités

Dans un second temps, travaillant sur des masses faibles de produit Z (pureté > 95%, < 100 mg) disponibles, les paramètres physico-chimiques tels que le pKa, le Log P et la concentration d'agrégation critique ont été déterminés afin de nous aider dans le choix d'une formulation (Figure 32).

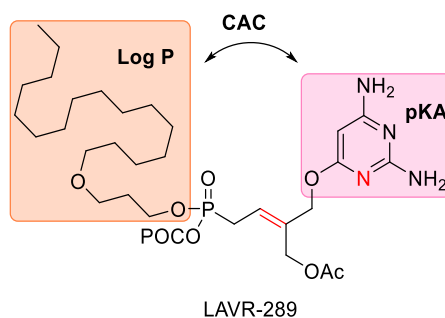


Figure 32 : Paramètres physico-chimiques déterminés

➤ Partie 2 : Développement de polymères à empreintes moléculaires

Les précédents travaux du laboratoire ont permis de développer différents polymères à empreintes moléculaires comme système de délivrance d'un analogue nucléosidique, la ribavirine. L'obtention de la forme phosphonate libre du LAVR-289 étant chimiquement difficile, nous avons choisi de travailler sur le ténofovir pris comme modèle et commercialement disponible.

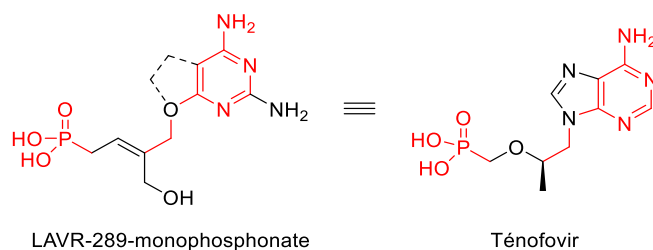


Figure 33 : Ressemblances structurales entre le LAVR-289-monophosphate et le ténofovir

Deux approches ont été développées pour la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires et seront présentées dans cette thèse :

- ✓ **La polymérisation par précipitation** (Figure 34) dans laquelle différents monomères commerciaux ou synthétisés au laboratoire vont être utilisés pour la complexation de la molécule empreinte par deux points d'accroche : la nucléobase et la fonction phosphonate. Dans un second temps, l'approche « dummy-template » a été exploitée afin de diminuer la polarité du ténofovir par l'utilisation d'un di-ester de phosphonate. Ici, la reconnaissance se fera uniquement *via* la nucléobase du ténofovir. La synthèse des monomères, des polymères ainsi que le tracé des isothermes d'adsorption et les études de libération seront discutés.

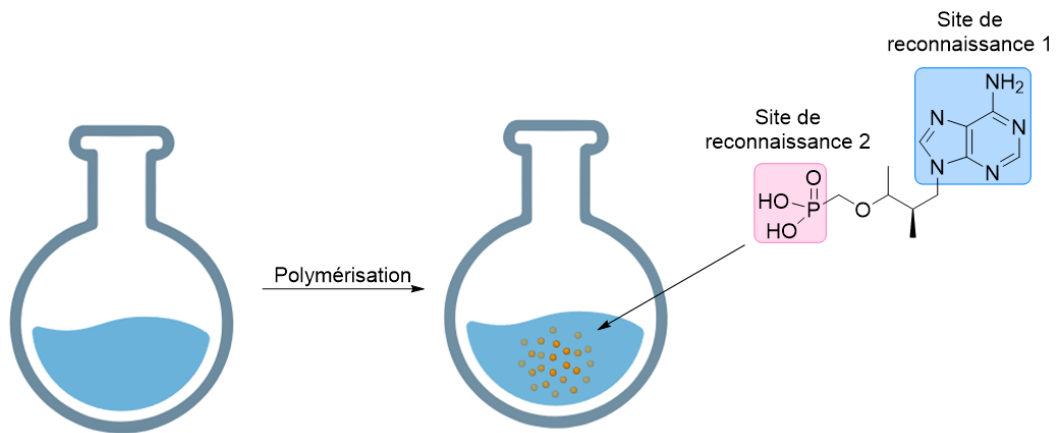


Figure 34 : Synthèse d'un MIP par précipitation

- ✓ **Un core-shell imprimé (Figure 35)** a été développé avec un « cœur » polydopamine. Le choix et la synthèse de la polydopamine, sa dérivation de surface par des dérivés de l'uracile, synthétisés au laboratoire, ainsi que la synthèse des différents core-shell seront présentés et discutés.

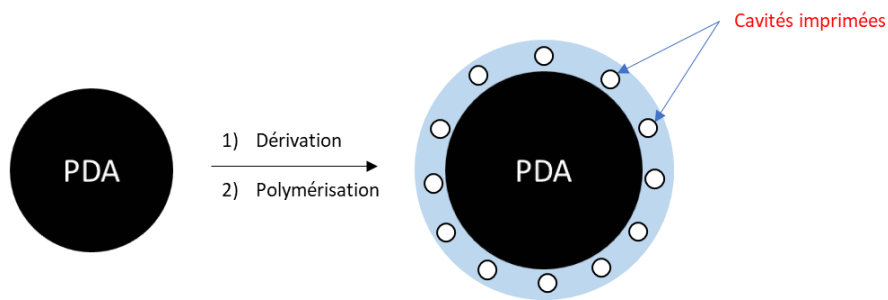


Figure 35 : Synthèse d'un core-shell-imprimé moléculairement

Chapitre 2 : Etudes préliminaires du LAVR-289 et détermination de ses paramètres physico-chimiques

1. Le LAVR-289, un antiviral à large spectre

1.1. Rappel sur la synthèse du LAVR-289

Le LAVR-289 a été synthétisé au sein de notre équipe à l'échelle de la centaine de milligrammes (thèse Dr M. Bessières⁵⁰), puis la synthèse a été optimisée à l'échelle du gramme (thèse Dr T. Abuduaini⁵¹). Cette molécule est obtenue par une approche convergente reposant sur une réaction de métathèse croisée entre un allyle phosphonate diester, portant les fonctions biolabiles **6**, et la nucléobase modifiée **10**.⁸⁵

Dans un premier temps, le dérivé HDP/POC allyle phosphonate **6** est préparé à partir du HDP-OH **3** et du diméthyle allyle phosphonate **4** (Schéma 1). Pour cela, le composé **3** est obtenu par la méthylation de l'hexadécanol **1** dans des conditions classiques suivie d'une substitution nucléophile par le 1,3-propanediol préalablement déprotoné en présence d'hydrure de sodium. En parallèle, le diméthyle allyle phosphonate **4** est activé avec le chlorure d'oxalyle puis substitué par l'HDP-OH **3**. Le groupement POC est ensuite introduit sélectivement à la place du groupement méthyle par réaction du chlorométhyl *isopropyl* carbonate (POCCI) et d'iodure de sodium dans l'acétonitrile pour conduire au synthon HDP/POC allyle phosphonate **6**.

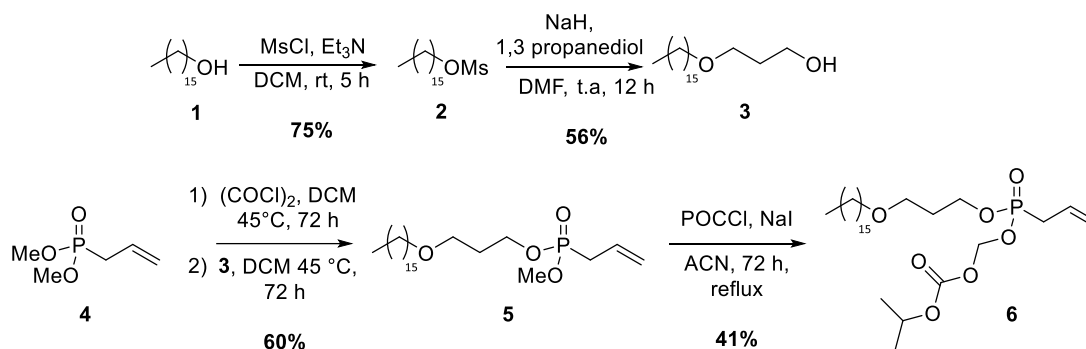


Schéma 1 : Synthèse du synthon HDP/POC allyle phosphonate

Dans un second temps, le précurseur énéoxy-pyrimidine-2-4-diamine a été synthétisé à partir de la 6-chloro-2,4-diaminopyrimidine **7** dans des conditions développées par Krawczyk *et al.*⁸⁶ La réaction de **7** avec le 2-méthylène-1,3-propanediol à chaud en présence de *tert*-butanoate de sodium (NaOtBu) permet d'obtenir la 2,4-diaminopyrimidine *O*-alkylée en position C6 (**8**). L'hydroxyle du composé **8** est ensuite acétylé *via* une réaction chémo-enzymatique, développée précédemment au laboratoire⁸⁷, en présence de la lipase B de *Candida Antarctica* (CAL-B) et d'acétate de vinyle. Enfin, les amines libres du

⁸⁵ Bessières, M.; Roy, V.; Abuduaini, T.; Favetta, P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; *et al.* Synthesis of LAVR-289, a New [(Z)-3-(Acetoxymethyl)-4-(2,4-Diaminopyrimidin-6-Yl)Oxy-but-2-Enyl]Phosphonic Acid Prodrug with Pronounced Antiviral Activity against DNA Viruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *271*, 116412.

⁸⁶ Krawczyk, S. H. Nucleobase phosphonate analogs for antiviral treatment. WO2005012324, A2, 2005.

⁸⁷ Sari, O.; Hamada, M.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A. The Preparation of Trisubstituted AlkenylNucleoside Phosphonates under Ultrasound-Assisted Olefin Cross-Metathesis. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4390–4393.

composé **9** sont protégées par des groupements *tert*-butoxycarbonyle (Boc) pour conduire au synthon **10** (Schéma 2).

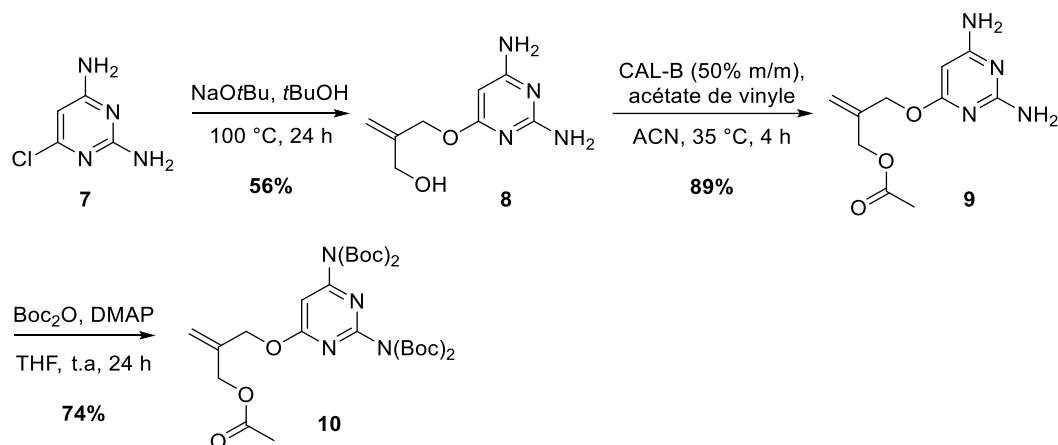


Schéma 2 : Synthèse du précurseur énéoxy-pyrimidine-2,4-diamine

L'étape clef de cette synthèse repose sur le couplage entre l'alcène **10** et l'allyle phosphonate **6**, réalisé dans des conditions de métathèse croisée (Schéma 3), sous ultrasons pendant 20 h à 55 °C. Le catalyseur au ruthénium de type NG-II est ajouté en 5 fois 3 mol %. Le produit attendu **11** est alors isolé sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères *Z* et *E* en proportions équivalentes, mais non séparables à cette étape. Après déprotection des amines par l'acide trifluoroacétique (TFA) dans du dichlorométhane (DCM), pendant trois heures à température ambiante, les isomères *Z* et *E* sont séparés par plusieurs colonnes chromatographiques sur gel de silice. Le composé **12a** de configuration *Z* correspond au LAVR-289.

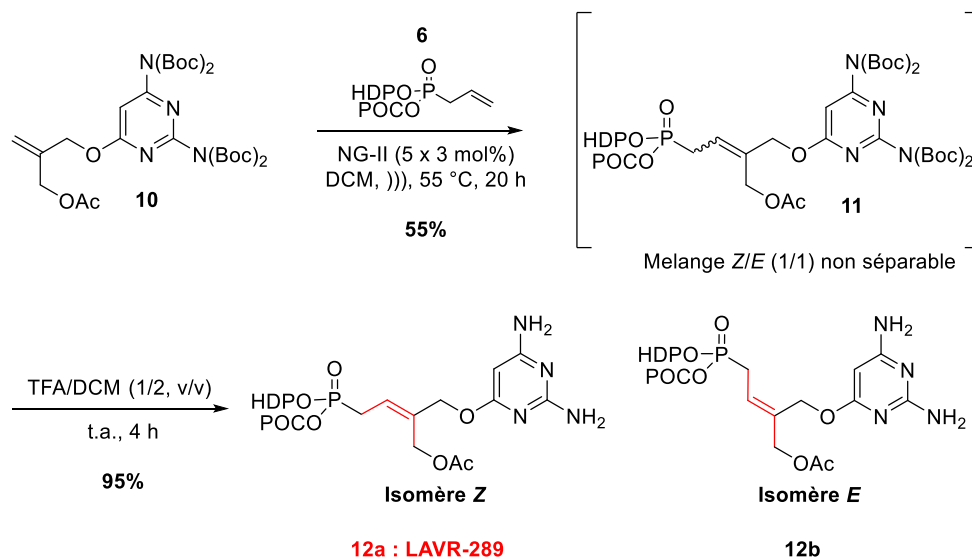


Schéma 3 : Métathèse croisée conduisant au LAVR-289

La configuration des deux isomères a pu être déterminée sans ambiguïté par des analyses RMN. L'analyse du spectre NOESY montre que les protons en α du phosphore ne corrélaient pas avec les mêmes protons en fonction de la configuration de la double liaison (Figure 36). De cette façon, en couplant cette analyse aux RMN ^1H , ^{13}C et HMBC, il a été possible de caractériser les deux isomères. La

connaissance de la configuration de l'isomère est d'une importance cruciale car seul le diastéréoisomère Z a montré des activités antivirales remarquables.

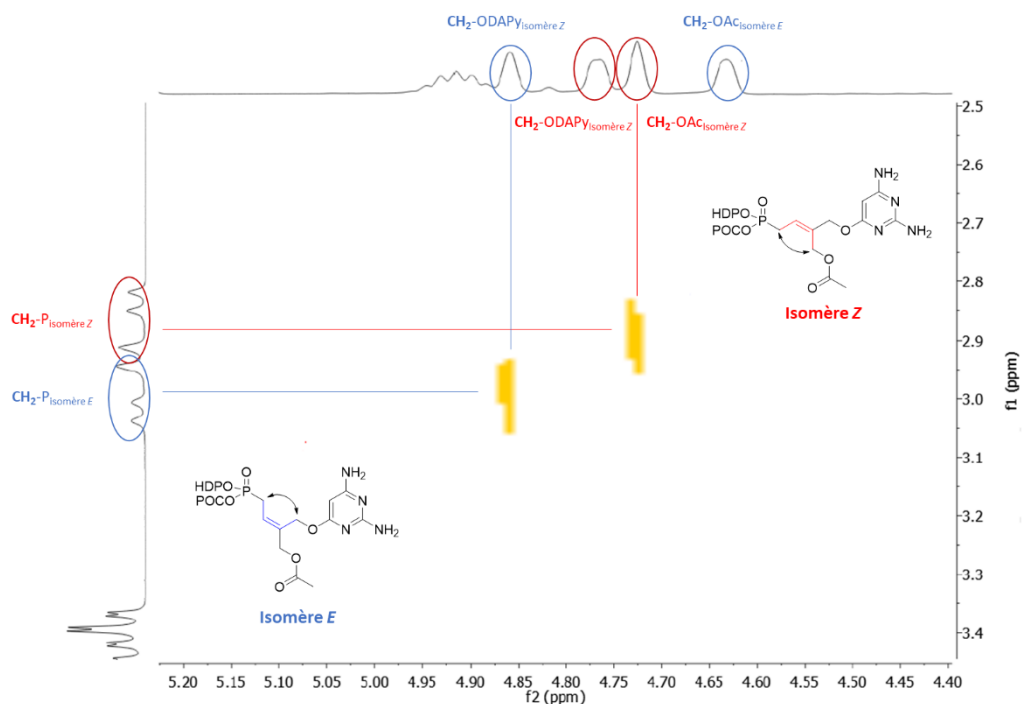


Figure 36 : Spectre NOESY d'un mélange Z/E du LAVR-289

Bien que la méthode de purification du LAVR-289 sur gel de silice ait permis d'isoler, à l'échelle de quelques dizaines de milligrammes, et de caractériser les isomères Z et E de cette molécule, celle-ci est peu adaptée pour une purification en une seule fois de plusieurs centaines de milligrammes ou grammes. En effet, sur CCM le rapport frontal entre les deux isomères est inférieur à 0,01 (Figure 37) ce qui indique que plusieurs colonnes sur gel de silice sont nécessaires afin d'appauvrir le plus possible en isomère E notre échantillon. Par exemple, plusieurs colonnes sur un échantillon brut de 1,8 g (Z/E, 1/1) permet d'obtenir environ 180 mg d'isomère Z, dont la teneur en E est d'environ 4%, soit un rendement de purification de 20%.

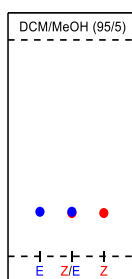


Figure 37 : Plaque CCM des deux isomères Z et E du LAVR-289

La montée en échelle étant l'un des critères primordiaux dans une démarche de développement pré-clinique, de nouvelles conditions de purification ou la mise au point d'une synthèse stéréosélective reste à trouver.

1.2. Données antivirales

L'activité antivirale et la toxicité du LAVR-289 ont été mesurées sur différents virus à ADN et ARN en collaboration avec les équipes du Pr. G. Andréi et Pr. R. Snoeck (Rega institut – Leuven, Belgique), du Dr J. Moffatt (NIH – SUNY University, USA), du Dr F. Gallardo (Néovirtech –Toulouse) et du Pr. D. Brand (Université de Tours – Tours).

Le Tableau 4 compare les résultats du LAVR-289⁵² avec d'autres antiviraux pris comme références. Notre molécule possède une IC₅₀ de l'ordre de quelques nanomolaires sur plusieurs virus à ADN. Il est important de souligner que ce composé possède une activité sur les lignées cellulaires VZV-TK⁺ et TK⁻ de 6 et 7 nM, respectivement. Il est à noter que la brivudine (BVDU) est l'un des composés les plus puissants dans le traitement des VZV mais, contrairement au LAVR-289, elle n'est active au nM que sur les lignées TK⁺ (IC₅₀ = 10 nM contre 117 µM pour TK⁻), rendant le LAVR-289 1000 fois plus actif. De même, le LAVR-289 est 10 fois plus actif que le cidofovir sur le HCMV et est l'un des seuls composés ayant une activité sur le MPXV (virus de la variole du singe). Enfin, le LAVR-289 est 4 fois plus actif sur le virus de l'herpès équin que le ganciclovir, médicament standard dans le traitement des virus de l'herpès.

Tableau 4 : Quelques données antivirales du LAVR-289 en comparaison avec d'autres antiviraux

Composés	IC ₅₀ (nM)						
	HCMV TB40	HSV-1	HSV-2	VZV TK ⁺	VZV TK ⁻	MPXV	EHV1
LAVR-289	35	200	200	7	6	300	50
Cidofovir	1300	3000	6500	500	-	-	-
Aciclovir	> 200.10 ³	3800	4400	3600	> 20.10 ³	-	-
Ganciclovir	3800	700	2500	1300	-	-	184

Des essais *in vivo* sur les souris infectées par le VZV, menés par le groupe du Dr Moffat, montrent que 26 mg/kg de LAVR-289, permettent de bloquer la propagation du virus sans engendrer de toxicité apparente (Figure 38).

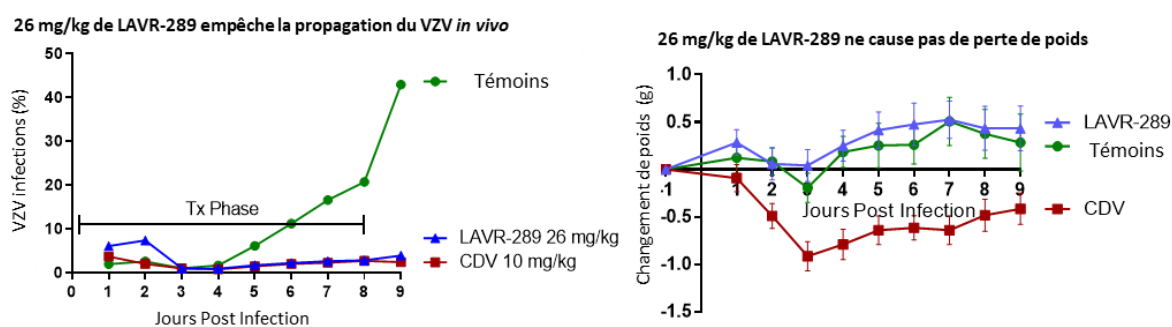


Figure 38 : Résultats *in vivo* du LAVR-289 sur des souris infectées par le VZV

Enfin, la Figure 39 illustre l'effet du LAVR-289 sur des cellules infectées par le virus de la vaccine (modèle de la variole). Les cellules infectées, traitées avec ce composé, 48h post-infection (PI),

montrent clairement une disparition des virions de la vaccine (test réalisé par la technologie Anchor® développée par la société Néovirtech). Ces résultats remarquables donnent à ce composé un fort intérêt comme contre-mesure médicale dans le cas d'une infection à la variole (poxvirus).

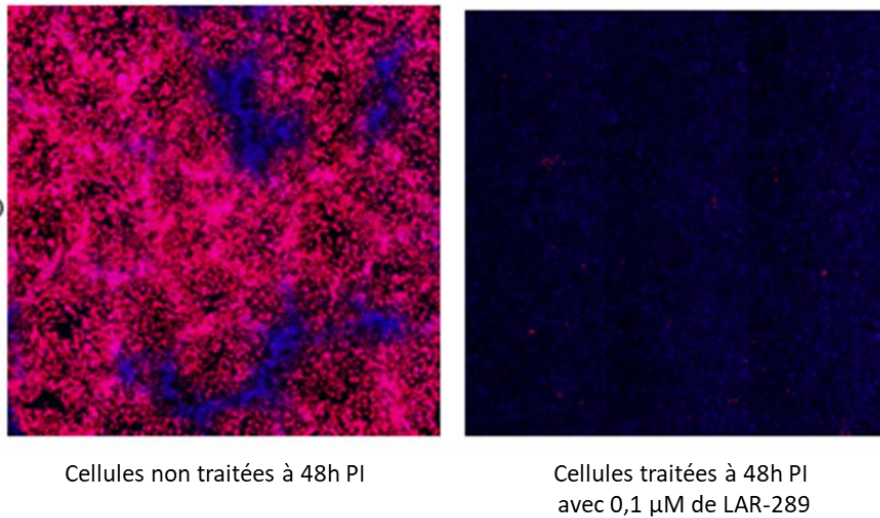


Figure 39 : Inhibition de la réplication du virus de la vaccine par le composé LAR-289

1.3. Caractéristiques de la structure

L'étude précise de la structure du LAR-289 dans une démarche de développement préclinique, a permis de fixer plusieurs objectifs quant à la détermination de ses paramètres physico-chimiques et d'émettre plusieurs hypothèses quant à sa stabilité chimique.

➤ Méthodes analytiques

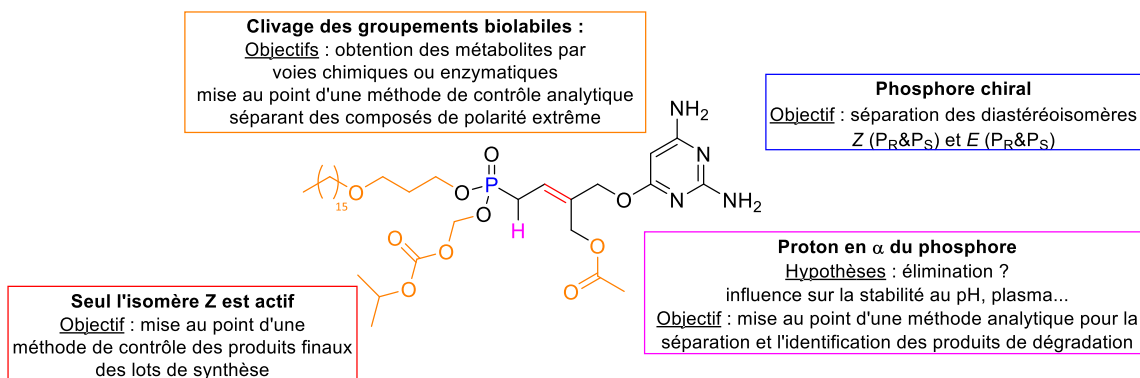


Figure 40 : Identification des verrous analytiques

- ✓ Seul l'isomère Z étant actif et sa purification étant difficile sur phase silice en phase normale, une méthode analytique, permettant de séparer les isomères Z et E, est nécessaire afin de quantifier les lots de synthèse. Il est important d'envoyer en test biologique un échantillon dont la pureté en isomère Z, rapportée à la somme de tous les composés détectés, est > 95%.
- ✓ La synthèse n'étant pas énantiosélective au niveau du phosphore chiral, celle-ci aboutit à la formation de 4 diastéréoisomères dont les proportions sont inconnues. Il serait intéressant de

séparer et de purifier les isomères Z,P_R (**12a**) et Z,P_S (**12b**) (Figure 41) afin d'évaluer leurs activités biologiques respectives et observer s'il existe une différence d'activité antivirale significative. Il faudrait également pouvoir mesurer le ratio des isomères P_R et P_S dans plusieurs lots de synthèse afin de suivre son éventuelle variation. Pour effectuer ce dernier suivi, les stéréoisomères P_R et P_S de la forme Z du LAVR-289 devraient être disponibles purs, et cristallisés afin de déterminer leur configuration. L'analyse de chaque isomère de configuration connue permettra d'identifier leur pic chromatographique dans la méthode séparative mise au point.

- ✓ Le proton en α du phosphore peut être responsable de produits d'élimination en fonction des conditions acido-basiques du milieu dans lequel il est placé (stabilité chimique).
- ✓ La molécule possède trois groupements biolabiles : Les groupements POC et acétate peuvent être clivés en milieux intra- et extracellulaires par des estérases tandis que le groupement HDP n'est clivable qu'en milieu intracellulaire par la phospholipase C. Il sera donc nécessaire d'obtenir les molécules (**14a**, **14b**, **15**, **16** et **17**) générées par la perte des groupements biolabiles, (Figure 41) et de les caractériser pour les utiliser comme standards analytiques. La difficulté ici réside dans le fait de pouvoir, sur un même chromatogramme, séparer des composés très hydrophobes comme le LAVR-289, et des composés très polaires comme le phosphonate **17**. Ce composé est supposé être la forme libérée en intracellulaire qui sera alors substrat de nucléosides kinases pour être convertie en dérivé phosphonate monophosphate **18** (analogue d'un nucléoside diphosphate) puis en phosphonate diphosphate **19** (analogue d'un nucléoside triphosphate). Ce dernier est théoriquement la forme active qui va s'incorporer dans l'ADN (Figure 41).

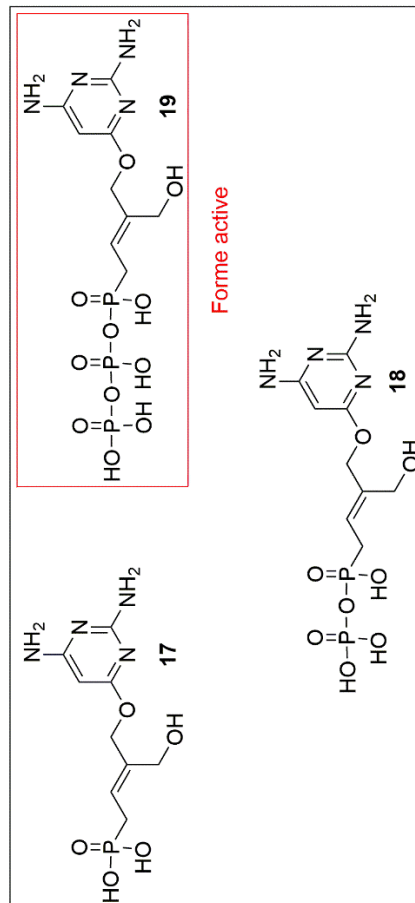
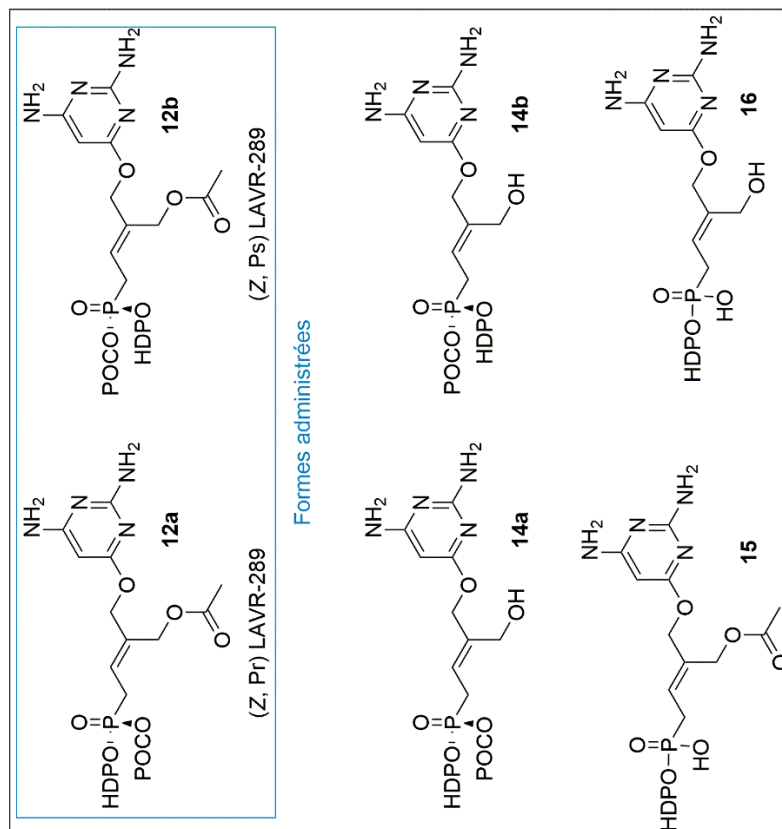


Figure 41 : Structures des métabolites intra- et extracellulaires théoriques du LAVR-289

➤ Paramètres physico-chimiques

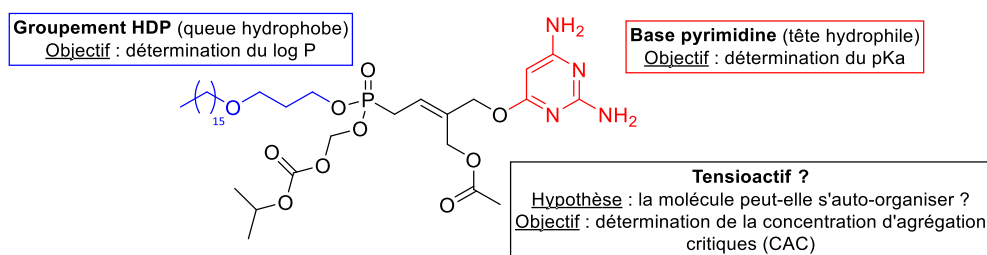


Figure 42 : Identification des paramètres physico-chimiques liés à la structure du composé d'intérêt

- ✓ Selon la BCS, cette molécule appartient à la classe II (faible solubilité, haute perméabilité). En effet, le groupement HDP, confère à la molécule une très faible solubilité aqueuse mais une perméabilité très élevée en raison de sa longue chaîne alkyle. La détermination de son hydrophobie, par la mesure de son descripteur moléculaire Log P, fournira des informations essentielles quant à sa formulation.
- ✓ La base 2,4-diaminopyrimidine montrant des sites protonables, la connaissance des pKa des azotes permettra de choisir un contre-ion adéquat pour la création éventuelle d'un sel dans le cadre de la formulation.
- ✓ Le caractère amphiphile de la molécule (une base pyrimidine polaire possiblement ionisée associée à un groupement HDP hydrophobe au sein de la molécule) peut l'apparenter à un tensioactif. Celle-ci pourrait ainsi s'autoorganiser en milieu aqueux. Par exemple les travaux de Couvreur *et al.*⁸⁸ ont montré que la dérivation de nucléosides, comme la gemcitabine muni d'un motif squalène (Figure 43), permettait à ces derniers de s'autoassembler dans l'eau sous forme de nano-objets présentant une taille comprise entre 100 et 300 nm. La concentration d'agrégation critique ou CAC du LAVR-289 sera déterminée par spectroscopie de fluorescence.

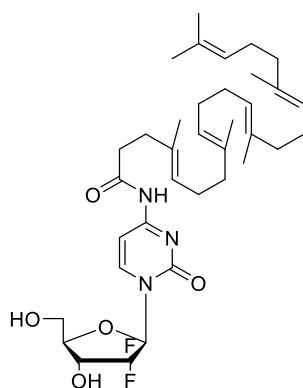


Figure 43 : Structure de la gemcitabine-squalène

⁸⁸ Couvreur, P.; Stella, B.; Reddy, L. H.; Hillaireau, H.; Dubernet, C.; Desmaële, D.; *et al.* Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2544–2548.

2. Méthodes analytiques

2.1. Mise en place d'une méthode analytique

Comme mentionné précédemment, la synthèse du LAVR-289 aboutit à la formation de deux isomères dont la séparation classique en synthèse organique sur gel de silice est difficile. Afin de vérifier la pureté en isomère *Z* de chacun des lots de synthèse, une méthode analytique HPLC-UV a été développée. Pour mettre au point cette technique d'analyse, plusieurs paramètres sont à déterminer : les longueurs d'ondes maximales d'absorbance, la colonne analytique optimale et les conditions d'élution.

Tout d'abord, il a donc été nécessaire de réaliser le spectre UV du LAVR-289 afin de connaître ses longueurs d'onde maximales d'absorbance (Figure 44). Ce spectre UV a été acquis sur le spectromètre Shimadzu UV-1800 équipé d'un double faisceau. Le spectre UV du LAVR-289 a été réalisé à partir d'une solution méthanolique à $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans des cuves en quartz de 2 mL. Ce spectre a mis en évidence deux longueurs d'onde maximales d'absorbance, à 267 nm (la plus intense) et à 230 nm. Ces deux longueurs d'onde sont caractéristiques d'une 2,4-diaminopyrimidine présentant une fonction éther en position 6. En effet, Roth *et al.*⁸⁹ ont rapporté les longueurs d'ondes maximales d'absorbance de plusieurs dérivés 2,4-diamino-6-substitué. Parmi ceux-ci, seules la 6-méthoxy-2,4-diaminopyrimidine et la 6-phénoxy-2,4-diaminopyrimidine présentent les deux longueurs d'ondes maximales d'absorbance que nous avons observées pour notre composé. Les parties chromophores de la molécule étant portées par le noyau pyrimidine, les isomères *Z* et *E* présentent le même spectre UV.

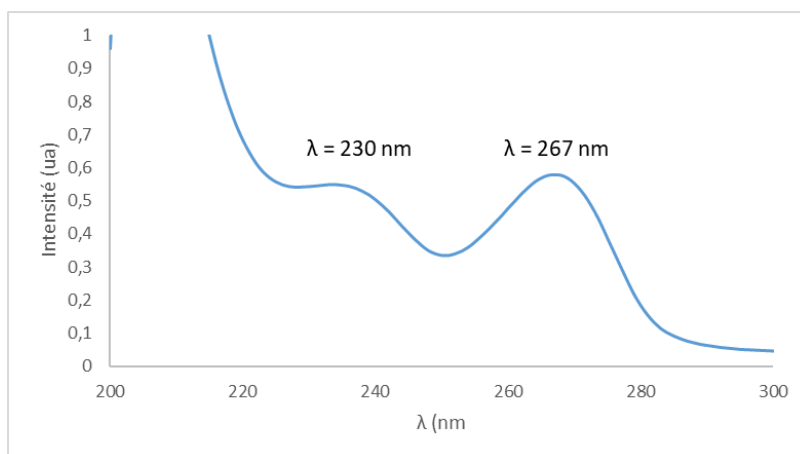


Figure 44 : Spectre UV du LAVR-289 dans le méthanol

Dans le but de mesurer les coefficients d'extinction molaire du LAVR-289 à 267 et 230 nm, l'absorbance de plusieurs solutions de ce composé à différentes concentrations, dans le méthanol, a été mesurée (Tableau 5).

⁸⁹ Roth, B.; Strelitz, J. Z. Protonation of 2,4-Diaminopyrimidines. I. Dissociation Constants and Substituent Effects. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 821–836.

D'après la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon * l * C \quad (\text{Eq. 1})$$

où A est l'absorbance, l la largeur de la cuve (ici 1 cm), C la concentration en mol.L⁻¹ et ε le coefficient d'extinction molaire en L.mol⁻¹.cm⁻¹. En traçant l'absorbance en fonction de la concentration (Figure 45), ε peut être mesuré et correspond à la pente de la droite. Nous trouvons expérimentalement que les coefficients d'extinction molaire du LAVR-289 dans le méthanol à 267 nm et 230 nm sont 8554 L.mol⁻¹.cm⁻¹ et 7975 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectivement.

Tableau 5 : Absorbances du LAVR-289 à 230 et 267 nm à différentes concentrations

Concentration (mol.L ⁻¹)	Absorbance à 267 nm	Absorbance à 230 nm
1,25.10 ⁻⁴	1,058	0,984
6,30.10 ⁻⁵	0,540	0,504
3,15.10 ⁻⁵	0,288	0,273
1,58.10 ⁻⁵	0,159	0,15
6,30.10 ⁻⁶	0,070	0,077
1,26.10 ⁻⁶	0,023	0,032
6,30.10 ⁻⁷	0,014	0,019
1,26.10 ⁻⁷	0,007	0,005

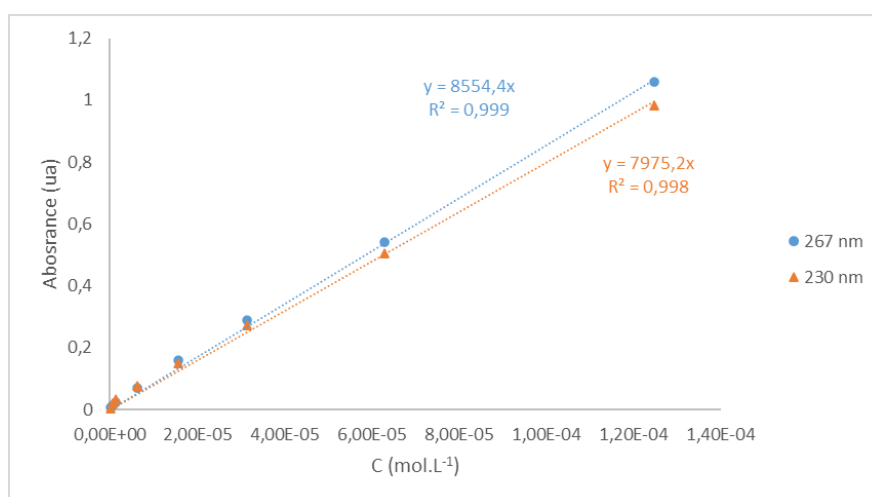


Figure 45 : Gamme d'étalonnage UV du LAVR-289 à 230 et 267 nm

Dans un premier temps, l'analyse du composé a été effectuée en phase inverse par l'utilisation d'une colonne Kromasil® C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Le choix s'est porté sur cette colonne car cette phase stationnaire est très utilisée dans le domaine pharmaceutique et offre une très grande variété de dimensions de colonne, facilitant ainsi la transposition de l'échelle analytique, HPLC-UV et l'UPLC-MS, pour la détermination de métabolites, à l'échelle semi-préparative pour la purification des produits. De plus, des colonnes chromatographiques de type semi-préparatives remplies de cette phase stationnaire sont disponibles commercialement. Ce fait nous permettrait de purifier aisément les deux isomères en chromatographie de polarité de phase inversée de façon transposable. Ce qui serait une alternative aux purifications, en phase normale, sur gel de silice rendues assez difficiles sur colonne

remplies ou par chromatographie flash. Les colonnes de type Kromasil® sont également connues pour montrer une stabilité chimique importante aussi bien aux pH acide que basique. La colonne C18 présente une distribution de tailles de particules < 1,55, une densité de 0,66 g/mL et un taux de greffage de 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ qui lui donne une hydrophobie très élevée et une faible activité silanolique.

La séparation des isomères a été réalisée avec une phase mobile ACN/H₂O (85/15, v/v), une température de 40 °C, un débit de 1,5 mL/min et en suivant l'absorption de la phase mobile à la longueur d'onde de 267 nm (Figure 46). Dans ces conditions, le temps de rétention des isomères Z et E est relativement élevé (facteur de rétention $k > 10$). Ce temps d'élution à un débit de 1,5 mL/min s'avère trop long. D'autant plus, par la suite, des produits de dégradation présenteront une hydrophobie plus élevée que le LAVR-289 et ne pourront être élués de cette colonne qu'après un « step-gradient » à 100% d'acétonitrile. Dans ces conditions, les analyses se sont avérées trop chronophages.

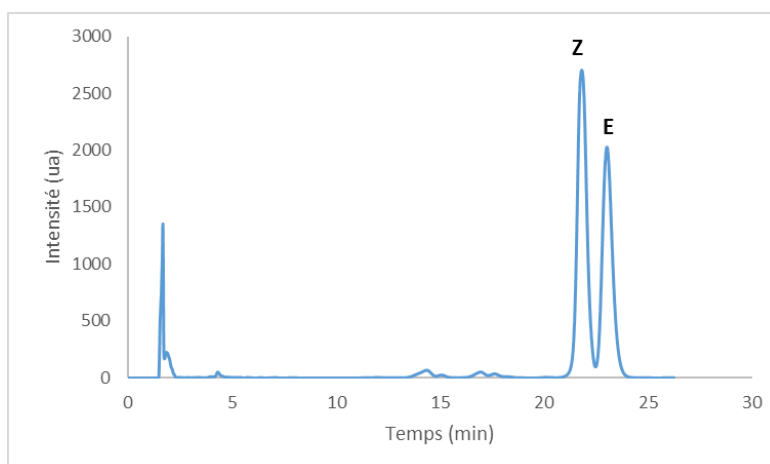


Figure 46 : Séparation LC-UV des isomères Z et E du LAVR-289 sur la colonne Kromasil® (267 nm)

L'utilisation d'une colonne Poroshell Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μm), a permis la séparation des isomères Z et E dans des conditions plus satisfaisantes qu'avec la phase stationnaire Kromasil® C18. L'utilisation d'une phase mobile composée d'ACN/H₂O (72/28, v/v) à un débit de 0,3 mL/min et à une température de 40 °C permet de séparer les deux isomères en moins de 10 minutes, ($t_{r-Z} = 8,51$ min, $t_{r-E} = 8,95$ min) (Figure 47). De plus, cette colonne a permis d'éluer des composés plus apolaires que le LAVR-289 en restant en mode isocratique tout au long de l'analyse (cf. paragraphe 2.2).

Cette colonne a été choisie car, ayant des particules de type core-shell de 2,7 μm , elle est adaptable pour une utilisation aussi bien en HPLC qu'en UPLC. Elle supporte une large gamme de pH compris entre 2 et 9. La surface spécifique est de 180 m^2/g , la taille des pores des particules est de 120 Å et le taux de carbone dû à ces greffons est de 9,5% (ce qui rend cette phase stationnaire moins hydrophobe que la Kromasil® C18, diminuant ainsi la rétention des composés analysés). De plus, cette phase supporte une pression maximale de 600 bars. L'utilisation de cette colonne comparée à une colonne totalement poreuse permet donc de diminuer le temps d'analyse tout en conservant la séparation. Par

ailleurs, les colonnes possédant une fonction polaire incorporée dans la chaîne alkyle servant de greffon présentent l'avantage de générer des interactions hydrophobes avec les analytes, comme avec les phases octadécyles ou octyles. Elles permettent également de couvrir les interactions secondaires non souhaitées avec les silanols résiduels, et/ou d'établir des interactions polaires, Keesom ou liaison hydrogène, avec les analytes afin d'améliorer la sélectivité entre ces derniers.⁹⁰

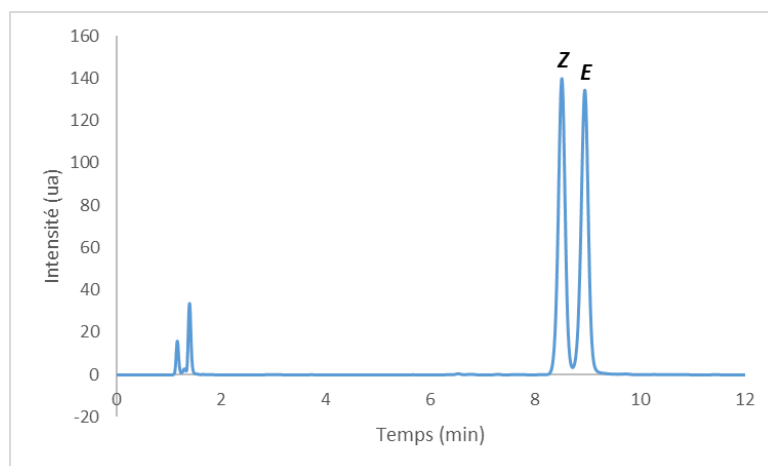


Figure 47 : Séparation LC-UV des isomère Z et E du LVR-289 sur la colonne Bonus RP (267 nm)

La détermination des temps de rétention de chaque isomère a été effectuée par l'analyse d'un échantillon appauvri en isomère E obtenu après plusieurs purifications par chromatographie sur gel de silice (Figure 48). Cette analyse a permis de déterminer que l'isomère Z est élué plus rapidement que l'isomère E. Ces conditions analytiques permettent de séparer, de manière satisfaisante ($\alpha = 1,05$, $R = 1,75$), les deux isomères résultant de la synthèse du LVR-289. Cette méthode a été utilisée lors des études de stabilité.

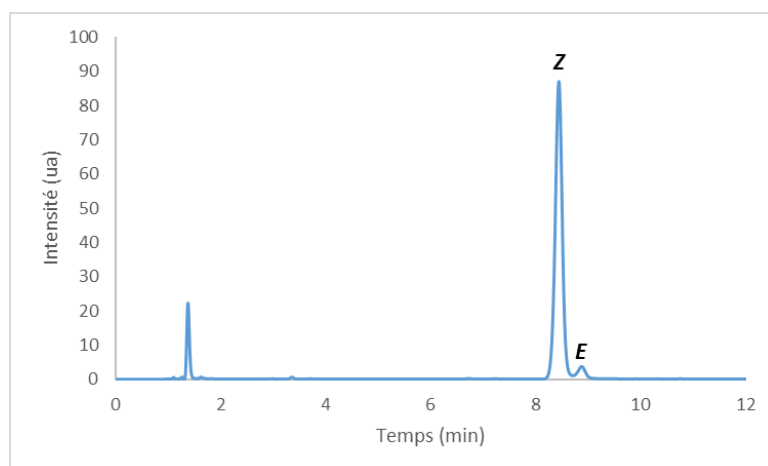


Figure 48 : Chromatogramme LC-UV du LVR Z-majoritaire (267 nm)

⁹⁰ Layne, J. Characterization and Comparison of the Chromatographic Performance of Conventional, Polar-Embedded, and Polar-Endcapped Reversed-Phase Liquid Chromatography Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2002**, 957, 149–164.

2.2. Identification de deux impuretés

L'analyse de routine des lots de synthèse a mis en évidence la présence quasi-systématique de deux molécules issues de la dégradation du LAVR-289. En effet, lors de leur analyse par HPLC-DAD-UV, aux deux longueurs d'onde d'absorbance du LAVR-289 (230 et 267 nm), deux pics chromatographiques supplémentaires, ne présentant pas de co-élution partielle avec les deux isomères, ont été observés sur le chromatogramme (Figure 49) : à 267 nm, un composé très polaire **20** n'étant pas retenu dans nos conditions d'analyse a été mis en évidence. De même, un composé plus apolaire **21** ayant un temps de rétention de 18 min a également été visualisé à la longueur d'onde de 230 nm.

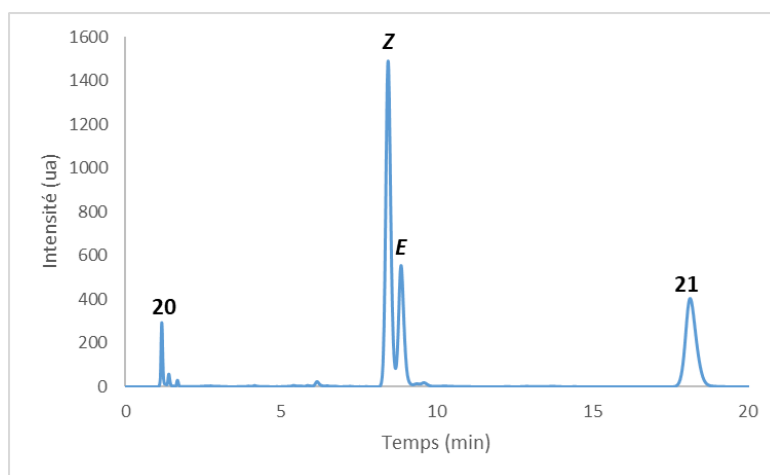


Figure 49 : Chromatogramme d'un mélange d'isomères Z/E (65/35) à 230 nm

En se basant sur les spectres UV des produits de dégradation, nous avons pu émettre une hypothèse sur leur structure. Nous avons pu remarquer que le composé **20**, de polarité très élevée, présentait la même longueur d'onde maximale d'absorption, à 267 nm, que le LAVR-289, caractéristique du noyau pyrimidique. En revanche, son absorbance à 230 nm (tracé orange sur la Figure 50) est très peu marquée, ce qui laisse penser que la fonction de substitution en position 6, de type éther, n'est plus constitutive de sa structure. Ainsi, tout l'enchaînement atomique incluant la double liaison jusqu'à la chaîne HDP ne fait plus partie de la structure de ce composé, ce qui lui attribue une polarité élevée étant donné la présence quasi-exclusive de la partie pyrimidine dans son squelette. *A contrario*, le composé **21** n'absorbe pas à 267 nm mais présente une absorption maximale à une longueur d'onde de 230 nm (tracé vert sur la Figure 50), notamment caractéristique d'un système diénique comprenant éventuellement la fonction alcène initialement présente. Le composé **21** ne possède donc pas de noyau aromatique de type pyrimidique au sein de sa structure moléculaire, mais doit avoir conservé la partie hydrophobe du LAVR-289 (comprenant la double liaison, la fonctionnalité phosphonate et la chaîne alkyle HDP). Les composés **20** et **21** semblent donc provenir d'une coupure entre la base pyrimidique et la fonction alcène de la molécule de LAVR-289.

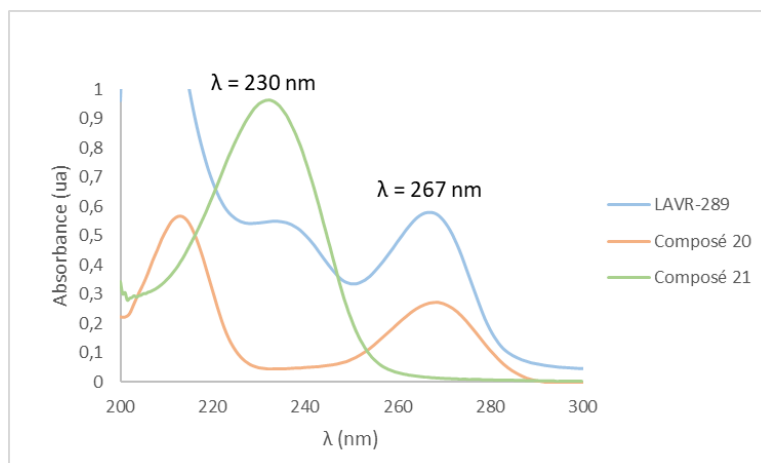


Figure 50 : Spectres UV du LAVR-289 et des produits de dégradation

En complément des spectres UV, les lots présentant ces deux composés ont été analysés en HRMS par infusion avec une source ESI en mode positif, en solution dans le méthanol. Les analyses ont indiqué que le composé **20** présentait un signal $[M+H]^+$ de masse exacte 127,0614 uma et une formule brute $C_4H_7N_4O$, alors que le composé **21** présentait un signal $[M+H]^+$ de masse exacte 605,3818 uma et une formule brute $C_{31}H_{58}O_9P$. A partir de la structure du LAVR-289, des spectres UV des différents composés élués, des analyses HRMS et en supposant les dégradations possibles de la molécule, nous sommes parvenus à identifier ces deux composés (Figure 51).

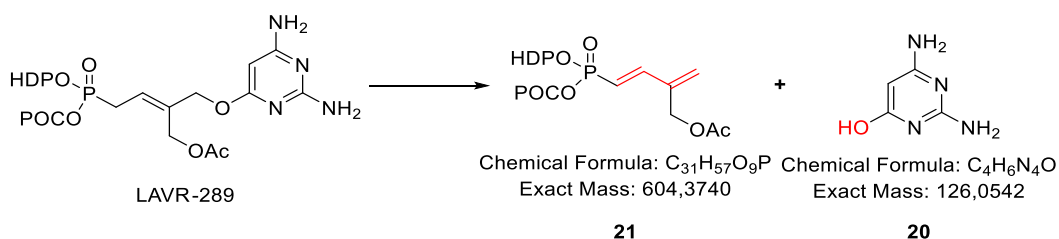


Figure 51 : Structures des produits de dégradation du LAVR-289

Le composé polaire **20** correspond à la 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine, que l'on nommera par la suite DAPy, tandis que le composé apolaire **21** est un « diène » comportant les 3 groupements biolabiles du LAVR-289 sans la base pyrimidine. En se basant sur la synthèse du LAVR-289 (voir partie 1.1), nous pouvons affirmer que ces composés ne sont pas des réactifs de synthèse. Afin de savoir comment et quand se forment ces impuretés, nous avons analysé le mélange réactionnel après l'étape de déprotection des groupements boc par le TFA avant et après neutralisation des cent équivalents de TFA par une solution de $NaHCO_3$ saturée. Ces analyses nous montrent la présence de ces deux molécules. De même, l'analyse du lot après un appauvrissement en isomère *E* par purification sur colonne chromatographique sur gel de silice montre également la présence de ces composés. En retrouvant ces composés, un de polarité élevée et l'autre très apolaire, après purification sur gel de silice, nous pouvons émettre l'hypothèse que la formation de ces produits provient d'une dégradation chimique/physique qui peut être liée à la température par exemple.

2.3. Mise au point du changement d'échelle pour purification HPLC semi-préparative du LAVR-289

2.3.1. Séparation du LAVR-289

La séparation et la purification chromatographique en phase normale sur gel de silice des isomères du LAVR-289 n'étant pas optimale, nous avons envisagé de les purifier sur colonne semi-préparative en phase inverse. La colonne Poroshell Bonus RP, utilisée au niveau analytique, n'existant pas en format semi-préparative, nous avons choisi une phase stationnaire de type silice greffée C18 (Zorbax XDB-C18) commercialement disponible aux formats analytique (150 x 2,1 mm, 5 µm) et semi-préparative (150 x 21,2 mm, 5 µm). Lors de l'optimisation de la surcharge sur la colonne analytique nous avons rencontré quelques difficultés :

- ✓ L'utilisation d'un gradient d'élution linéaire ne permet pas une séparation résolue en surcharge, malgré l'élution, en un temps minimal, de tous les composés injectés.
- ✓ L'analyse en mode isocratique conduit à un temps de rétention trop important pour le produit de dégradation (**21**) le plus hydrophobe.
- ✓ La présence de ce composé très apolaire implique soit un « step-gradient » après l'élution de l'isomère *E* en augmentant la proportion de modificateur organique à son maximum (100% en volume) : Le « diène » sera élué après plusieurs min mais il faudra attendre le ré-équilibre de la colonne avec la phase mobile initiale avant de pouvoir injecter de nouveau. Soit, après l'élution du dernier isomère, la proportion de modificateur ne change pas, mais le débit peut être augmenté pour éluer le dernier composé le plus apolaire en un temps le plus court possible. Or, la pression au cours de cette dernière étape va devenir très élevée et on va atteindre la pression maximale utilisable sur l'appareillage disponible (250 bars sur la HPLC semi-préparative). Par ailleurs, cet appareillage ne possédant pas de four colonne, la température ne pourra pas être un paramètre sur lequel intervenir pour diminuer la pression et les temps de rétention des composés. Malgré l'augmentation éventuelle du débit, la rétention du « diène » **21** restera conséquente. La consommation de solvant et donc le coût d'analyse est, dans tous les cas, très important par rapport à la masse récupérée d'isomère *Z*.

Le chromatogramme de la Figure 52 est un exemple des différents essais de surcharge réalisés. Celui-ci a été obtenu avec une phase mobile H₂O/ACN (20/80, v/v) pendant 20 min suivi d'un « step-gradient » à 100% d'ACN pendant 10 min, à un débit de 0,4 mL/min, une température de colonne fixée à 25 °C et un volume d'injection de 10 µL d'une solution de LAVR-289 dans le DMSO à 30 mg.mL⁻¹.

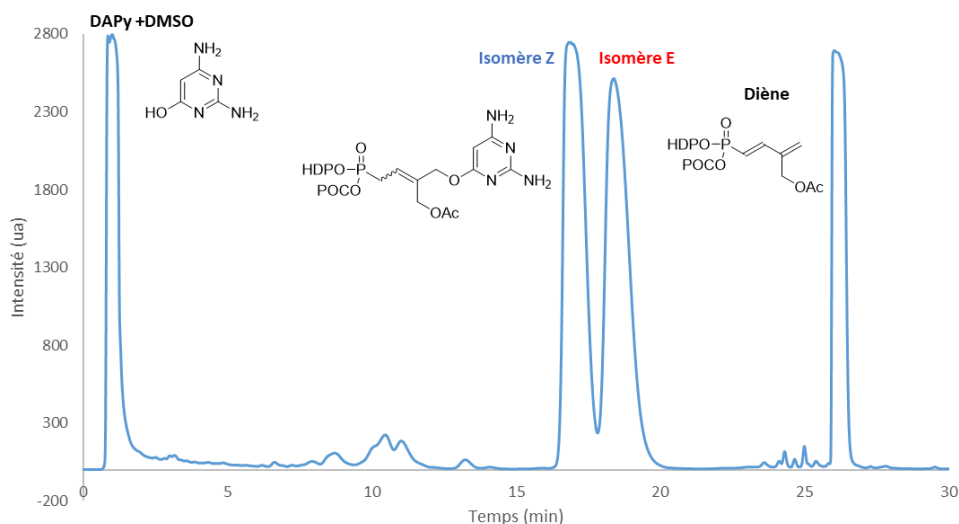


Figure 52 : Chromatogramme de surcharge du LAVR-289

Sur ce chromatogramme, nous observons une séparation entre les isomères *Z* et *E* qui n'est pas optimale et également la présence du « diène » et de la DAPy qui vont compliquer les analyses. Une transposition de cette méthode en semi-préparative permettrait d'injecter seulement 30 mg d'un mélange *Z/E* comprenant les deux impuretés et utiliserait un débit de 40 mL/min pendant 30 min pour récupérer 10 mg de produit pur. Pour obtenir 1 g d'isomère *Z* pur, il faudrait donc réaliser 100 injections de 30 min (auxquelles s'ajoutent 10 min d'équilibrage avant chaque injection), soit un total de 70 h (sans tenir compte du temps d'évaporation du solvant). Afin de diminuer les coûts de solvant et le temps d'analyse, l'utilisation d'une chromatographie (semi)-préparative, avec un système de recyclage de la phase mobile et donc en mode isocratique, pourrait être envisagée.

Tableau 6 : Résumé des conditions et coût de la séparation du LAVR-289 à l'échelle semi-préparative

Phase stationnaire	Zorbax C18 XDB 150 x 21,2 mm, 5 µm
Phase mobile	H ₂ O/ACN (20 / 80, v/v) pendant 20 min puis « step-gradient » à 100% ACN, plateau pendant 10 min, puis équilibrage avec mélange initial pendant 10min
Masse échantillon injecté par analyse (mg)	30
Temps d'analyse (min)	40
Productivité (mg/min)	0,25
Pureté du composé isolé (%)	> 95%
Consommation de solvant (L/g)	160

Enfin, une optimisation en phase normale, permettant une charge par unité de masse de phase stationnaire plus importante, permettrait de séparer une plus grande quantité de LAVR-289 par injection. Cependant, le problème serait identique, si nous envisagions de purifier le LAVR-289 en phase normale car la 6-hydroxy-2,4-diaminopyrimidine, composé très polaire, serait fortement retenue sur une phase silice non greffée. Les conclusions seront les mêmes que celles décrites pour la

purification en phase inverse, même si la problématique de pression sera beaucoup moins marquée et que les fractions récupérées pourront être facilement évaporées. Cependant, les solvants utilisés, comme l'hexane et le méthanol, seront plus toxiques qu'un mélange eau et acétonitrile, qui, lui, sera plus difficile à évaporer. Le chromatogramme de la Figure 53 réalisé par la société Kyrapharm illustre bien la difficulté en phase normale.

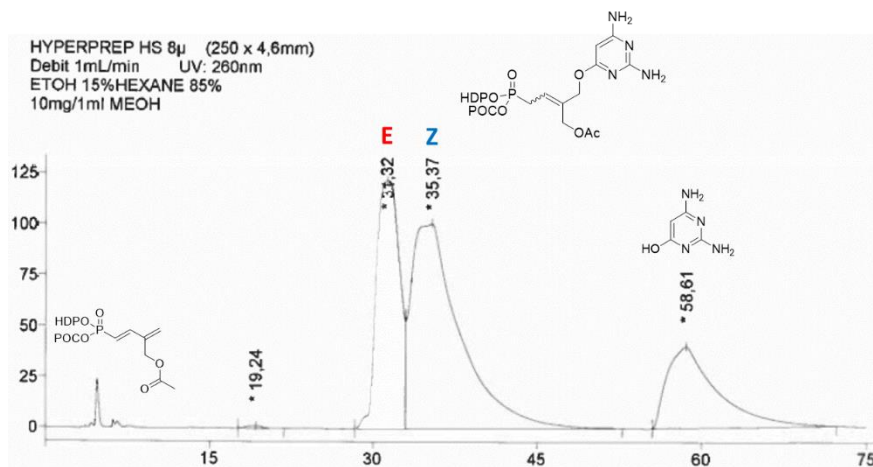


Figure 53 : Etude de surcharge du LAVR-289 en phase normale par la société Kyrapharm

Face à ces difficultés, la séparation en semi-préparative n'a pas été poursuivie sur le LAVR-289. Cependant pour valider cette approche, un essai sur un analogue du LAVR-289 portant un *bis(isopropyle)phosphonate* a été réalisé.

2.3.2. Séparation à l'échelle semi-préparative d'un analogue du LAVR-289

Dans le but d'obtenir le LAVR-289 sous la forme phosphonate **17**, un analogue comportant des fonctions *isopropyles* sur le phosphonate a été synthétisé au sein du laboratoire (Schéma 4). Cette molécule a été synthétisée afin de pouvoir ôter facilement les substituants du phosphonate et le groupement acétyle de l'hydroxyméthylalcène sans détériorer la structure propre du « squelette central » allant de la partie pyrimidine à la fonction phosphonate. Cet analogue est obtenu, comme pour le LAVR-289, par une étape de métathèse croisée entre le synthon **10** et le *bis(isopropyle)* allyle phosphonate **22** puis par la déprotection des amines du composé **23**. La synthèse conduit, là aussi, à un mélange 1/1 d'isomères *Z/E*, **24**.

Une purification des isomères *Z/E* par chromatographie semi-préparative a été envisagée afin d'obtenir le composé *Z* pur qui serait ensuite engagé dans des étapes de déprotection du groupement phosphonate et de la fonction alcool (Schéma 4).

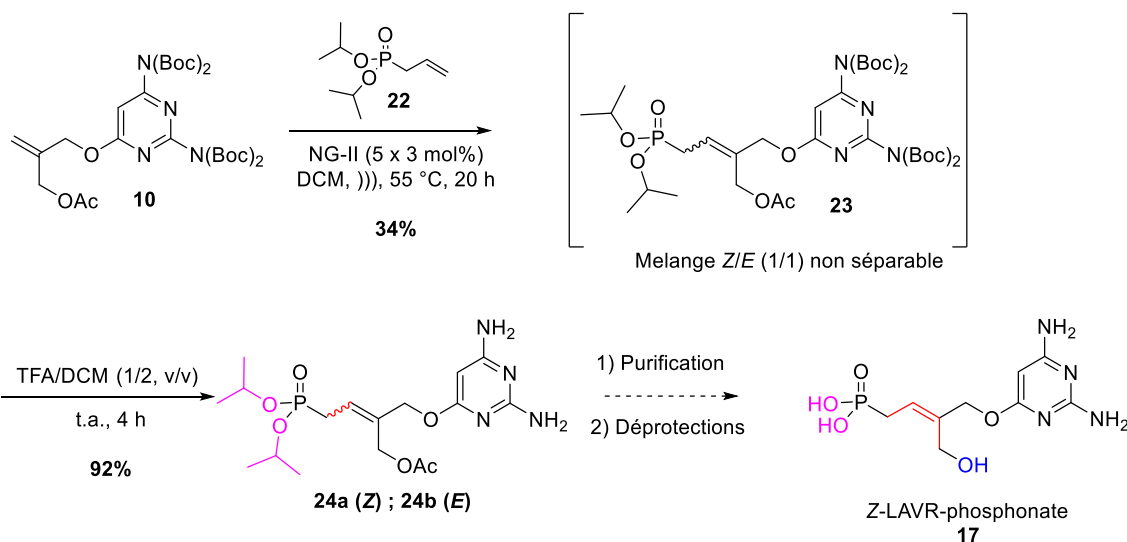


Schéma 4 : Synthèse du bis(isopropyle)-LAVR et stratégie pour obtenir le composé 17

Pour réaliser la purification en HPLC semi-préparative de ces diastéréoisomères, nous avons choisi les mêmes colonnes que celles décrites dans le paragraphe 2.3.1, à savoir des colonnes ayant une phase stationnaire de type silice greffée C18 (Zorbax XDB-C18) disponible aux formats analytique (150 x 2,1 mm, 5 µm) et semi-préparative (150 x 21,2 mm, 5 µm).

La séparation à la suite d'une surcharge optimale présentée sur la Figure 54 a été réalisée avec une phase mobile H₂O/ACN (10 % d'ACN pendant 5 min puis « step-gradient » à 20 % d'ACN), un débit de 0,4 mL/min, une température de 25 °C et un volume d'injection de 20 µL d'une solution à 16,7 mg/mL dans un mélange ternaire H₂O/MeOH/DMSO (5/3,3/1,7).

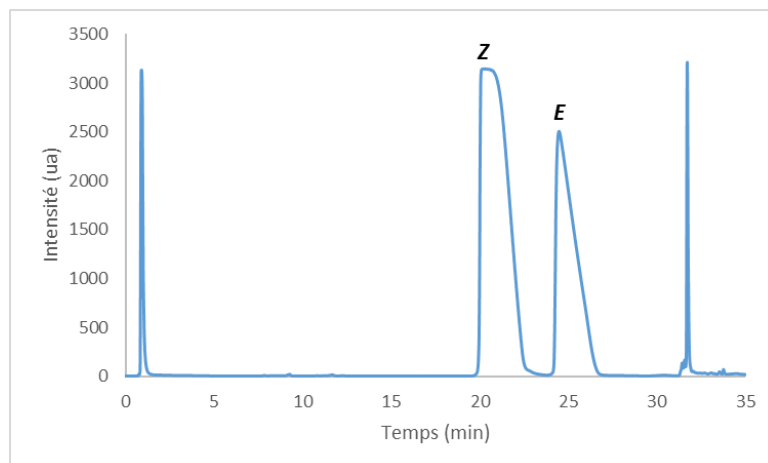


Figure 54 : Chromatogramme analytique de surcharge du bis(isopropyle)-LAVR (230 nm)

Ces conditions nous ont permis d'effectuer la séparation sur colonne semi-préparative, en utilisant l'appareil Interchim Puriflash 4250, et en adaptant nos conditions : un débit de 40 mL/min, une température de 25 °C et un volume d'injection de 2 mL ont permis d'obtenir le chromatogramme suivant (Figure 55).

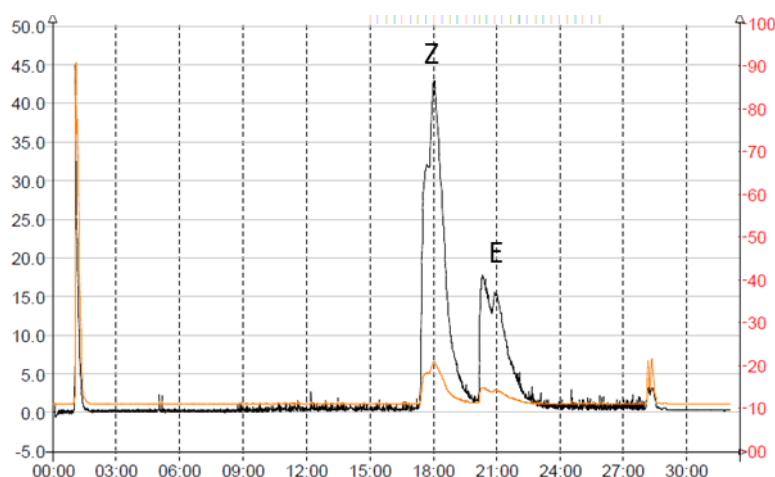


Figure 55 : Séparation semi-préparative des isomères du bis(isopropyle)-LAVR

Une analyse RMN ^1H (Figure 56) couplée à une analyse HPLC de la fraction 1 (Figure 57), confirme la configuration Z ainsi que la pureté de notre échantillon et donc l'efficacité de notre méthode de purification.

En effet, sur le spectre RMN ci-dessous, seuls les signaux des $\text{CH}_2\text{-ODapy}$ et $\text{CH}_2\text{-OAc}$ caractéristique de l'isomère Z sont présents.

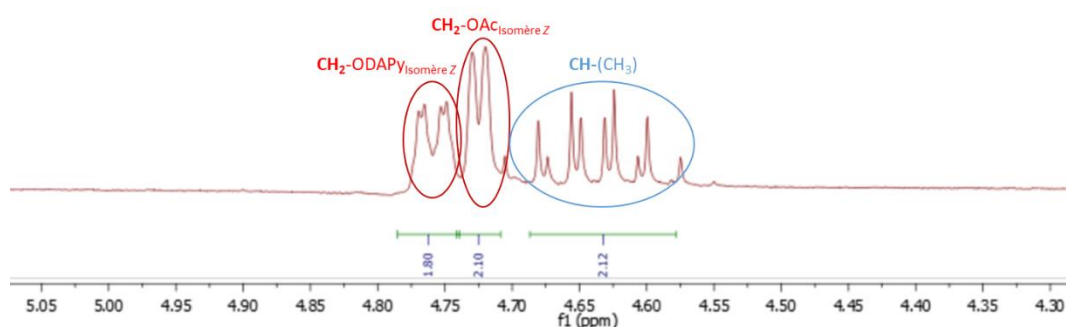


Figure 56 : RMN ^1H du Z-bis(isopropyle)-LAVR (zoom entre 4,30 et 5 ppm)

De même, sur le chromatogramme réalisé sur la colonne Poroshell Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μm), avec un débit de 0,3 mL/min et une phase mobile composée de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (8/2, v/v) un seul pic chromatographique est observé (Figure 57). Cependant les essais de déprotection du phosphonate pour obtenir le LAVR-289 sous sa forme phosphonate libre **17** n'ont pas abouti (cf. chapitre 4, paragraphe 1.1).

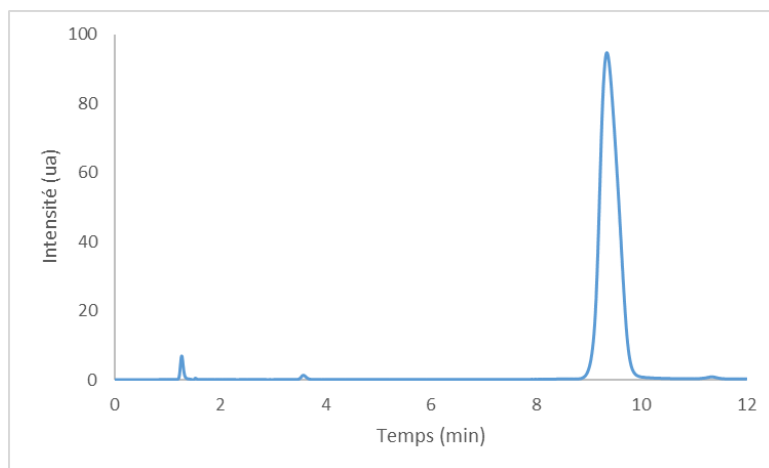


Figure 57 : Chromatogramme du *Z*-bis(isopropyle)-LAVR après purification (267 nm)

2.4. Séparation des stéréoisomères du LAVR-289 dus au phosphore chiral

Du fait de la chiralité du phosphore non contrôlée lors de la synthèse du LAVR-289, quatre composés peuvent être obtenus (Figure 58).

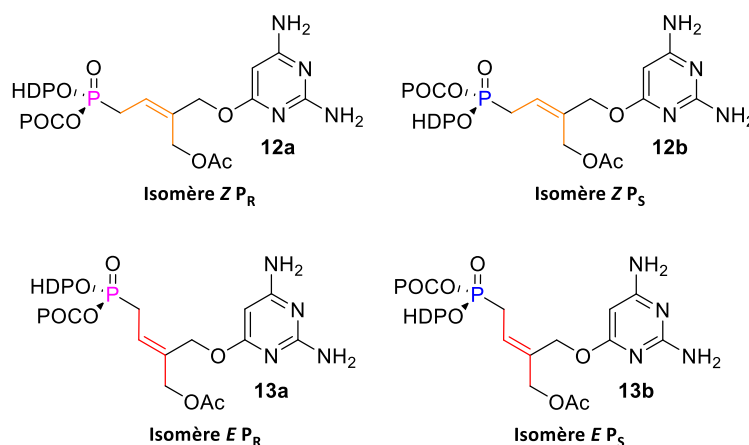


Figure 58 : Structures des diastéréoisomères du LAVR-289

Afin de vérifier la présence de ces composés ainsi que leur proportion, une séparation analytique chirale a été développée par chromatographie liquide en phase normale. La séparation a été effectuée sur la colonne ChiralPak® IC-3 (150 x 2,1 mm, 3 µm). Cette colonne a été choisie car elle est compatible pour des analyses HPLC, aussi bien en phase normale qu'en phase inverse, possède une sélectivité chirale marquée pour un grand nombre de familles de molécules et amène une efficacité élevée dans la séparation des composés recherchés. De plus, la granulométrie de 3 µm permet des analyses rapides sans perte d'efficacité et génère un gain de résolution entre stéréoisomères. Cette colonne a été choisie car elle est disponible commercialement également en colonne chromatographique de format semi-préparative dans le cas où nous aurions à réaliser un changement d'échelle en termes de quantité purifiée. Cela nous permettrait de mener à bien des tests biologiques sur les isomères *Z* P_R et *Z* P_S isolés et purs afin de comparer l'influence de la chiralité sur l'activité antivirale du composé, mais aussi de comparer leurs stabilités chimique et biologique voire leur cytotoxicité intrinsèque.

Les 4 diastéréoisomères ont donc été séparés en utilisant un débit de 0,15 mL/min, une température de colonne de 25 °C avec une phase mobile heptane/éthanol (70/30, v/v) (Figure 59).

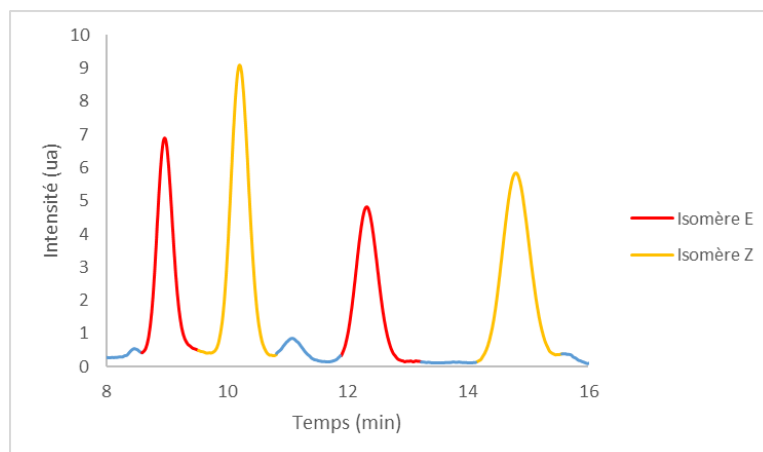


Figure 59 : Séparation chirale du LAVR-289 à 267 nm

Sur le chromatogramme les deux pics chromatographiques en rouge correspondent aux isomères E de configurations P_R et P_S , tandis que les pics chromatographiques en jaune correspondent aux isomères Z de configurations P_R et P_S . Nous ne sommes, à ce stade, pas en mesure d'identifier la forme P_R et P_S spécifique éluée sous chaque pic chromatographique. Il faudrait pour cela synthétiser ces composés de façon stéréosélective ou bien les purifier sur colonne semi-préparative chirale en phase normale et cristalliser chaque forme afin de les envoyer en analyse par diffraction X.

Pour conclure, les méthodes analytiques développées ont permis :

- ✓ Le mise en place d'une analyse de routine **séparant en moins de 10 min les isomères Z et E du LAVR-289**. Cette méthode nous a permis de déterminer la structure de deux produits de dégradation du LAVR-289, la DAPy (**20**) et le « diène » (**21**).
- ✓ Les faibles rendements et le manque de capacité calculés à l'échelle analytique n'ont pas permis d'envisager la séparation de ces diastéréoisomères par HPLC semi-préparative. La séparation de ces isomères demeure toujours limitante dans le développement de ce candidat médicament.
- ✓ La **purification semi-préparative** en phase inverse a été effectuée avec succès sur l'analogue bis(isopropyle) du LAVR-289.
- ✓ La **séparation chirale des 4 diastéréoisomères** a été mise au point.

A partir de la méthode analytique de routine mise au point, nous avons pu étudier les différentes stabilités (chimique/plasmatisque) du LAVR-289.

3. Stabilité plasmatique du LAVR-289

La stabilité plasmatique des molécules joue un rôle important dans la découverte et le développement de médicaments. En plus du métabolisme hépatique, les composés peuvent être sujets à des dégradations ou des modifications par les enzymes du sang, en particulier par la famille des hydrolases, dont les estérases et les phosphatases font partie. Les promédicaments, auxquels le LAVR-289 appartient, sont sensibles à ces enzymes et présentent donc un temps de stabilité plasmatique plus ou moins réduit, ce qui peut engendrer de faibles efficacités thérapeutiques *in vivo* ainsi que la formation potentielle de métabolites toxiques.⁹¹ L'étude de la stabilité plasmatique est, de fait, effectuée au début de l'étude pré-clinique d'un nouveau principe actif afin d'évaluer les problèmes potentiels de dégradation et/ou de liaison aux protéines du sang. Cette étude nous permettra d'obtenir le temps au bout duquel la moitié de la concentration initiale de la forme promédicament LAVR-289 a été métabolisée dans le plasma humain que l'on nommera par la suite temps de demi-vie, $t_{1/2}$.

Cela nous permettra également de confirmer la structure des métabolites de ce composé et d'avoir une première hypothèse quant à la structure moléculaire du composé qui pénétrera les cellules des organes.

3.1. Métabolites théoriques

La molécule LAVR-289 possède trois groupements biolabiles pouvant être clivés *in vivo* par différentes enzymes (Figure 60).

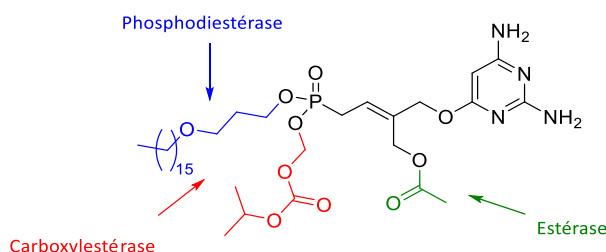


Figure 60 : Clivage du LAVR-289 par différentes enzymes

La phospholipase C, enzyme hydrolysant les liaisons esters liant le glycérol et le phosphate de certains glycérophospholipides membranaires n'étant pas présente dans le plasma²⁵ nous devrions suivre la cinétique d'apparition/disparition de 3 composés (Figure 61). Le LAVR-289 peut, tout d'abord, subir l'action de la carboxylestérases, qui libèrera le groupement POC (**15**), avant de perdre sa fonction acétate sous l'action d'estérases (**16**). Le LAVR-289 peut également subir en premier l'action des estérases conduisant à l'obtention de la molécule HDP-POC (**14**), puis former le composé **16** sous

⁹¹ Baroud, M.; Lepeltier, E.; Thepot, S.; El-Makhour, Y.; Duval, O. The Evolution of Nucleosidic Analogues: Self-Assembly of Prodrugs into Nanoparticles for Cancer Drug Delivery. *Nanoscale Adv.* **2021**, *3*, 2157–2179.

l'action des carboxylestérases. Le composé majoritaire final serait donc le métabolite **16** portant seulement le groupement biolabile HDP (Figure 61).

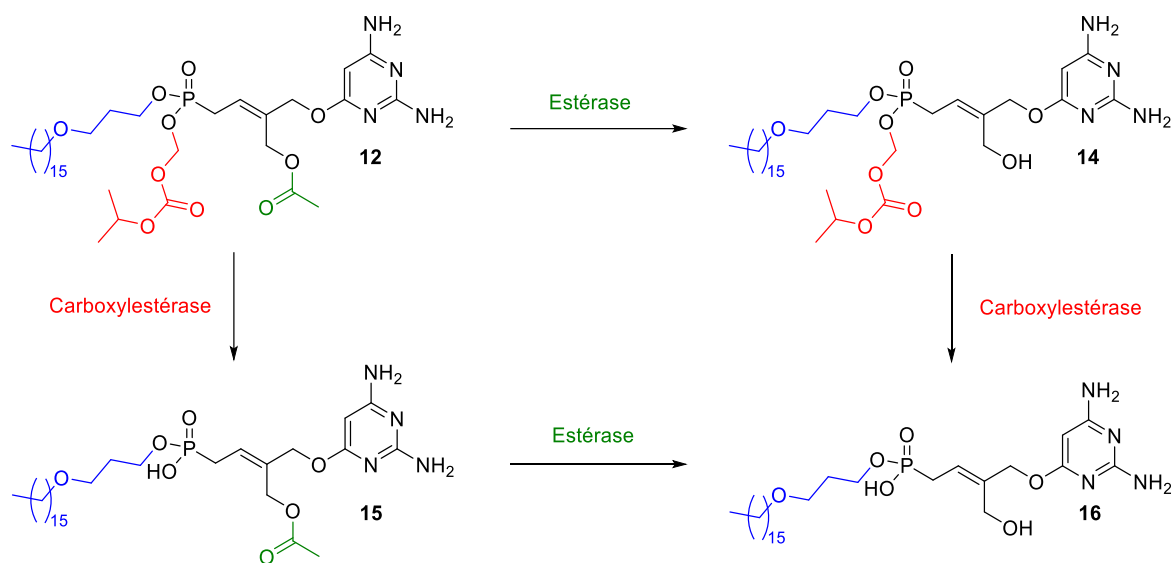


Figure 61 : Métabolites théoriques du LAVR-289 dans le plasma humain

L'analyse d'un plasma humain supplémenté en LAVR-289 nous a permis de vérifier la présence ou non de ces composés et d'identifier des métabolites extracellulaires du LAVR-289. En parallèle, la cinétique de stabilité plasmatique de la molécule a été obtenue et a été comparée à celle de deux analogues du LAVR-289.

3.2. Méthode de traitement de l'échantillon

Dans le but d'analyser par HPLC-UV ou UPLC-HRMS nos échantillons de plasma et de déterminer les métabolites présents, les protéines plasmatiques, étant des interférents, doivent être ôtées de l'échantillon.⁹² En effet, une préparation de l'échantillon est nécessaire afin de simplifier ce type de matrice biologique complexe et la rendre compatible avec la méthode LC-UV ou LC-MS. Cette préparation permet d'éliminer les entités interférant avec la performance analytique de la méthode (sélectivité, justesse et limites de quantification et détection) et également de prolonger la durée de vie de la colonne chromatographique.

Dans la littérature, plusieurs méthodes de précipitations des protéines ont été rapportées⁹³ :

L'ajout d'un solvant ou d'un acide engendre un changement de polarité ou de pH de la solution et modifie les interactions entre les protéines et l'environnement aqueux conduisant à la précipitation des protéines. Une récupération du surnageant après centrifugation permet d'obtenir la solution à analyser.⁹³

⁹² Stone, J. Sample Preparation Techniques for Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*; Elsevier, 2017; pp 37–62.

⁹³ Blanchard, J. Evaluation of the Relative Efficacy of Various Techniques for Deproteinizing Plasma Samples Prior to High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1981**, 226, 455–460.

- ✓ La précipitation à l'acide perchlorique (PCA) ou trichloracétique (TCA) est la procédure la plus couramment utilisée en raison de la simplicité de sa mise en œuvre ainsi que de son efficacité. Le simple ajout d'un faible volume d'acide permet de précipiter efficacement les protéines. Cependant cette méthode n'est pas adaptable dans le cas d'une prodrogue car l'ajout d'acide dans le milieu peut favoriser l'hydrolyse de certains groupements biolabiles et induire une erreur importante dans l'étude de stabilité plasmatique.
- ✓ La précipitation à l'aide d'un solvant organique froid a également été rapportée. Cette méthode, simple à mettre en œuvre, repose sur l'utilisation de méthanol, d'acétonitrile, d'acétone, ou bien un mélange de deux de ces solvants. Elle a l'avantage d'être inerte chimiquement pour les promédicaments. Cependant la solubilité des produits finaux très polaires peut être problématique dans un mélange où la partie aqueuse devient très minoritaire. Généralement, pour éviter un effet de dilution trop prononcé et pour contourner la problématique de la solubilité, les rapports volumiques échantillon/solvant organique ajouté sont compris entre 1/1 et 1/4.

Outres les protéines, les phospholipides, constituants majeurs des membranes des cellules, sont très abondants dans le plasma.⁹⁴ Ils sont constitués d'une tête polaire, composée notamment d'unités phosphates et choline, et d'une queue hydrophobe, composée de chaînes d'acides gras. Les phospholipides les plus importants sont les glycérophosphocholines et les lysophosphatidylcholines représentant 70% et 10% du total des phospholipides, respectivement (Figure 62). Ces groupes de phospholipides sont connus pour causer des effets de suppression d'ions en analyse LC-MS.⁹⁴

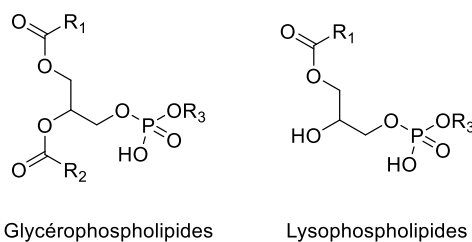


Figure 62 : Structures chimiques des phospholipides les plus abondants dans le plasma

Afin de réduire, les effets de matrice induits par ces composés, plusieurs méthodes ont été comparées⁹⁵ dont la précipitation des protéines (PPT), l'extraction liquide-liquide (LLE), la chromatographie à débit en régime turbulent, l'extraction sur phase solide (SPE) et l'extraction liquide-liquide assistée par un support solide (SLE). Evidemment, les techniques dédiées comme la SLE ainsi que la SPE spécialement conçue pour adsorber de manière irréversible les phospholipides donnent les

⁹⁴ Bylda, C.; Thiele, R.; Kobold, U.; Volmer, D. A. Recent Advances in Sample Preparation Techniques to Overcome Difficulties Encountered during Quantitative Analysis of Small Molecules from Biofluids Using LC-MS/MS. *The Analyst*. **2014**, *139*, 2265.

⁹⁵ Michopoulos, F.; Edge, A.; Hui, Y.-T.; Liddicoat, T.; Theodoridis, G.; Wilson, I. Extraction Methods for the Removal of Phospholipids and Other Endogenous Material from a Biological Fluid. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2747–2755.

meilleurs résultats. Le problème est que ces techniques d'adsorption ou d'extraction sélectives aux phospholipides risquent d'enlever une partie ou la totalité du LAVR-289 lors du traitement de l'échantillon. En effet, le pro-médicament étudié ici possède une grande partie de son squelette structuralement proche, voire bioisostère, d'un lipide de type glycérophosphocholine. La chaîne HDP et le « linker » qui la lie sur le phosphonate ont été choisis pour mimer un phospholipide naturel. Pour ne pas courir le risque de perdre notre promédicament lors d'une étape de traitement de l'échantillon permettant d'enlever les phospholipides du plasma, nous avons décidé d'utiliser qu'une étape de précipitation par solvant organique glacé. L'acétone n'a pas été retenue car elle absorbe fortement en UV⁹⁶ ($\lambda_{\text{max}} = 279 \text{ nm}$) et perturberait l'analyse. En effet, ce solvant d'injection est plus éluant que la phase mobile et masquerait les composés qui élueiraient proche du temps mort. Notre choix s'est donc porté sur l'acétonitrile car celui-ci est le modificateur organique utilisé en grande proportion dans la phase mobile et, comparé au méthanol, celui-ci permet d'éliminer 40% de protéines en plus à volume égal.⁹⁷ De plus, dans le cas où nous envisagerions de concentrer notre échantillon afin d'augmenter la sensibilité, l'acétonitrile est plus volatil que le méthanol et donc plus facilement éliminé sous flux d'azote. La solution finale de notre analyse est composée de 25% de phase aqueuse et 75% d'ACN ce qui est quasiment équivalent aux proportions de la phase mobile utilisée lors de l'analyse (72% ACN et 28% H₂O en volume) et conforte notre choix d'avoir privilégié l'acétonitrile au méthanol.

3.3. Choix de la longueur d'onde d'analyse

Afin de suivre la cinétique de dégradation plasmatique du LAVR-289 et ainsi déterminer le temps de demi-vie, les extraits correspondants aux différents temps d'incubation sont analysés par HPLC-UV. Les chromatogrammes acquis par la méthode analytique développée précédemment sont enregistrés à 267, 230 et 210 nm. À 210 nm, l'absorbance est plus intense qu'aux longueurs d'onde de 230 et 267 nm, ce qui permet d'abaisser la limite de quantification du LAVR-289. De plus, cette longueur d'onde permet aussi de suivre des métabolites potentiels ne possédant pas les mêmes groupements chromophores que le LAVR-289. Mais, le chromatogramme tracé à cette longueur d'onde est plus complexe en termes de nombre de pics chromatographiques que ceux suivis à 267 nm. En effet, certains composés endogènes extraits du plasma absorbant à faible longueur d'onde vont apparaître sur ce chromatogramme. C'est pourquoi le traitement des données analytiques de ces expériences sera fait à 210 nm. Mais, avant de réaliser l'expérience de stabilité, il est nécessaire de choisir un standard interne.

⁹⁶ Bayliss, N. S.; McRae, E. G. Solvent Effects in the Spectra of Acetone, Crotonaldehyde, Nitromethane and Nitrobenzene. *J. Phys. Chem.* **1954**, *58*, 1006–1011.

⁹⁷ Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses. *J. Chromatogr. B.* **2007**, *852*, 22–34.

3.4. Choix de l'étalon interne

L'utilisation d'un étalon interne a pour but de minimiser les erreurs potentielles liées aux ajouts volumiques du solvant organique qui sert à précipiter les protéines du fluide biologique et de la prise d'un volume de l'échantillon après précipitation. La non-utilisation de cet étalon interne entraînerait des erreurs aléatoires sur la quantification des composés suivis. En effet, des variations d'aire des pics chromatographiques feraient penser à des changements de concentration des molécules dans le milieu. Pour être un bon candidat, l'étalon interne doit répondre à un certain nombre de critères.⁹⁸ Il doit avoir un temps de rétention proche de celui du composé à analyser et une structure assez proche de l'analyte d'intérêt afin que son comportement au sein de l'échantillon soit proche de celui de la molécule dosée (solubilité dans le solvant de précipitation, solubilité dans l'échantillon après précipitation, polarité, détection). Pour une analyse par détection UV, l'étalon interne doit posséder un spectre d'absorption montrant une longueur d'onde d'absorption maximale proche ou identique à celle choisie pour quantifier le principe actif. De plus, notre étalon interne doit être inerte chimiquement vis à vis de la molécule d'intérêt et ne doit pas être modifié chimiquement ou biochimiquement durant l'étape de traitement d'échantillon.

Le choix de l'étalon interne s'est porté sur des molécules possédant des groupements communs avec le LAVR-289 : un groupement aryle, pour mimer le noyau pyrimidine, et une chaîne alkyle d'une longueur à estimer, pour rendre le composé suffisamment apolaire et mimer le groupement HDP. Notre choix s'est porté sur des molécules de type phényle, comportant une chaîne alkyle de 6, 8, 9 ou 10 carbones, ou de type phénol, comportant une chaîne alkyle de 8 ou 9 carbones (Figure 63).

Ces six molécules ont été analysées en chromatographie liquide (Figure 64) en utilisant la méthode analytique mise au point dans la partie 2.1. La phase stationnaire étant apolaire, les composés sont d'autant plus retenus par la phase stationnaire qu'ils sont apolaires.

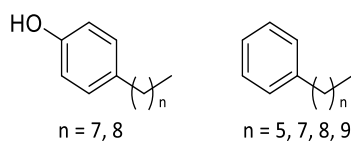


Figure 63 : Structures des étalons internes

Ainsi, pour chaque famille (phényles ou phénols), le temps de rétention est proportionnel au nombre de carbones de la chaîne aliphatique. Le composé le moins retenu est le 4-octylphénol (**25**) tandis que le composé le plus retenu est le 1-phényldécane (**30**).

⁹⁸ Dolan, J.M. When should an internal standard be used?. *LCGC North Am.* **2012**, 30, 474–480.

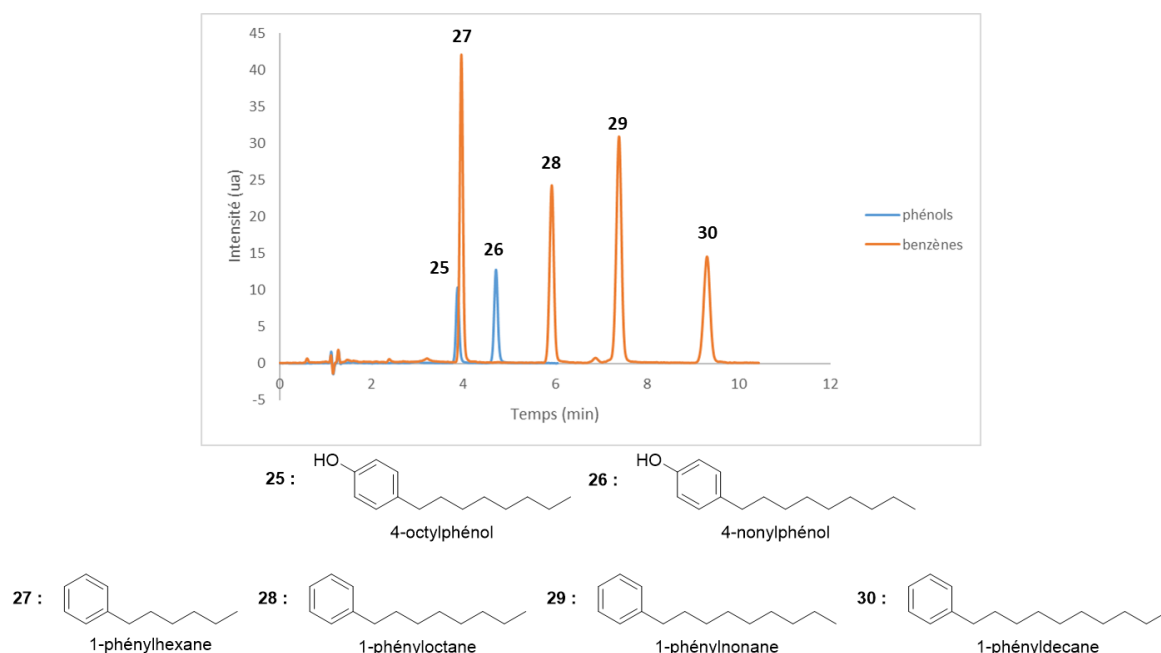


Figure 64 : Séparation chromatographique et structures des standards internes (210 nm)

En comparant les temps de rétention de ces étalons internes avec celui du LAVR-289 (8,51 min) le 1-phényloctane (**28**) apparaît le plus approprié pour faire office d'étalon interne.

3.5. Protocole des expériences de stabilité plasmatique

Le plasma humain (human plasma-sterile GTX73265 100mL lot number : 822101381LiHep, GenTex) stocké au congélateur à -28 °C est décongelé lentement durant toute une nuit au réfrigérateur à 4 °C. Un nombre X d'Eppendorf sont ensuite remplis de 250 µL de plasma et sont placés à 37 °C pendant 30 min à 500 RPM à l'aide d'un thermo-mixeur (Thermomixer C, Eppendorf, Dutscher, Brumath, France) avant l'ajout de la molécule d'intérêt. Un volume de 10 µL, afin d'avoir une teneur en DMSO inférieure à 5% en volume, d'une solution de l'analyte dans le DMSO est ensuite ajouté aux différents Eppendorf contenant le plasma. A t=0, 750 µL de la solution d'étalon interne dans l'acétonitrile conservée au congélateur est ajoutée très rapidement, après l'ajout de l'analyte, afin d'empêcher les enzymes du milieu de dégrader la molécule. Les autres solutions sont incubées à 37 °C sous agitation à 500 RPM. Au bout du temps d'incubation souhaité, les protéines sont précipitées par l'ajout de 750 µL d'une solution d'acétonitrile froid contenant l'étalon interne. Les solutions obtenues sont composées à 75% d'acétonitrile et 25% de solution aqueuse, en volume. Après précipitation, les Eppendorf sont ensuite centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 10000 tour/min. Le surnageant est ensuite prélevé et transféré dans un vial de 1,5 mL avant d'être injecté en HPLC-UV ou UPLC-MS.

3.6. Gamme du LAVR-289 dans le plasma

Il est nécessaire de réaliser une gamme du LAVR-289 dans le plasma et dans l'eau en parallèle afin d'étudier si un effet de matrice est observé et afin de déterminer la constante de vitesse de la cinétique de dégradation du LAVR-289 après incubation dans du plasma humain.

Cette expérience a été réalisée avec la méthode mise en place au paragraphe 2.1 avec un volume d'injection de 5 μL . Sept solutions de concentrations comprises entre 6,25 μM et 0,4 mM dans le DMSO ont été préparées. En suivant le protocole décrit dans la partie 3.5, en ajoutant 25 μL de chaque solution de LAVR-289 et en traitant les 7 échantillons, sans les incuber à 37 °C, les surnageants ont été analysés par HPLC-UV en suivant le signal à la longueur d'onde de 210 nm (voir paragraphe 3.3.) En parallèle, la même expérience a été réalisée en remplaçant le plasma par de l'eau. Les résultats de ces deux expériences sont montrés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Résultats des analyses HPLC-UV de la gamme du LAVR-289 dans le plasma et dans l'eau

$C_{\text{LAVR-289}} (\mu\text{M})$	$A_{\text{étalon}}$	$A_{\text{LAVR-289}}$	Ratio
<i>Résultats dans le plasma ($\lambda = 210 \text{ nm}$)</i>			
10	278,6	117,4	0,4214
5	279,1	59,2	0,2121
2,5	279,8	29,0	0,1036
1,25	280,7	16,4	0,0584
0,63	282,1	8,3	0,0294
0,31	285,4	5,1	0,0179
0,16	306,6	2,1	0,0068
<i>Résultats dans l'eau ($\lambda = 210 \text{ nm}$)</i>			
10	271,8	126,9	0,4669
5	273,7	69,7	0,2547
2,5	274,3	37,0	0,1349
1,25	273,9	20,0	0,0730
0,63	270,8	10,4	0,0384
0,31	272,7	5,0	0,0183
0,16	247,0	1,9	0,0075

A partir de ces données, nous avons tracé le ratio des aires en fonction de la concentration du LAVR-289 (Figure 65).

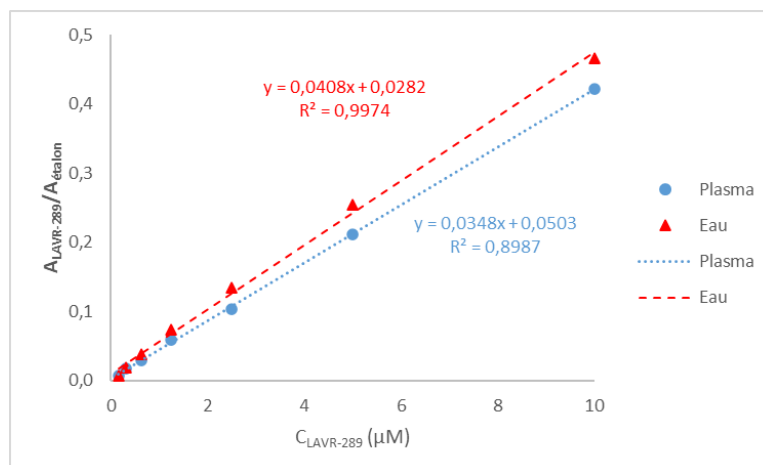


Figure 65 : Ratio des aires en fonction de la concentration du LAVR-289 dans l'eau et dans le plasma

Nous remarquons que les gammes réalisées dans l'eau et dans le plasma sont bien linéaires pour les 7 concentrations mais possèdent une équation différente. Pour comparer les pentes des deux droites, et estimer la présence d'un éventuel effet matrice pour la gamme dans le plasma, un test de Student a été effectué.

Le nombre t calculé par nos données est égal à 0,0132 tandis que le nombre t tiré de la table de Student, pour un risque d'erreur global α de 0,05, donc un niveau de confiance $p = 1 - \alpha = 0,95$ (95%), à un degré de liberté de $n_1 + n_2 - 4$, est de 2,179. La valeur théorique est plus élevée que la valeur calculée, ce qui signifie que l'hypothèse de deux pentes de droites différentes est rejetée. Il n'y a donc, dans notre cas, pas d'effet matrice lors de l'étalonnage du LAVR-289 directement dans le plasma humain, ce qui nous amène à pouvoir doser ce composé dans le plasma en utilisant la méthode du dosage externe dans une matrice aqueuse simple, l'eau ultrapure.

3.7. Résultats des expériences de stabilité plasmatique du LAVR-289

3.7.1. Préparation de l'expérience

➤ Solution de LAVR-289 dans le DMSO

Une masse de 4,07 mg de LAVR-289, dont la teneur en isomère E < 5 %, est solubilisée dans 5 mL de DMSO. La concentration molaire de cette solution, appelée **S1** est de 1,12 mM. La concentration dans le plasma à $t = 0$ h est de 43,07 µM et la concentration après précipitation est de 11,02 µM.

➤ Solution d'octylbenzène dans l'acétonitrile

6 µL d'octylbenzène pur sont dilués dans 25 mL d'acétonitrile. La concentration molaire de cette solution est de 1,08 mM. Cette solution est conservée au congélateur.

➤ Préparation des échantillons de plasma

Cette expérience a été réalisée en suivant le protocole détaillé au paragraphe 3.5. Pour cette expérience, 10 µL de la solution S1 de LAVR-289 sont mis en contact avec le plasma. Les protéines sont

précipitées après 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h et 24 h d'incubation puis les échantillons sont analysés par HPLC-UV.

3.7.2. Analyse des échantillons

Les aires sous le pic chromatographique du LAVR-289 mesurées ainsi que celles du standard interne sont répertoriées ci-dessous (Tableau 8). Pour chaque temps d'incubation, les mesures sont réalisées en triplicat. Pour chaque temps de mesure, le pourcentage restant de LAVR-289 non dégradé est calculé de la manière suivante (Eq. 2) :

$$\%_{LAVR} = \frac{Rapport_{t_i}}{Rapport_{t_0}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

avec Rapport t_i correspondant au ratio de « aire pic LAVR-289 » sur « aire pic standard interne » à un temps d'incubation, et Rapport t_0 étant égal au ratio de « aire pic LAVR-289 » sur « aire pic standard interne » à t_0 .

Tableau 8 : Données des études plasmatiques

Temps (h)	A _{étalon interne}	A _{LAVR-289}	Ratio	% Restant
0	118,3	103,8	0,88	100
	115,9	108,2	0,93	
	115,2	107,6	0,93	
0.5	120,8	102,1	0,85	94
	116,7	101,1	0,87	
	117,4	103,4	0,88	
1	117,5	86,0	0,73	85
	116,8	91,9	0,79	
	115,7	93,3	0,81	
2	122,2	81,4	0,67	73
	118,5	77,4	0,65	
	117,8	80,4	0,68	
4	115,8	63,7	0,55	53
	127,8	46,7*		
	118,8	62,8	0,53	
8	115,0	44,1	0,38	39
	116,4	41,5	0,36	
	118,8	40,1	0,34	
12	115,7	26,7	0,23	26
	115,3	27,4	0,24	
	119,6	5,3*		
16	118,3	21,7	0,18	20
	114,7	32*		
	120,1	22,1	0,18	
24	113,4	19,1*		9
	121,8	10	0,08	
	116	10,4	0,09	

* ces valeurs ont été conclues comme aberrantes à la suite d'un test de Dixon et sont donc non prises en compte.

Pour mieux visualiser le phénomène de dégradation plasmatique, le pourcentage restant de LAVR-289 dans le plasma en fonction du temps est tracé (Figure 66). La courbe corrèle une fonction exponentielle décroissante. Au vu de son évolution et en considérant qu'à t = 0 h l'aire mesurée sous le pic chromatographique à 8,51 min correspond à la quantité initiale de LAVR-289, il est possible d'estimer le temps de « demi-vie plasmatique » à environ 6 h.

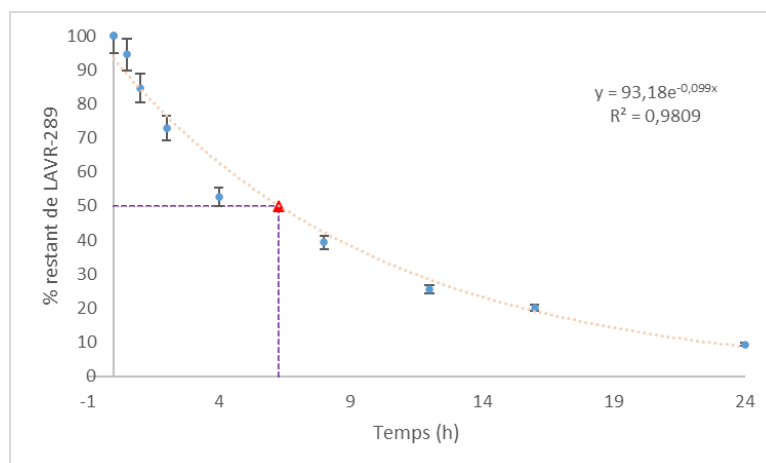


Figure 66 : Cinétique de dégradation du LAVR-289 dans le plasma humain

Durant cette étude, nous observons une diminution de la quantité de LAVR-289 en fonction du temps d'incubation dans le plasma. Cela peut être dû à une dégradation chimique et/ou enzymatique. La réalisation d'une étude de la stabilité au pH (cf. paragraphe 4) montre une instabilité du LAVR-289 dans l'eau (pH 7,4 – 25 °C). Ces résultats indiquent que la dégradation du LAVR-289 dans le plasma n'est pas uniquement dû à une dégradation enzymatique mais également à une dégradation chimique.

Ces deux études ont permis d'estimer le temps de « demi-vie plasmatique » du LAVR-289 à un peu plus de 6 h (6 h 16 min) et de mettre en évidence que la molécule se dégrade par voie enzymatique. En revanche, aucune information sur le nombre et la structure des métabolites n'a pu être obtenue. Bien que nous observions une diminution de la quantité de LAVR-289 au cours du temps d'incubation, les chromatogrammes n'ont présenté que peu de pics chromatographiques en accroissement significatif en fonction du temps. De plus, les spectres UV associés à ces pics sont difficilement exploitables.

Lors de la mise en œuvre de cette expérience, nous avons été confrontés à plusieurs problèmes :

- ✓ Le LAVR-289 étant insoluble dans l'eau, le DMSO a dû être utilisé.
- ✓ La concentration de LAVR-289 dans le plasma humain était très supérieure à celle que l'on trouve dans la littérature (généralement environ 1 μM ⁹⁹) à cause de la limite de quantification

⁹⁹ Di, L.; Kerns, E. H.; Hong, Y.; Chen, H. Development and Application of High Throughput Plasma Stability Assay for Drug Discovery. *Int. J. Pharm.* **2005**, *297*, 110–119.

de notre méthode LC-UV qui est inférieure à 0,16 μM et également de la solubilité du LAVR-289 dans le DMSO.

- ✓ Le DMSO absorbe en UV (dont à 210 nm) et est un solvant polaire qui élué au temps mort en présentant un pic plus ou moins large en fonction du volume injecté. Les répercussions sont que ce pic « solvant » cache la présence éventuelle de métabolites polaires qui co-élueraient avec le pic de DMSO.
- ✓ La présence simultanée des composés **20** (DAPy) et **21** (« Diène ») peut engendrer une surestimation du temps de stabilité plasmatique du LAVR-289. En effet, le « diène » (**21**) possède les groupements POC et acétate qui sont eux aussi substrats des hydrolases plasmatiques. Les enzymes vont donc également agir sur ces produits de dégradation, les rendant moins disponibles pour dégrader le LAVR-289.

Pour contourner et/ou résoudre certaines de ces problématiques et pouvoir déterminer la structure des métabolites, un couplage à la spectrométrie de masse haute résolution a été réalisé.

3.8. Couplage UPLC-HRMS

3.8.1. Synthèse d'un nouvel étalon interne

Pour pouvoir transférer notre méthode d'analyse de l'HPLC-UV à l'UPLC-HRMS, un changement d'étalon interne est nécessaire. En effet, l'octylbenzène, adapté pour un suivi UV, est une molécule difficilement protonable (afin de la détecter sous forme $[\text{M}+\text{H}]^+$) ou déprotonable (afin de la détecter sous forme $[\text{M}-\text{H}]^-$) dans la source ESI du spectromètre de masse. Ce standard interne ne peut donc pas être utilisé pour un couplage avec le spectromètre de masse haute résolution. Afin d'avoir un standard interne protonable ayant les caractéristiques décrites précédemment, nous avons opté pour des dérivés alkyles possédant la même base pyrimidique que le LAVR-289 : trois composés possédant une chaîne de 8, 14 et 16 carbones ont été synthétisés (Schéma 5).

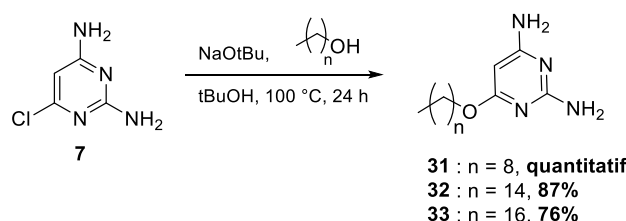


Schéma 5 : Synthèse des standards internes pour l'analyse du LAVR-289 en UPLC-HRMS

Ces composés ont été synthétisés en faisant réagir la 6-chloro-2,4-diaminopyrimidine **7** avec l'octanol, le tétradécanol ou l'hexadécanol, respectivement, en présence de *tert*-butoxyde de sodium dans le *tert*-butanol à 100 °C pendant 24 h. Ces conditions permettent d'obtenir les composés, **31**, **32** et **33**, O-alkylés en position 6 avec des rendements de synthèse compris entre 76% et 100%. Tout d'abord, une chaîne de 8 carbones a été choisie afin de conserver une similarité avec l'octylbenzène. Cependant la base pyrimidine est beaucoup plus polaire qu'un noyau benzénique ce qui amène le composé **31** à

avoir un temps de rétention (1,89 min) considérablement réduit comparativement à l'octylbenzène (6,02 min). Son temps de rétention est trop éloigné de celui de notre analyte d'intérêt et peut être co-élué avec le pic chromatographique du DMSO. L'analogue **33** comportant 16 carbones présente cette fois-ci un temps de rétention (9,17 min) quasiment identique à celui du LAVR-289 (8,51 min) et est élué dans une zone de rétention de certains de ces métabolites. Une diminution de 2 carbones de la chaîne alkyle, nous a permis d'obtenir le dérivé **32**, ayant un temps de rétention de 5,53 min, qui correspondait à toutes les attentes d'un standard interne (Figure 67).

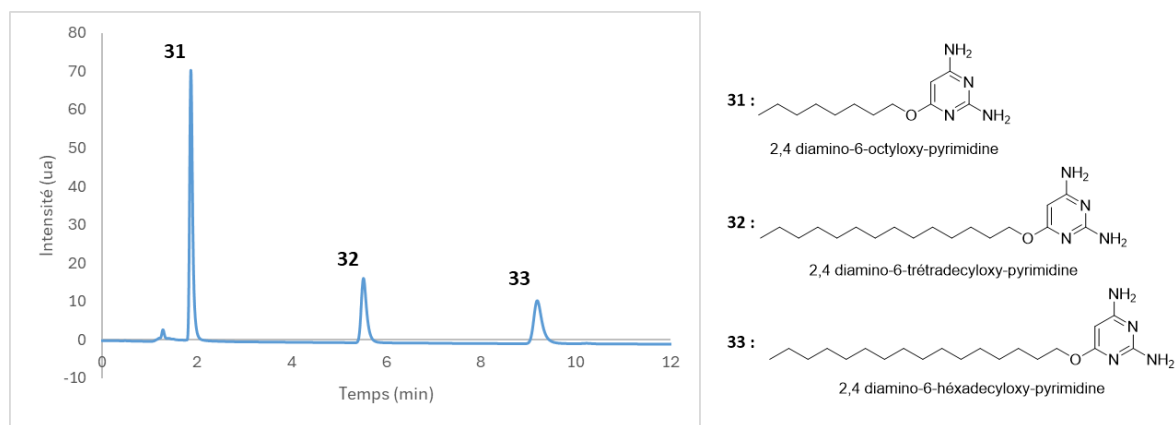


Figure 67 : Séparation chromatographique et structures des dérivés alkyles du DAPy (210 nm)

3.8.2. Mise en place de la méthode analytique

Afin de pouvoir analyser les échantillons à différents temps d'incubation, il est nécessaire de déterminer la concentration optimale du standard interne afin d'être suffisamment sensible sans saturer le signal obtenu par le spectromètre de masse. Le LAVR-289 et le standard interne **32**, possédant la même base pyrimidine, offrent ainsi le même site potentiel d'ionisation. Or, il est apparu que le standard interne, le 2,4-diamino-6-tétradécyloxy-pyrimidine, montrait un signal en spectrométrie de masse environ 4 fois plus important que le LAVR-289 dans les mêmes conditions d'ionisation (ESI⁺, fenêtre de balayage : 50 à 3000 m/z ; capillaire réglé à 4500 V ; cellule de collision réglée à 1800 Vpp ; nébuliseur réglé à 0,6 bar ; T = 200 °C ; D_{gaz} = 7 mL/min) et à la même concentration. Afin de retenir le composé **20** (DAPy) et de séparer des composés plus polaires que le LAVR-289 tels que les 3 métabolites théoriques **14**, **15** et **16** (cf. Figure 61), l'analyse UPLC-HRMS a été effectuée en mode gradient sur la colonne Poroshell Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μm) avec un débit de 0,5 mL/min et une température de colonne de 40 °C. La phase mobile est constituée d'un mélange A contenant de l'eau et 0,1% d'acide formique et d'un mélange B contenant de l'acétonitrile et 0,08% d'acide formique. Le gradient utilisé pour cette analyse est le suivant :

Tableau 9 : Gradient utilisé en UPLC-HRMS

Temps (min)	%B
0	5
0,2	5
10	90
16,5	90
17	5
20	5

3.8.2.1. Préparation des échantillons

➤ Solution de standard interne **32**

La solution de standard interne est préparée afin d'avoir une concentration finale de 0,27 μM dans l'acétonitrile. Cette solution sera conservée au congélateur et servira de solution de précipitation des protéines plasmatiques.

➤ Solution de LAVR-289

La solution de LAVR-298 est préparée en solubilisant 1,8 mg de la molécule dans 250 μL de DMSO afin d'avoir une concentration initiale de 9,9 mM.

➤ Echantillons de plasma humain

Cette expérience a été réalisée en suivant le protocole détaillé au paragraphe 3.5. Pour cette expérience, 10 μL de la solution de LAVR-289 dans le DMSO sont mis en contact avec le plasma. Les protéines sont précipitées après 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h et 24 h d'incubation et les surnageants sont analysés.

La concentration du LAVR à $t = 0$ h après précipitation est de 98 μM tandis que la concentration du standard interne est fixée à 0,067 μM .

3.8.2.2. Identification des métabolites

L'analyse UPLC-HRMS des échantillons aux différents temps d'incubation nous a permis d'identifier les métabolites plasmatiques du LAVR-289 et de confirmer que les composés **20** et **21** étaient initialement présents dans les échantillons injectés. Par ailleurs, le nombre de composés identifiés au cours de la cinétique, au nombre de 11 (Figure 68), sont beaucoup plus nombreux que les 3 métabolites attendus (cf. paragraphe 3.1, Figure 61).

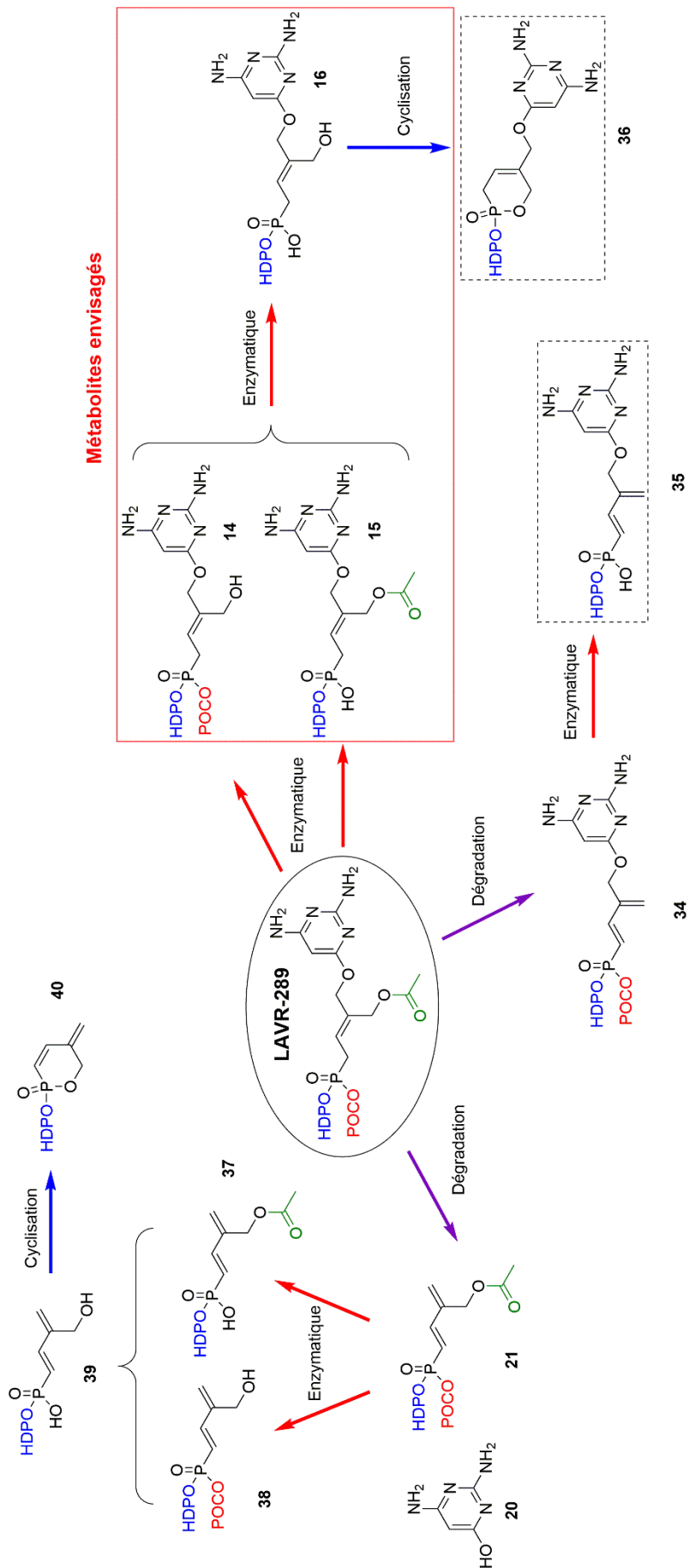


Figure 68 : Structures des métabolites plasmatiques du LAVR-289

Les résultats obtenus sont **seulement qualitatifs** et nous informent sur les structures potentielles des composés issus du LAVR-289 présents dans le plasma. En effet, comme mentionné précédemment, le standard interne et le LAVR-289, ayant pourtant en commun la même base pyrimidine, ne répondent pas de la même manière au sein de la source ESI. Les 11 composés détectés ayant des structures différentes, il sera donc difficile de les quantifier sans gamme d'étalonnage de chacun de ces composés. Cette étape ne peut cependant s'effectuer sans la possession d'une masse minimale de chaque composé pur obtenue après synthèse ou extraite et purifiée d'un échantillon de plasma. L'obtention de ces composés servirait aussi à étudier leur toxicité. Pour rappel, la synthèse et la caractérisation des métabolites font partie du cahier des charges du développement d'un médicament.

De cette étude nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- ✓ Les métabolites théoriques (**14**, **15**, **16**) que nous avons anticipés (cf. paragraphe 3.1) se retrouvent bien dans le plasma (encadrés en rouge sur la Figure 68). Les composés **14** et **15** sont retrouvés dès la 2^{ème} minute d'incubation tandis que le composé **16** n'apparaît qu'au bout de 4 h d'incubation.
- ✓ Les deux composés comportant un système diénique, **21** et **34**, ainsi que la DAPy **20** sont présents en milieu plasmatique dès t = 0 h. Les groupements acétate et POC du composé **21** sont ensuite clivés par les enzymes du plasma humain pour former respectivement les composés **37** et **38**, qui conduiront finalement au même composé **39**. Nous faisons l'hypothèse que le composé **40**, observé à partir de 8 h, provient d'une cyclisation intramoléculaire du composé **39**.
- ✓ Un métabolite présentant une masse exacte de 554,3597 uma peut correspondre à deux structures (encadrées en pointillés dans la figure précédente) : le composé **35** résultant de la perte du groupement POC sur le composé **34** ou provenir d'une cyclisation intramoléculaire du composé **16** conduisant au composé **36**.
- ✓ Le LAVR-289, étant encore présent dans le plasma après 24 h d'incubation, a de grandes chances d'atteindre le milieu intracellulaire majoritairement inchangé. Son temps de demi-vie plasmatique de 6 h peut s'expliquer par la présence des deux produits de dégradation **21** et **34** pouvant eux aussi être substrats des enzymes plasmatiques. Ils sont donc en compétition avec le LAVR-289 et ses métabolites **14** et **15** retardant peut-être la dégradation du promédicament.

Parmi les métabolites identifiés, seuls trois avaient été anticipés. La mise en évidence des autres intermédiaires de biodégradation complexifie l'étude du métabolisme de la molécule d'intérêt.

3.9. Comparaison de la stabilité plasmatique de deux analogues du LAVR-289

En parallèle, la stabilité plasmatique de deux analogues du LAVR-289 a été déterminée afin de comparer l'influence des groupements biolabiles sur ce paramètre. En ce qui concerne le premier analogue synthétisé, le *bis*(POC)-LAVR (**41**), le groupement HDP est remplacé par un groupement POC. Pour le second analogue synthétisé (**42**), la modification s'est portée sur la double liaison : le groupement CH₂OH acétylé du LAVR-289 a été substitué par un atome d'hydrogène (Figure 69).

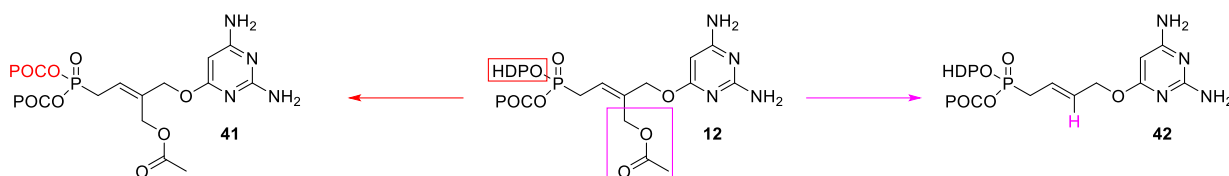


Figure 69 : LAVR-289 et ses analogues : (*Z*)-*bis*(POC)-LAVR (**41**) et (*E*)-LAVR-290 (**42**)

3.9.1. Analogue *bis*(POC)-LAVR

3.9.1.1. Métabolites théoriques

Notre choix s'est porté sur cet analogue afin d'étudier l'influence du groupement HDP sur la stabilité plasmatique. Pour cet analogue, les deux fonctions POC portées par le phosphonate, ainsi que le groupement acétate, peuvent être clivées dans le plasma pour libérer, théoriquement, le phosphonate **17** (Figure 70). La première fonction POC va être clivée par une carboxylestérase conduisant au dérivé « monoPOC » avec ou sans acétate (**44** ou **45**). Ces composés seront ensuite substrats d'une phosphodiesterase pour aboutir aux formes déprotégées de type phosphonate avec ou sans acétate (**46** ou **17**).

A partir des structures des métabolites identifiés pour le LAVR-289, nous avons établi les structures théoriques de ceux du *bis*(POC)-LAVR. Leur nombre passe de 9 à 17 composés (Figure 70). En effet, le *bis*(POC)-LAVR peut lui aussi former, la DAPy **20** et les systèmes diéniques, **47** et **51**, substrats des enzymes pouvant engendrer respectivement 2 et 6 métabolites. Le composé **17** peut également conduire à la forme cyclisé **50**. Pour cet analogue, contrairement au LAVR-289, les deux fonctions portées par le phosphonate peuvent être clivées extracellulairement par des carboxylestérases.

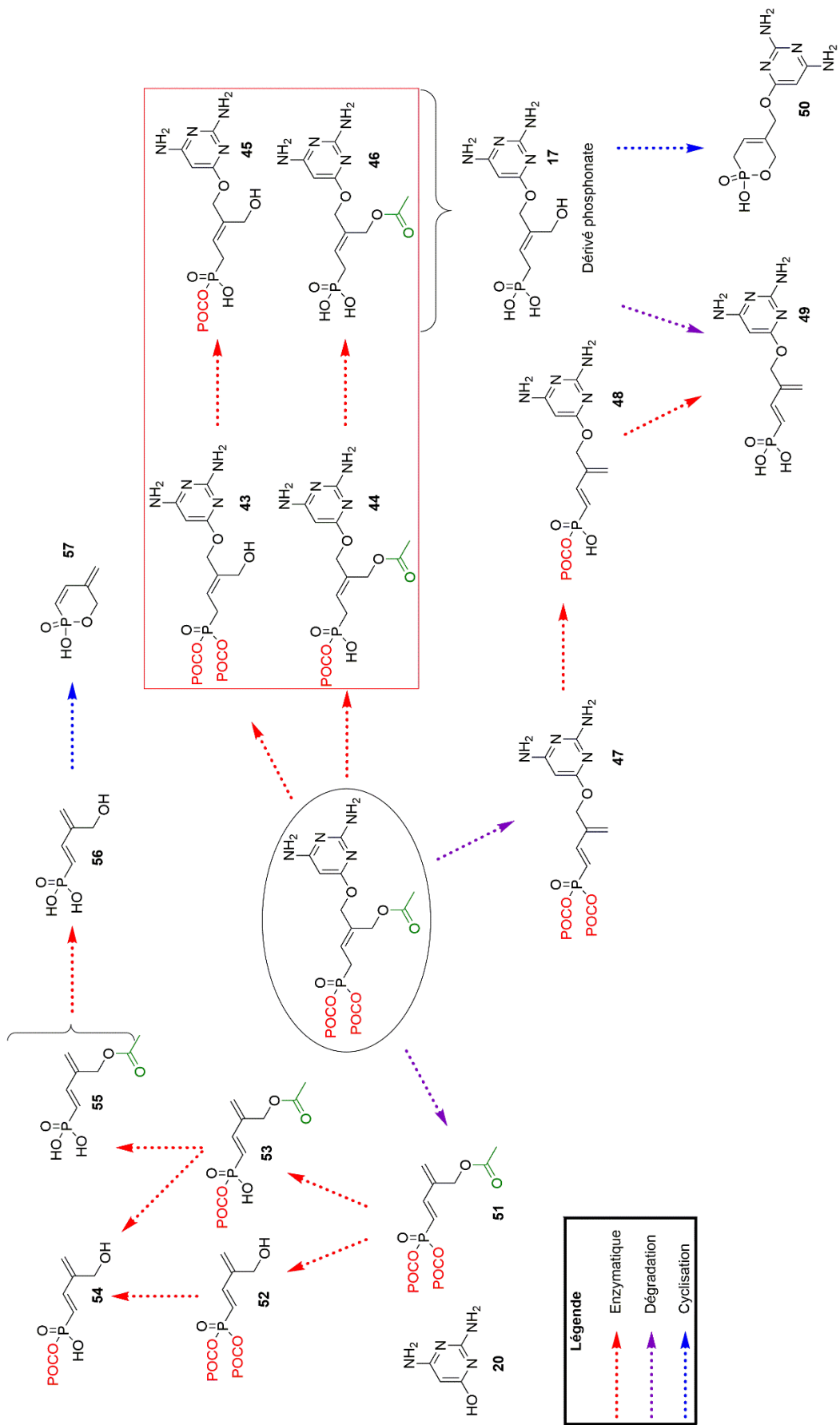


Figure 70 : Métabolites théoriques de l'analogue *bis(POC)*-LAVR

3.9.1.2. Synthèse du *bis*(POC)-LAVR

La synthèse de cet analogue débute par l'obtention du dérivé *bis*(POC)allylphosphonate **58**. Celui-ci est obtenu en faisant réagir le diméthyle allylphosphonate **4** avec le chlorométhylisopropyl carbonate (POCCI) en présence d'iodure de sodium dans l'acétonitrile à reflux. Cette réaction est relativement lente et nécessite 48 h à 72 h d'agitation à reflux pour obtenir une conversion totale et former le produit souhaité avec un rendement de 76% (Schéma 6).

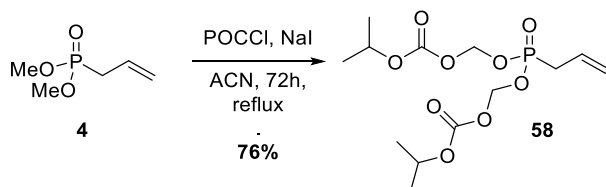


Schéma 6 : Synthèse du synthon *bis*(POC)allyle phosphonate

Ce composé est alors engagé dans une réaction de métathèse croisée avec le composé **10**, dans le dichlorométhane en présence du catalyseur NG-II. Les 15 mol% de catalyseur sont ajoutés en 5 fractions additionnées toutes les 3 heures. Après 24 h de réaction à reflux dans le DCM, sous ultrasons, le composé **59** est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, non séparables par chromatographie sur gel de silice, avec un rendement de 55%. La déprotection des amines par hydrolyse des carbamates en conditions acides dans du DCM conduit à l'obtention d'un mélange (1/1) des deux diastéréoisomères *Z* et *E*, avec un rendement de 85%. La purification sur colonne chromatographique de silice permet d'isoler le composé, **41**, l'analogue (*Z*)-*bis*(POC)-LAVR (Schéma 7).

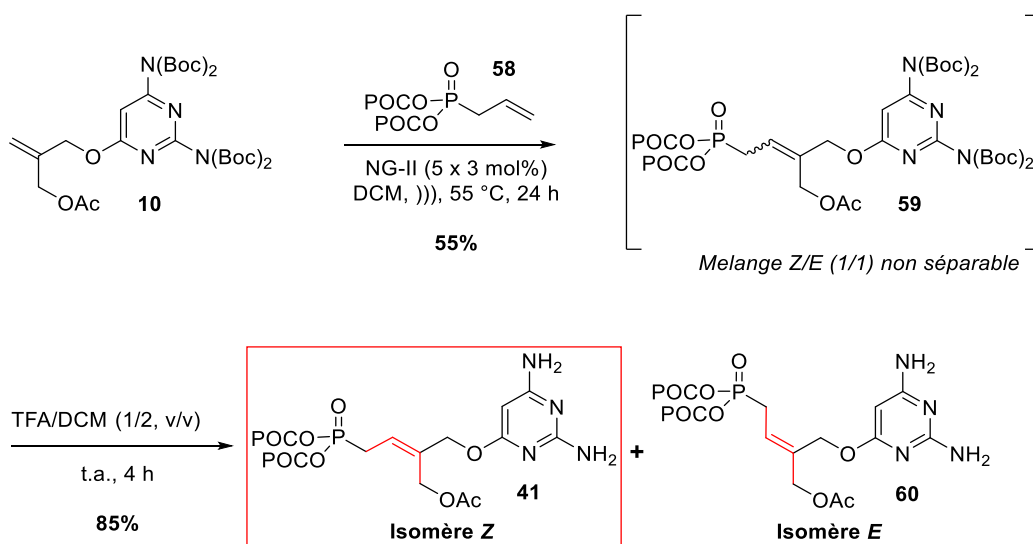


Schéma 7 : Synthèse de l'analogue *bis*(POC)-LAVR

3.9.1.3. Méthode analytique

Afin de pouvoir suivre la dégradation de ce composé en fonction du temps d'incubation dans le plasma humain, il a été nécessaire de changer de standard interne et d'adapter les conditions d'analyse. Le *bis*(POC)-LAVR étant plus polaire que le LAVR-289, les standards interne de type alkylbenzène ou

alkylphénol sont trop apolaires pour être utilisés comme standards. Afin d'utiliser un standard interne de la même famille que les benzène/phénol, le 2,4-diméthylphénol **61** a été choisi comme étalon interne pour cette expérience. Celui-ci possède un Log P de 2,3¹⁰⁰ comparable à celui de l'analyte **41** dont le log P estimé par le logiciel Marvin Sketch est de 2,47. L'injection du 2,4-diméthylphénol et du *bis*(POC)-LAVR, sur la colonne Poroshell Bonus RP-C18 (150 x 2,1 mm, 2,7 µm) avec un débit de 0,3 mL/min, une température de la colonne de 40 °C et une phase mobile ACN/H₂O (30/70 v/v), nous donne les conditions utilisées lors de sa stabilité plasmatique (Figure 71).

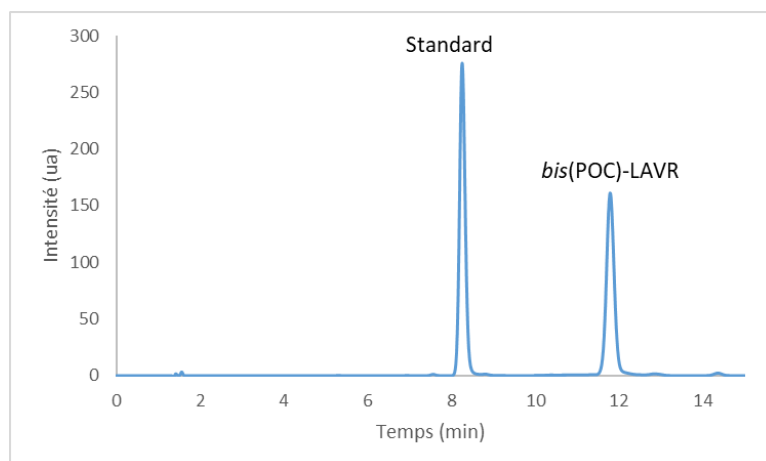


Figure 71 : Séparation LC-UV du *bis*(POC)-LAVR et du diméthylphénol (210 nm)

Dans ces conditions, le standard interne a un temps de rétention de 8,26 min et le *bis*(POC)-LAVR a un temps de rétention de 11,80 min.

3.9.1.4. Préparation des échantillons

➤ Préparation de la solution mère de *bis*(POC)-LAVR

Une première solution est préparée en dissolvant 11 mg du composé dans 500 µL de DMSO afin d'obtenir une concentration de 40 mM. 40 µL de cette dernière solution sont prélevés et dilués dans 960 µL de DMSO. La concentration de la solution de *bis*(POC)-LAVR utilisée pour cette expérience est de 1,56 mM.

➤ Préparation de la solution de standard interne

Une première solution de diméthylphénol est préparée en dissolvant 2,7 mg de ce composé dans 40 mL d'acétonitrile. Cette solution est ensuite diluée 10 fois afin d'obtenir la solution qui sera conservée au congélateur et utilisée pour précipiter les protéines du plasma. La concentration du standard interne est de 61 µM.

➤ Échantillons de plasma

Les échantillons ont été préparés en suivant le protocole détaillé au paragraphe 3.5. Pour cette expérience, 10 µL de la solution de *bis*(POC)-LAVR sont dilués dans le plasma. Les protéines sont

¹⁰⁰ Pubchem®. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7771> (accessed 2021-04-12).

précipitées par ajout de la solution d'acétonitrile froid, après 0 h, 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h et 4 h d'incubation, puis les surnageants sont analysés par HPLC-UV. La concentration du *bis*(POC)-LAVR à t_0 après précipitation est de 15,4 μM tandis que la concentration du standard interne est égale à 45,3 μM .

3.9.1.5. Détermination de la stabilité plasmatique de l'analogue *bis*(POC)-LAVR

Les résultats des analyses en HPLC-UV des surnageants sont regroupés dans le Tableau 10. En prenant en compte que le ratio $\frac{Aire_{LAVR-BisPOC}}{Aire_{\text{étalon interne}}}$ à t_0 équivaut à 100%, les pourcentages aux différents temps

d'incubation sont calculés comme suit : $\frac{Ratio_{t=x}}{Ratio_{t_0}}$ (Eq. 3)

Tableau 10 : Résultats du plasma *bis*(POC)-LAVR

Temps (h)	A _{étalon interne}	A _{bis(POC)-LAVR}	Ratio	% Restant
0	870,9	465,9	0,53	100
0,25	859,2	359,4	0,42	78,18
0,5	872,9	209,7	0,24	44,91
1	871,1	68,6	0,078	14,71
2	875,0	19,5	0,022	4,18
4	879,2	13,2	0,015	2,81

Afin de mieux visualiser le phénomène de dégradation, le pourcentage restant du *bis*(POC)-LAVR est tracé en fonction du temps d'incubation (Figure 72).

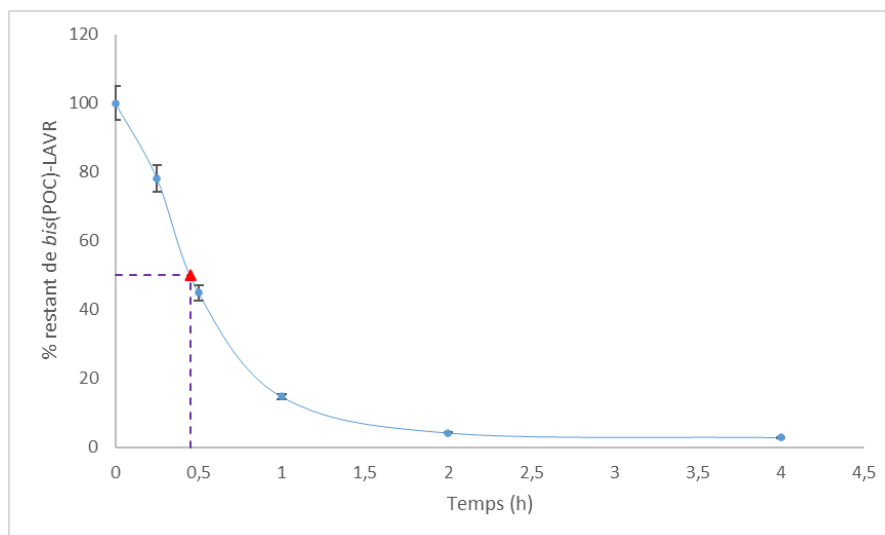


Figure 72 : Cinétique de dégradation du *bis*(POC)-LAVR

Le *bis*(POC)-LAVR a perdu 50% de sa concentration initiale en 27 min, ce qui est un temps 12 fois plus rapide que pour le LAVR-289. A titre de comparaison, le *bis*(POC)-ténofovir possède un temps de demi-vie de 20,5 min dans du plasma de chien.¹⁰¹ Ces résultats montrent qu'une prodrogue mixte HDP/POC

¹⁰¹ Arimilli, M.; Kim, C.; Dougherty, J.; Mulato, A.; Oliyai, R.; Shaw, J.; *et al.* Synthesis, in Vitro Biological Evaluation and Oral Bioavailability of 9-[2-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine (PMPA) Prodrugs. *Antivir. Chem. Chemother.* **1997**, *8*, 557–564.

est plus stable dans le plasma qu'une prodrogue *bis*(POC) et donc que le groupement HDP confère une stabilité supplémentaire très marquée à la molécule. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le groupement HDP n'est pas clivé par l'action d'une enzyme extracellulaire mais par la Lipase C qui est située au sein des cellules humaines. De plus, cette longue chaîne lipidique peut engendrer de l'encombrement stérique et donc protéger le groupement POC de l'action des enzymes de type estérase plasmatique.

Pour compléter cette étude, une analyse des échantillons en UPLC-HRMS permettra de confirmer la présence ou non des métabolites supposés (Figure 70) et de confirmer la présence de la forme phosphonate libre **17**.

3.9.2. Analogue LAVR-290

3.9.2.1. Métabolites théoriques

Afin d'étudier l'influence de la substitution de la double liaison et du groupement CH₂OAc sur la stabilité plasmatique du LAVR-289, un analogue a été synthétisé sans ce dernier groupement, le LAVR-290 (**42**). Le groupement CH₂OAc étant remplacé par un atome d'hydrogène, l'isomère de configuration *E* de l'analogue correspond à l'isomère *Z* du LAVR-289 (Figure 73), si l'on considère la relation trans entre la nucléobase et le phosphonate par rapport au plan de l'alcène.

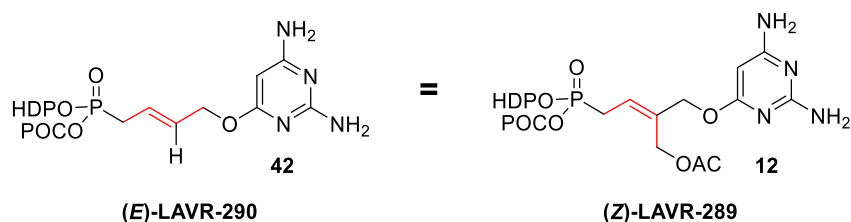


Figure 73 : Ressemblance structurale entre le LAVR-289 et l'analogue LAVR-290

La substitution de cette fonction par un hydrogène permet d'éliminer la formation de certains métabolites du LAVR-289. En effet, le composé comportant un système diénique **34**, résultant de l'élimination de l'acétate, ne pourra pas être formé. Ainsi, un seul groupement biolabile devrait être ciblé par les hydrolases plasmatiques, contrairement au LAVR-289, ce qui laisse présager un schéma métabolique plasmatique moins complexe en termes de nombre de produits formés. En effet, la molécule devrait conduire à l'obtention de 4 métabolites théoriques et non plus 9 (Figure 74).

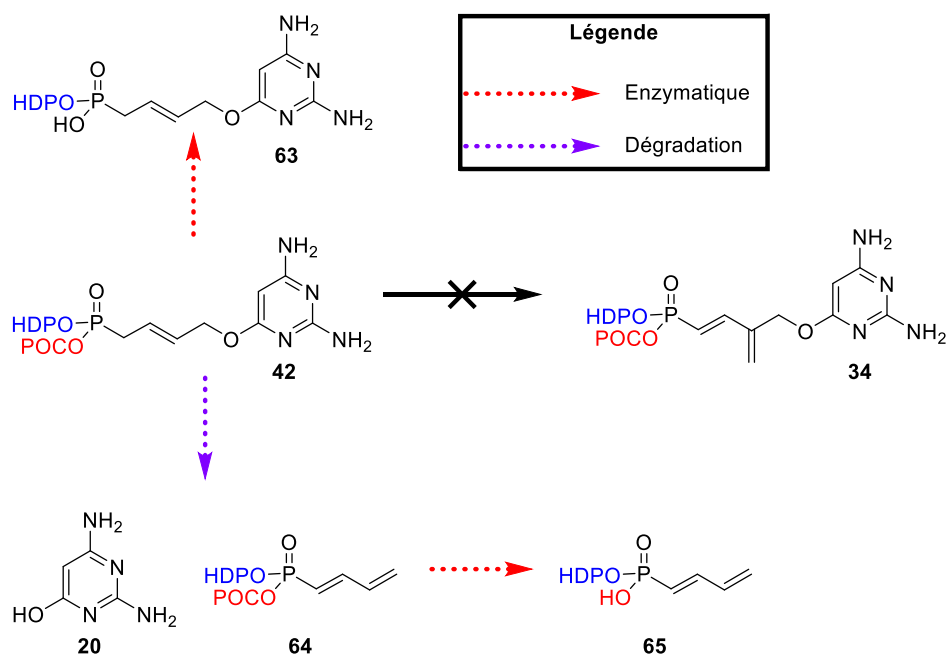


Figure 74 : Structures théoriques des métabolites du LAVR-290.

3.9.2.2. Synthèse du LAVR-290

La synthèse du LAVR-290 débute par l'obtention du dérivé 6-(but-2-ényloxy)pyrimidine-2,4-diamine protégé **67**. Celui-ci est préparé en appliquant le même protocole que précédemment : la 6-chloro-1,4-pyrimidine **7** subit une réaction de substitution nucléophile par un mélange équimolaire Z/E de crotyl alcool en présence de *tert*-butoxyde de sodium et de *tert*-butanol à 100 °C pendant 24 h, formant le dérivé **66** avec 25% de rendement. Les fonctions amines sont ensuite protégées par des groupements boc conduisant à l'oléfine désirée **67**, avec 67% de rendement (Schéma 8).

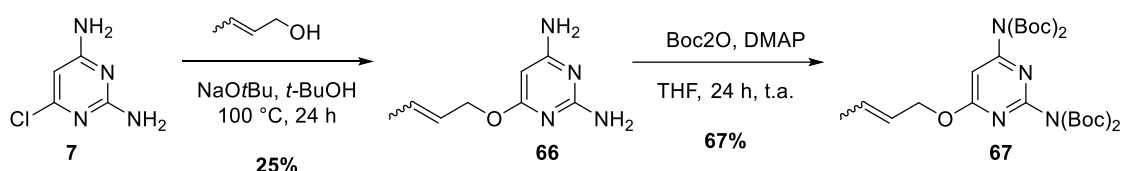


Schéma 8 : Préparation du dérivé **67**

Cet intermédiaire est ensuite engagé dans une réaction de métathèse croisée avec le composé **6** dans le dichlorométhane en présence de catalyseur NG-II. Trois mol% du catalyseur sont ajoutés toutes les 3 h jusqu'à obtenir finalement une addition de catalyseur de 15 mol%. Après 24 h de réaction à reflux dans le DCM, sous ultrasons, le composé **68** est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, non séparables par chromatographie sur gel de silice, avec un rendement de 30%. La déprotection des fonctions amines par le TFA dans le DCM conduit à l'obtention d'un mélange (8/2) des deux diastéréoisomères *E* et *Z* avec un rendement de 83%. La purification sur colonne chromatographique de silice permet l'obtention du composé, **42**, l'analogue (*E*)-LAVR-290 (Schéma 9) possédant la même configuration recherchée, au niveau de la double liaison, que celle du LAVR-289.

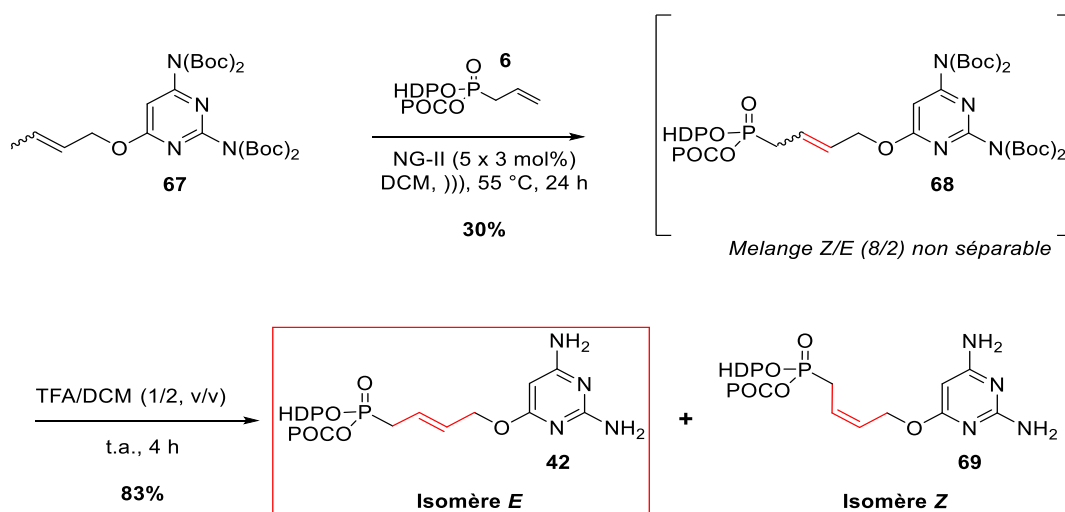


Schéma 9 : Synthèse du LAVR-290

3.9.2.3. Méthode analytique

La séparation chromatographique des isomères Z et E a été mise au point sur le mélange contenant 20% de l'isomère Z (Figure 75). Pour se faire la colonne Poroshell Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μ m) a été utilisée. En effet, les composés sont de structures similaires au LAVR-289 et devraient donc être séparables sur cette colonne. Les conditions d'analyse qui ont été retenues sont les mêmes que pour le LAVR-289 : une température de colonne de 40 °C, un débit de 0,3 mL/min, une phase mobile ACN/H₂O (72/28, v/v).

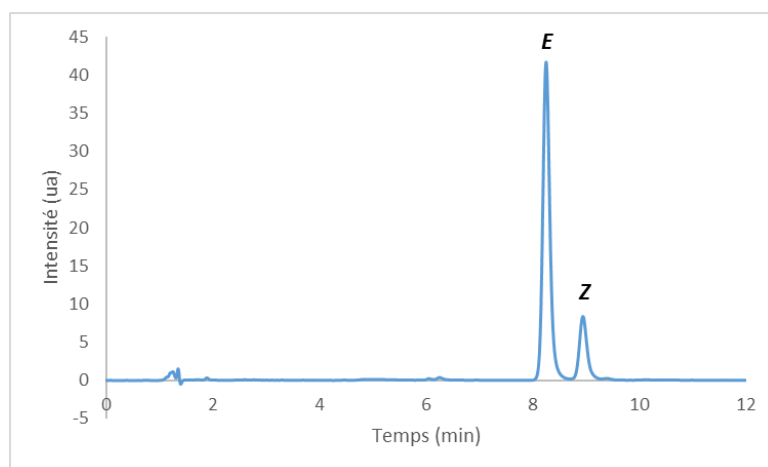


Figure 75 : LC-UV séparation du LAVR-290 et de son isomère

Bien que les conditions d'analyse soient les mêmes que pour le LAVR-289, l'analogue a un temps de rétention supérieur. En effet, la substitution du groupement CH₂OAc par un atome d'hydrogène confère à la molécule une lipophilie plus importante, avec un Log P estimé, par le logiciel Marvin Sketch®, à 7,39 pour le LAVR-289 et 8 pour l'analogue.

Pour cette étude, l'étalon interne est le même que celui utilisé pour le LAVR-289 : l'octylbenzène. En effet, les conditions d'analyses sont identiques et bien que l'analogue ait un temps de rétention légèrement supérieur à celui du LAVR-289, l'octylbenzène demeure optimal.

3.9.2.4. Préparation des échantillons

➤ Solution de LAVR-290

Une masse de 3,40 mg de LAVR-290, est solubilisée dans 5 mL de DMSO. La concentration molaire de cette solution, appelée **S1** est de 1,03 mM.

➤ Solution d'octylbenzène dans l'acétonitrile

6 µL d'octylbenzène pur sont dilués dans 25 mL d'acétonitrile. La concentration molaire de cette solution est de 1,08 mM. Cette solution est conservée au congélateur et servira à précipiter les protéines.

➤ Echantillon de plasma

Les échantillons ont été préparés suivant le protocole détaillé au paragraphe 3.5. 10 µL de la solution de LAVR-290 sont mis en contact avec le plasma. Les protéines sont précipitées, par ajout d'acétonitrile froid, après 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h d'incubation puis les surnageants sont analysés par HPLC-UV. La concentration du LAVR-analogue à t_0 après précipitation est de 9,9 µM tandis que la concentration du standard interne est égale à 0,8 mM.

3.9.2.5. Détermination de la stabilité plasmatique du LAVR-290

Les résultats d'analyse des surnageants sont répertoriés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats de l'incubation du LAVR-290 avec du plasma humain

Temps (h)	A _{étalon interne}	A _{LAVR-analogue}	Ratio	% Restant
0	144,2	91,2	0,63	100%
0,5	157,2	73,2	0,47	74%
1	164,4	48,4	0,29	47%
2	160,7	39,4	0,25	39%

Afin de mieux visualiser ce phénomène, le pourcentage restant de l'analogue en fonction du temps d'incubation est tracé (Figure 76).

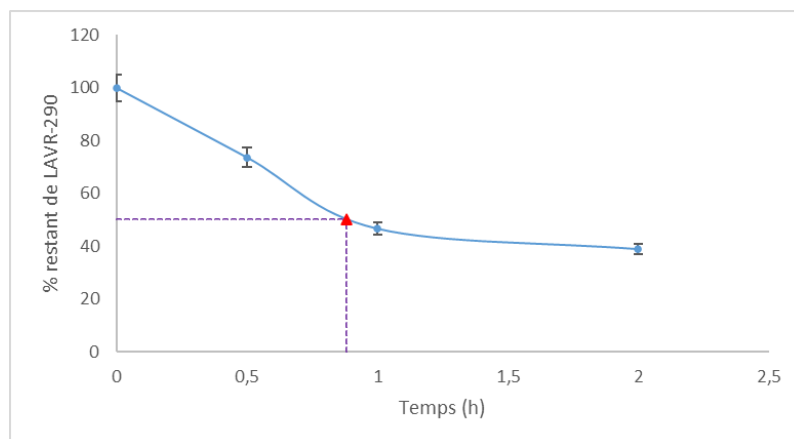


Figure 76 : Cinétique de dégradation du LAVR-290

Ce composé perd la moitié de sa concentration initiale au bout de 53 min, soit 6 fois plus rapidement que le LAVR-289. La présence d'un seul groupement biolabile et la génération de peu de produits substrats des enzymes peuvent expliquer cette différence. En effet, nous avons remarqué que la molécule était plus stable « chimiquement » et ne conduit que lentement à la formation du diène **64**. De ce fait, dans le milieu, les enzymes ciblent seulement la molécule d'intérêt, seule à posséder des groupements biolabiles. De ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence des composés **21** (« diène sans base ») et **34** (« diène avec base »), dans le plasma après incubation avec le LAVR-289, comportant la fonctionnalité POC, substrats des enzymes, pourraient conférer une stabilité plus importante au LAVR-289. Pour compléter cette étude, une analyse des échantillons en UPLC-HRMS permettra de confirmer la présence ou non des métabolites supposés (Figure 74) et potentiellement en identifier d'autres.

Pour conclure sur cette partie :

- ✓ La **stabilité plasmatique** du LAVR-289 a été déterminée, par HPLC-UV, avec un **temps de demi-vie de 6 h**.
- ✓ Le couplage chromatographique en phase liquide - masse haute résolution a permis de déterminer la **structure de métabolites** du LAVR-289 portant leur nombre à **11 composés**, mais cette étude reste **qualitative**.
- ✓ La présence des deux produits de « dégradation », présentant un système diénique ainsi que les groupements biolabiles HDP/POC, substrats des enzymes hydrolysant le LAVR-289 peut conférer une stabilité plus importante à ce dernier.
- ✓ **Les temps de demi-vie plasmatique de deux analogues**, le *bis*(POC)-LAVR et le LAVR-290 ont été mesurés à **27 et 53 min**, respectivement.

- ✓ Cette étude devra être complétée par une analyse **quantitative** en UPLC-HRMS. Pour ce faire, une gamme d'étalonnage de chacun des métabolites, **préalablement synthétisés**, devra être réalisée.

4. Stabilité au pH du LAVR-289

Dans l'étude pré-clinique d'une molécule, il est également important de connaître sa stabilité à différents pH.⁶⁹ Cette stabilité peut nous renseigner sur la voie d'administration à privilégier et sur la formulation à développer. Une molécule est considérée instable à partir du temps où elle a perdu **10% de sa concentration** initiale.¹⁰²

4.1. Mode opératoire

Pour réaliser cette étude, plusieurs solutions couvrant toute la gamme de pH ont été préparées (cf. partie expérimentale, paragraphe 10). Dans un premier temps, deux conditions extrêmes ont été étudiées : une condition en milieu acide fort, en présence d'une solution d'acide chlorhydrique (0,1 M, pH 1 et 0,01 M, pH 2), et une condition en milieu basique fort, en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,1 M, pH 13 et 0,01 M, pH 12). Le LAVR-289 est préalablement dissous dans du DMSO avant d'être ajouté avec un volume très faible dans chacune des solutions dont le volume final est fixé. Il est important que le volume de solvant organique ajouté, en l'occurrence du DMSO, soit le plus faible possible afin de ne pas modifier le pH des solutions. Celles-ci sont ensuite maintenues à 25°C et agitées par vortex puis analysées en HPLC-UV toutes les 20 min. Dans un second temps, la stabilité est réalisée dans des solutions dont les valeurs de pH sont comprises entre 2,34 et 10,21.

4.2. Stabilité en conditions basiques et acides forts

Les analyses des solutions de LAVR-289 en milieu acide fort et en milieu basique fort, nous ont permis de tracer les courbes de stabilité (Figure 77), où la limite de stabilité est représentée par la courbe en pointillés rouges. De ce graphique, nous pouvons affirmer que :

- ✓ La molécule se dégrade rapidement en milieu basique. En présence de NaOH (0,01 M, pH 12), le LAVR-289 a perdu 60% de sa concentration initiale en 40 min et est quasiment entièrement dégradé au bout de 6 h. A pH 13, (NaOH à 0,1 M), la dégradation est encore plus prononcée avec une perte de 50% de sa concentration initiale en seulement 2 min ; la molécule est entièrement dégradée au bout d'une heure.

¹⁰² Rignall, A. ICHQ1A(R2) Stability Testing of New Drug Substance and Product and ICHQ1C Stability Testing of New Dosage Forms. In *ICH Quality Guidelines*; Teasdale, A., Elder, D., Nims, R. W., Eds.; Wiley, 2017; pp 3–44.

- ✓ En milieu acide, la molécule apparaît stable à pH 2 (HCl à 0,01 M) et ne présente pas de dégradation significative au bout de 6 h. A pH 1 (HCl à 0,1 M), la dégradation de la molécule entraîne une perte de 10% de sa concentration initiale au bout d'1 h.

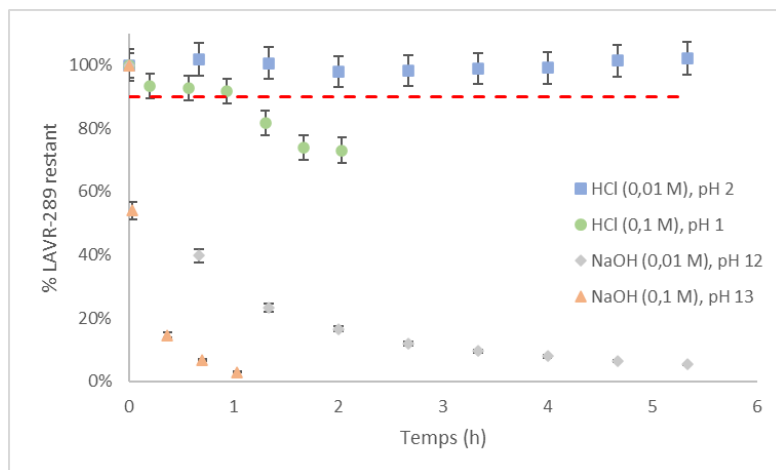


Figure 77 : Courbe de stabilité du LAVR-289 en présence de NaOH et HCl à 0,1 M et 0,01 M

4.3. Stabilité en fonction du pH

Après avoir obtenu la stabilité en milieu basique fort comparé au milieu acide fort, la stabilité aux pH intermédiaires a également été réalisée afin d'avoir une approximation sur la stabilité du LAVR-289 au pH sanguin (pH 7,4), à l'acidité de l'estomac (pH 1-2) et pH de l'intestin (pH 5-8) et au pH de la peau (pH 5-6).

Ces analyses nous permettent de mettre en évidence 4 domaines de stabilités :

- ✓ Aux valeurs de pH comprises entre 2,34 et 4,03, la molécule est stable durant au moins 6 h (Figure 78).

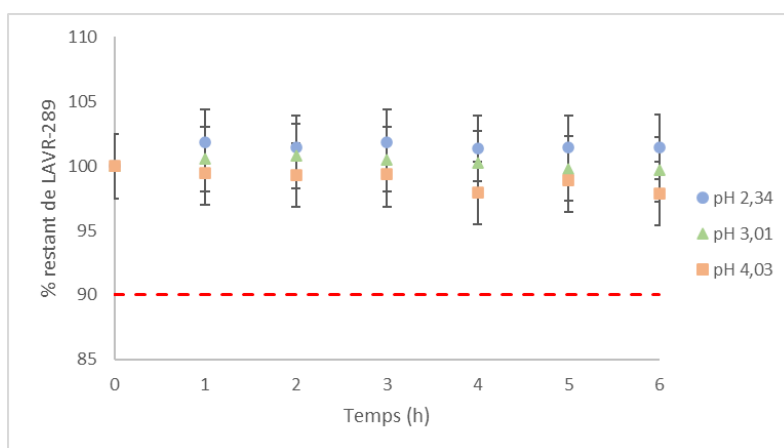


Figure 78 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 2,34 et 4,03

- ✓ Aux valeurs de pH comprises entre 4,83 et 5,56 la molécule subit une dégradation, moins prononcée qu'en milieu basique fort avec une perte de 10% de la concentration initiale en 1 h et 5 h, respectivement (Figure 79).

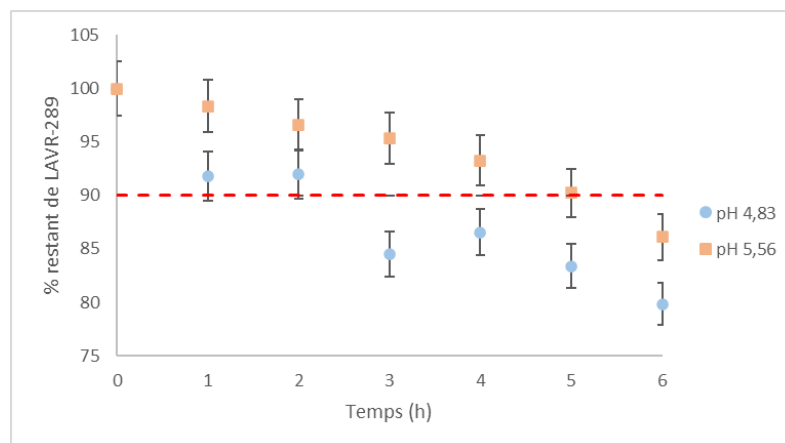


Figure 79 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 2,34 et 4,03

- ✓ Le LAVR-289 est également stable à pH 6,71 pendant 4 h, à pH 7,36 pendant 2 h et à pH 8,4 pendant 5 h (Figure 80).

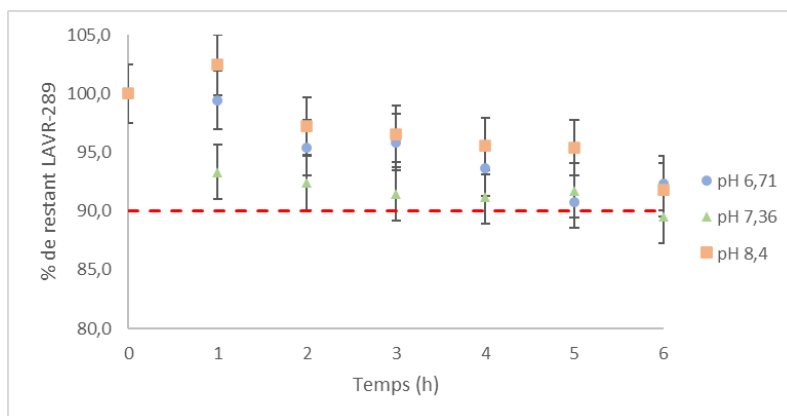


Figure 80 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 6,71 et 8,4

- ✓ La molécule est stable 2h et entre 3 et 5h pour des valeurs basiques de pH égales à 9,22 et 10,21, respectivement (Figure 81)

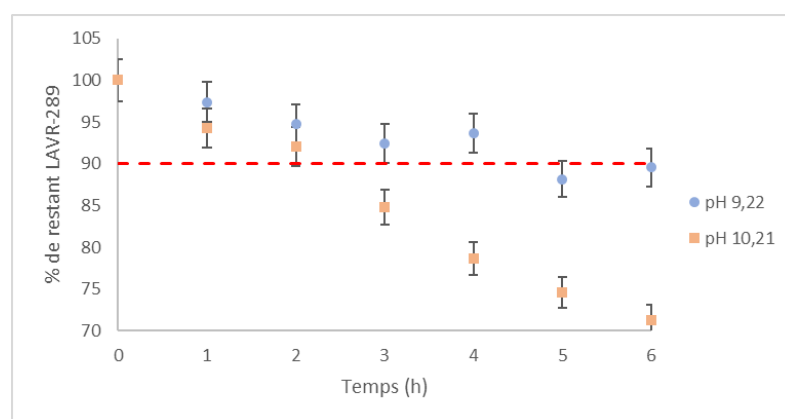


Figure 81 : Stabilité du LAVR-289 pour des pH compris entre 9,22 et 10,21

Aux valeurs de pH extrêmes, les résultats sont concordants avec ceux obtenus dans la partie précédente (cf. paragraphe 4.2). La molécule présente donc **deux domaines d'instabilité marqué**, aux pH basiques forts et aux pH autour de 4-5, qui correspondent aux valeurs de pH proches de son pKa (cf. paragraphe 7). Le LAVR-289 est ainsi **stable à pH acide**, celui-ci pourrait donc être administré par

voie orale. Au vu de la stabilité du LAVR-289 du LAVR-289 à pH sanguin, celui-ci pourrait être également administré par **voie intraveineuse**. Bien que le LAVR-289 montre une instabilité au pH de la peau à partir de 2 h, **la voie topique** pourrait être également envisageable car la diffusion de la molécule, à travers la peau, sera plus rapide que sa dégradation.

4.4. Identification des produits de dégradation

Durant ces expériences, il a été observé sur les chromatogrammes des solutions basiques fortes, à 230 nm, l'apparition d'un nouveau pic chromatographique dont l'aire augmentait en fonction du temps d'exposition du LAVR-289 dans ces solutions. Ce composé, ayant un temps de rétention de 10 min, devient majoritaire très rapidement. Bien que sur le chromatogramme (Figure 82) nous observons à 18 min le composé diénique **18**, et sa partie complémentaire la DAPy **20** éluée dans le pic chromatographique du DMSO, le nouveau composé semble largement supérieur en concentration que ces deux autres impuretés et montre un spectre UV spécifique (Figure 83).

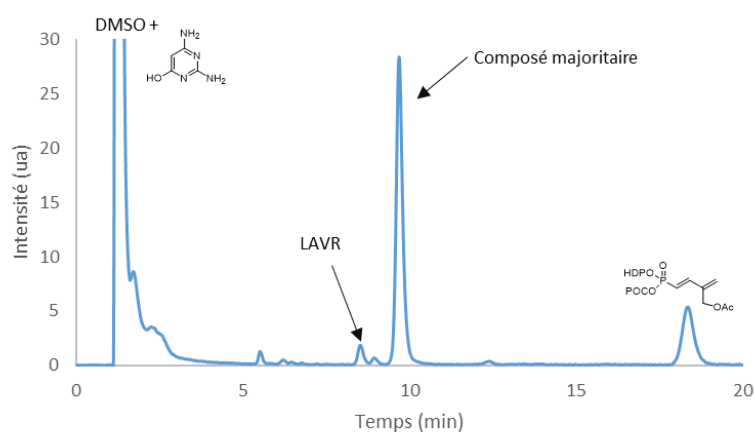


Figure 82 : Chromatogramme du LAVR-289 après 8 h dans NaOH (0,01 M)

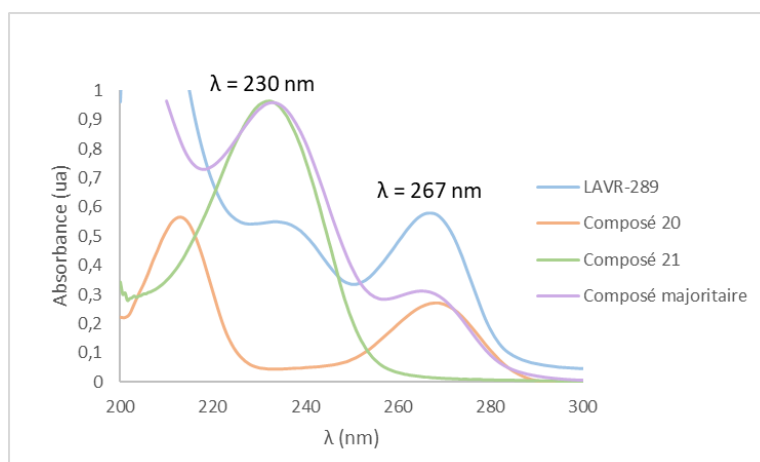


Figure 83 : Spectres UV du LAVR-289 et de ses produits de dégradation

A partir de ces différents spectres UV, nous avons pu remarquer que ce composé, légèrement plus hydrophobe que le LAVR-289, présentait, à *contrario* de ce dernier, une longueur d'onde maximale

d'absorption à 230 nm (tracé en gris sur la Figure 83) caractéristique d'un noyau pyrimidique substitué en position 6 par une fonction éther. De plus, ce composé présente également une absorbance à 267 nm, caractéristique du noyau pyrimidique. L'absorbance à 230 nm étant plus élevée qu'à 267 nm, celle-ci peut également correspondre à un système diénique. En corrélant ces informations avec les spectres UV du LAVR-289, du « diène sans base » **21** et de la DAPy **20**, ce composé semble posséder un noyau de type pyrimidique au sein de sa structure et avoir gardé la partie hydrophobe du LAVR-289 (comprenant la double liaison, la fonctionnalité phosphonate et la chaîne alkyle HDP).

Afin de caractériser ce nouveau composé et le composé élué à 18 min, une dégradation forcée, en présence de NaOH (0,01 M) sur une quantité plus importante de LAVR-289, a été réalisée. Après 8 h de mise en contact, la solution a été injectée sur la colonne Kromasil® (250 x 4,6 mm, 5 µm) avec une température de four de 40 °C, un débit de 1,5 mL/min avec une phase mobile MeOH/H₂O (9/1, v/v). Le choix s'est porté sur cette colonne en raison de sa capacité à supporter un volume d'injection de 100 µL de solution basique permettant de récupérer les fractions éluées en sortie de détecteur afin de pouvoir les analyser. Grâce aux injections successives de la solution basique (chromatogramme représenté en Annexe 1), le « diène sans base » **21** et le composé de structure inconnue ont ainsi été collectés. Leurs analyses en spectrométrie de masse haute résolution et en RMN 700 MHz, réalisée au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) (cf. partie expérimentale, paragraphe 2) ont permis de déterminer la structure du composé majoritaire et de confirmer celle du composé **21** (Figure 84).

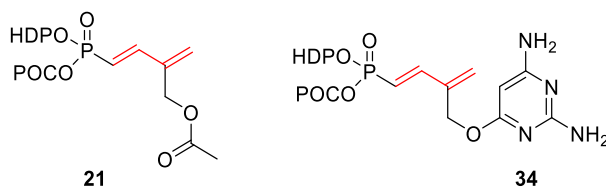


Figure 84 : Structures des diènes **21** et **34**

Pour ces deux composés, l'analyse ¹H présente deux pics caractéristiques des protons d'un vinyle phosphore et la constante de couplage confirme que la double liaison est de configuration *E*. (Figure 85).

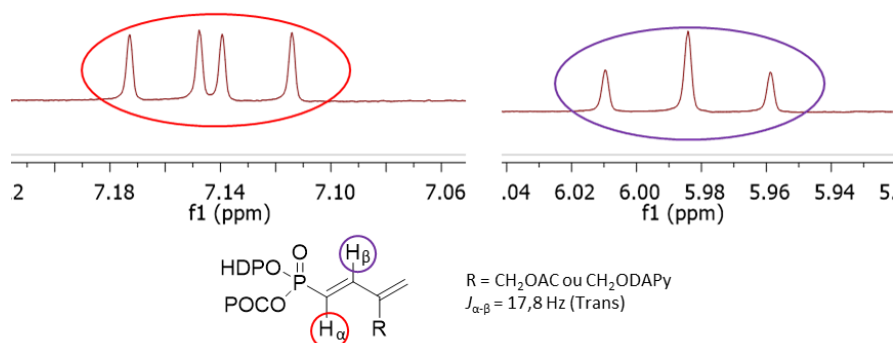


Figure 85 : Signaux RMN ¹H des protons des diènes en α et en β du phosphore

Comme observé précédemment, le composé **21** résulte bien de l'élimination de la base en formant le système diénique. Le composé **34**, également un diène, provient quant à lui de l'élimination du groupement acétate, qui rend le composé formé plus apolaire que le LAVR-289 (vérifié par son temps de rétention plus élevé que le promédicament antiviral). En effet, les log P calculés par le logiciel Marvin Sketch® sont de 7,39, 8,19 et 7,95 pour le LAVR-289, le « diène avec base » **34** et le « diène sans base » **21**, respectivement.

La présence de ces composés comme produits de dégradation traduit l'acidité du proton en α du phosphore (Schéma 10), l'acétate étant un groupe nucléofuge.

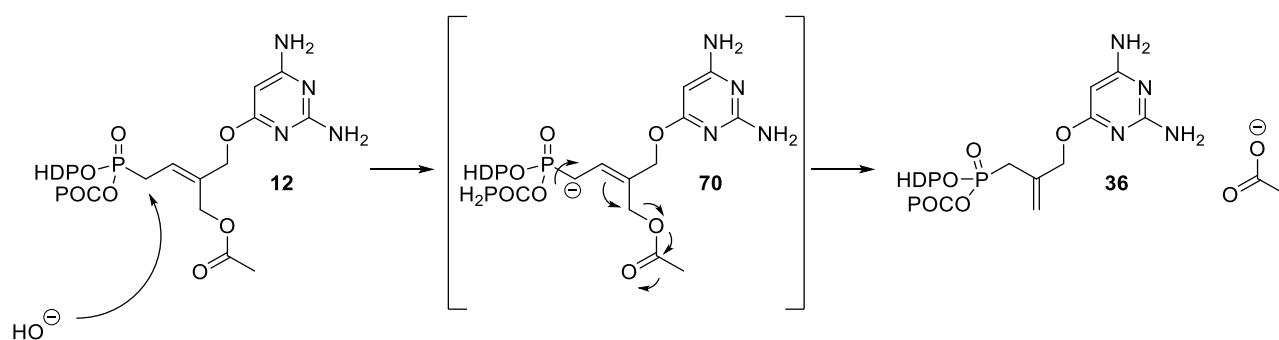


Schéma 10 : Mécanisme de formation du diène **34** en milieu basique

En milieu basique « le diène avec base » **34** est formé préférentiellement au « diène sans base » **21**. Cette formation peut s'expliquer par le fait que le pKa de l'acide acétique (4,76) est plus faible que celui de l'alcool de la 6-hydroxy-2,4-diaminopyrimidine (10,78)⁸⁹, donc que le groupement acétate est un meilleur groupement partant que la nucléobase.

Il est intéressant de mentionner que les diènes **21** et **34** présentent des structures similaires déjà rapportées dans la littérature en 1993¹⁰³ (Schéma 11).

¹⁰³ Harnden, M. R.; Parkin, A.; Parratt, M. J.; Perkins, R. M. Novel Acyclonucleotides: Synthesis and Antiviral Activity of Alkenylphosphonic Acid Derivatives of Purines and a Pyrimidine. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1343–1355.

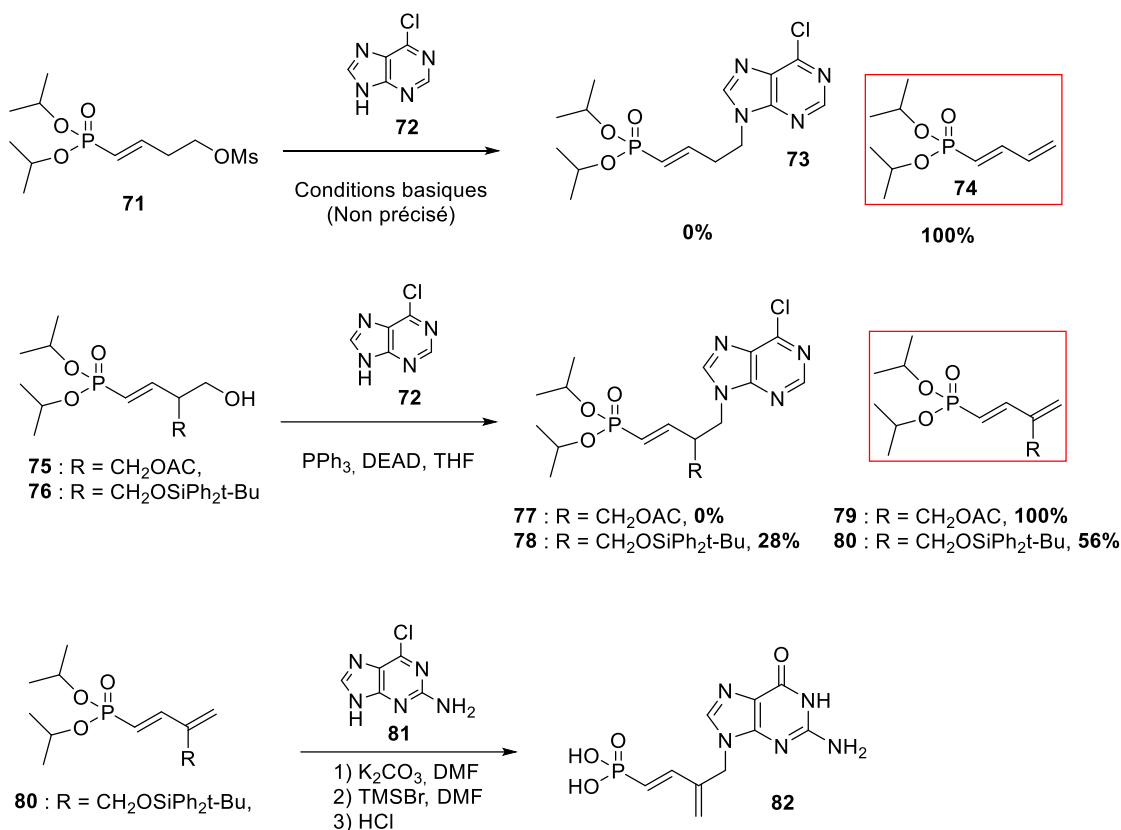


Schéma 11 : Structures des diènes rapportés dans la littérature

En effet, ces structures ont déjà été citées comme étant les produits non souhaités mais majoritairement formés lors de réaction de *N*-alkylation entre une base purique et un alkénylphosphonate. Par exemple, la réaction entre la 6-chloropurine **72** et le composé **71** en conditions basiques conduit à la formation exclusive du diène **74**. Les conditions de réaction de Mitsunobu entre le composé **75** et la 6-chloropurine **72** conduit exclusivement à la formation du diène **79**. Le remplacement de la fonction acétate par un groupement *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDS) **76** permet d'obtenir le diène **80** sans entraver la formation du produit *N9*-alkylé avec la 6-chloropurine **78** (28 % de rendement). Le phosphonate **82**, est quant à lui un produit non désiré obtenu en faisant réagir en conditions basiques le composé **80** et la 2-amino-6-chloropurine **81** suivi d'un clivage des fonctions *iso*-propyles et d'un traitement en milieu acide.

Ces produits de type phosphonate diénique montrent un squelette identique aux composés issus de la dégradation du LAVR-289. Ces quelques éléments issus de réactions chimiques décrites sur des structures proches, mais non identiques, ne peuvent qu'appuyer les résultats montrés sur le schéma de dégradation du LAVR-289 et la structure des composés formés lors de cette dégradation.

Bien que les mesures de toxicité et d'activité biologique des produits de dégradation soient des tâches à effectuer lors d'une étude pré-clinique d'un candidat principe actif, les quantités obtenues pour les composés **21** et **34** (les deux diènes issus du LAVR-289) ne sont pas suffisantes pour mener à bien ces

évaluations. Malgré cette difficulté, étant donné que **le produit 80**, (Schéma 11), doté d'une fonction diène conjuguée entre une base nucléosidique et un phosphonate, ne **présente aucune activité antivirale *in vitro*** sur les virus VIH, VZV et CMV,¹⁰³ il peut être émis l'hypothèse que **le composé 34**, produit de dégradation en milieu basique, mais aussi composé se retrouvant dans le plasma, **ne soit pas responsable de l'activité antivirale du LAVR-289**.

Lors de cette étude de « surcharge », un autre composé minoritaire éluant plus rapidement que le LAVR-289 et présentant le même spectre UV que ce dernier, a été isolé. Étant donné que la quantité obtenue n'était pas suffisante pour une caractérisation par RMN, seule une analyse HRMS a pu être réalisée. Cette molécule présente un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ de formule brute $C_{28}H_{51}N_4O_5P$ et de masse exacte 555,3670 uma. À partir de ces informations et au vu de la structure du LAVR-289, deux isomères de constitution peuvent correspondre (Figure 86).

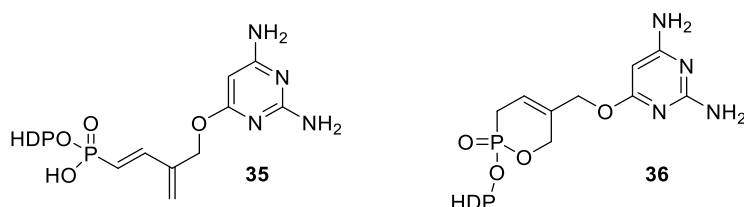


Figure 86 : Structures potentielles du composé de formule brute $C_{28}H_{51}N_4O_5P$

L'un des composés **35** résulterait de la perte du groupement POC sur le composé **34**. La seconde structure **36** proviendrait du LAVR-289 qui subirait, dans un premier temps, une hydrolyse du groupement POC et, dans un deuxième temps, une cyclisation intramoléculaire entre le phosphonate et le CH_2 en alpha de l'acétate provoquant son élimination (Schéma 12).

Le spectre UV de ce composé étant similaire à celui du LAVR-289 et non à celui du composé **34** (« diène avec base ») nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le composé formé serait celui présentant un motif oxaphosphinane.

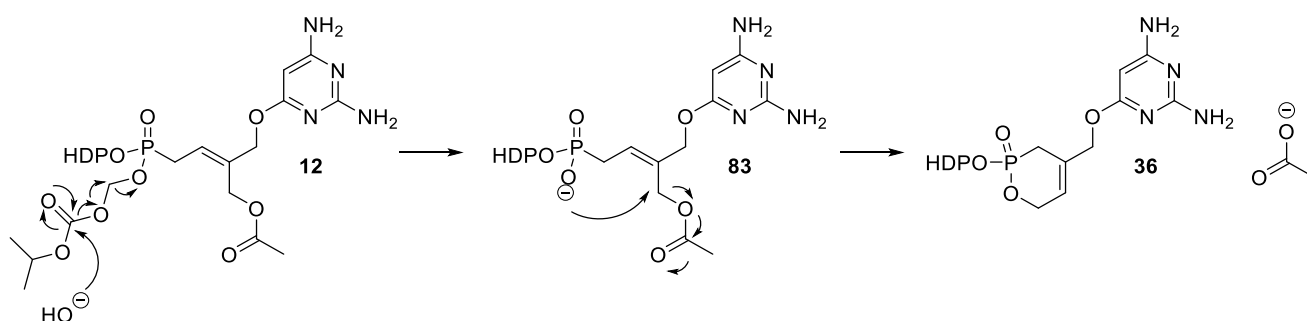


Schéma 12 : Proposition du mécanisme pour la formation du composé **36**

Il est, par ailleurs, intéressant de mentionner que des promédicaments présentant un phosphonate cyclique ont été répertoriés comme ANPs dans la littérature (Figure 87). Il est possible de citer le

cHPMPDAP-HDP, analogue du HPMPDAP, et le Cidofovir-HDP, dérivé du brincidofovir, qui présentent tous deux une activité antivirale sur le virus de la vaccine de 11 nM¹⁰⁴ et 16 μM¹⁰⁵, respectivement.

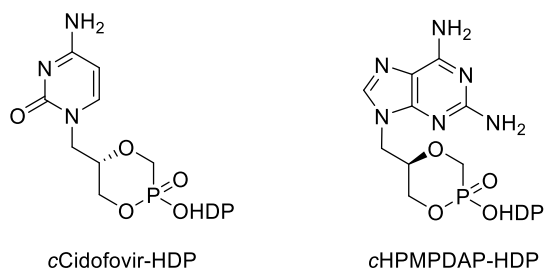


Figure 87 : Exemples de prodrogues cycliques dans la littérature

Bien que ces composés aient présenté des activités moins élevées que leur analogue non cyclique, il serait intéressant d'évaluer l'activité de notre composé **36**, purifié sur colonne semi-préparative en phase inverse après dégradation basique du LAVR-289, et de comparer son efficacité et sa toxicité à celles du LAVR-289.

Cette expérience de stabilité nous a permis de :

- ✓ Mettre en évidence que le LAVR-289 est **stable pour des pH inférieurs à 4** et que celui-ci est très **sensible aux milieux basiques** en se dégradant majoritairement en composé **34** (« diène avec base »).
- ✓ Montrer une instabilité du LAVR-289 aux valeurs de pH proche de son pKa, pour des pH compris dans une zone de valeurs supérieures à 4 et inférieures à 6.
- ✓ Déterminer la structure du composé **34** par une analyse HRMS et une analyse des spectres UV qui a été confirmé par RMN. Ce « diène avec base » présente une structure similaire déjà rapporté dans la littérature qui ne présente pas d'activité antivirale *in vitro*.
- ✓ Confirmer la structure du « diène sans base » **21** par une analyse RMN.

Grâce à ces informations, une formulation sous forme de sel, couramment utilisée pour augmenter la solubilité des molécules, peut-être envisagée pour le LAVR-289. Comme cette molécule a un pKa de 5,07 (cf. paragraphe 7), il faudra utiliser un contre-ion (anion) issu d'une molécule dont le pKa est inférieur à 3 (pKa_{LAVR} -2) car la formation de sel à lieu quand ΔpKa > 2.¹⁰⁶ Durant la synthèse (cf.

¹⁰⁴ Krečmerová, M.; Holý, A.; Andrei, G.; Pomeisl, K.; Tichý, T.; Břehová, P.; Masojídková, M.; *et. al.* Synthesis of Ester Prodrugs of 9-(S)-[3-Hydroxy-2-(Phosphonomethoxy)Propyl]-2,6-Diaminopurine (HPMPDAP) as Anti-Poxvirus Agents. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6825–6837.

¹⁰⁵ Keith, K. A.; Wan, W. B.; Ciesla, S. L.; Beadle, J. R.; Hostetler, K. Y.; Kern, E. R. Inhibitory Activity of Alkoxyalkyl and Alkyl Esters of Cidofovir and Cyclic Cidofovir against Orthopoxvirus Replication In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1869–1871.

¹⁰⁶ Cruz-Cabeza, A. J. Acid–Base Crystalline Complexes and the pKa Rule. *CrystEngComm.* **2012**, *14*, 6362.

paragraphe 1.1), un sel de trifluoracétate ($pK_a = 0,52^{107}$) a été observé lors de la déprotection des groupements boc (Figure 88), nous permettant d’isoler directement le LAVR-289 formulé sous forme de sel. Cependant, parmi les médicaments approuvés par la FDA entre 1939 et 2020 utilisant un contre-ion dérivé d’acide carboxylique, aucun n’a été formulé avec le TFA.¹⁰⁸ C’est pourquoi un traitement aqueux basique après déprotection, nous permet d’obtenir le LAVR-289 sous forme neutre.

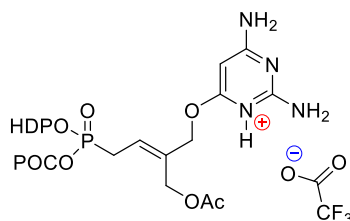


Figure 88 : Sel de trifluoracétate de LAVR-289

A la place, l’utilisation d’un sel de chlorure pourrait être envisageable comme contre-ion à partir d’HCl ($pK_a -8$). Celui-ci est grandement utilisé dans la formulation de médicaments puisqu’entre 2015 et 2019, 29% des formulations sous forme de sel approuvé par la FDA, le sont sous la forme de « chlorhydrate ».¹⁰⁹

La formation de sel aurait pour but **d’augmenter la stabilité** du LAVR-289 en empêchant éventuellement la formation du diène **21** et de diminuer également l’hydrophobie de la molécule. En effet, selon le logiciel de calcul MarvinSketch® le Log P du LAVR-289 est de 7,39 pour la forme neutre et de 5,34 pour la forme protonée. Cependant, cette dernière reste très élevée pour considérer la molécule comme soluble dans l’eau et la formation de sel ne permettrait pas de compenser suffisamment l’hydrophobie apportée par le groupement HDP.

5. Détermination du Log P du LAVR-289

Le coefficient de partage octanol-eau, ou Log P, est une donnée importante et précieuse dans la conception et la formulation d’un nouveau candidat médicament. Comme mentionné dans le chapitre d’introduction, les médicaments sont répartis en 4 catégories en fonction de leur solubilité aqueuse et de leur perméabilité cellulaire. De ces paramètres cruciaux va dépendre la formulation du médicament. La connaissance du Log P va permettre de positionner la molécule dans cette « BCS » et va surtout nous informer sur le caractère hydrophobe ou hydrophile des composés. Dans le cas d’une

¹⁰⁷ Acharya, P. C.; Marwein, S.; Mishra, B.; Ghosh, R.; Vora, A.; Tekade, R. K. Role of Salt Selection in Drug Discovery and Development. In *Dosage Form Design Considerations*; Academic Press, 2018; pp 435–472.

¹⁰⁸ Bharate, S. S. Carboxylic Acid Counterions in FDA-Approved Pharmaceutical Salts. *Pharm. Res.* **2021**, *38*, 1307–1326.

¹⁰⁹ Bharate, S. S. Recent Developments in Pharmaceutical Salts: FDA Approvals from 2015 to 2019. *Drug Discov Today.* **2021**, *26*, 384–398.

molécule pouvant être protonée, ce paramètre va dépendre du pH.¹¹⁰ Pour les études d'un nouveau médicament, l'étude est effectuée à pH 7,4 afin de mimer le pH physiologique du sang, on parle alors de Log D_{7,4}. En outre, ce paramètre est accepté par la plupart des scientifiques comme l'un des descripteurs de lipophilie le plus pertinent à appliquer dans les études ADMET. La valeur de ce paramètre va avoir un impact sur le développement du médicament¹¹¹ (Tableau 12).

Tableau 12 : Impact du Log de D sur le développement d'un médicament (adapté de Comer *et al.*¹¹¹)

Log D _{7,4}	Impacts sur le développement
< 0	Problème de perméabilité intestinale et du SNC Possibilité d'une clairance rénale
0-1	Bon équilibre entre perméabilité et solubilité
1-3	Bonne pénétration dans le SNC Gamme optimale pour les médicaments administrés par voie orale Faible susceptibilité au métabolisme
3-5	La solubilité commence à devenir un problème Susceptibilité au métabolisme accrue
> 5	Faible solubilité et faible biodisponibilité orale Absorption aléatoire Haute susceptibilité au métabolisme, bien que l'efficacité puisse encore être élevée

Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes pour déterminer ce paramètre, telles que la méthode de suivi potentiométrique, la rétention en HPLC en phase inverse ou encore la méthode Shake Flask.¹¹¹ Par la suite nous nous focaliserons sur ces deux dernières.

5.1. Détermination du Log P par la méthode « shake flask »

5.1.1. Principe

La première méthode est la méthode « Shake Flask »¹¹² (adaptée pour $-2 < \text{Log P} < 4$) qui consiste à mettre en équilibre le composé d'intérêt en contact avec deux phases qui sont, au préalable, saturées entre elles : une phase aqueuse, à pH 7,4, saturée en octanol, et une phase organique (l'octanol) non miscible avec l'eau, saturée en eau. Une fois l'équilibre thermodynamique atteint, le rapport des concentrations du composé entre les deux phases est mesuré et ce résultat permet de déterminer le Log P selon l'équation suivante :

¹¹⁰ Scherrer, R. A.; Howard, S. M. Use of Distribution Coefficients in Quantitative Structure-Activity Relations. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 53–58.

¹¹¹ Comer, J. E. A. High-Throughput Measurement of Log D and pKa. In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Van De Waterbeemd, H., Lennernäs, H., Artursson, P., Eds.; Wiley, 2003; 21–45.

¹¹² OECD Guideline for the testing of chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. OECD Guideline No. 107, 1995.

$$\text{Log } P_{\text{composé}} = \text{Log} \left(\frac{[\text{composé}]_{\text{éq}_{\text{octanol}}}}{[\text{composé}]_{\text{éq}_{\text{eau}}}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

La mesure de la concentration du composé dans la phase aqueuse, ou dans l'octanol, peut s'effectuer en spectrophotométrie UV-visible ou par HPLC en phase inverse.

Cette méthode « Shake Flask » a toutefois des limitations dont la plus courante est la formation de microémulsions qui peuvent être stables pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, empêchant la séparation des deux phases et donc impactant les analyses. De plus, cette méthode n'est pas adaptée aux composés très hydrophiles et très lipophiles. En effet, pour les composés apolaires dont le Log P risque d'être supérieur à 4, la concentration retrouvée dans l'eau après équilibre sera extrêmement faible. Sa détermination va être difficile et va dépendre de la limite de quantification de la méthode d'analyse. De nombreuses études ont été publiées afin d'améliorer et d'optimiser cette méthode mais le Log P maximal mesuré est quasiment toujours inférieur à 5.^{113,114}

5.1.2. Application au LAVR-289

Dans un premier temps, une estimation du Log P du LAVR-289 par le logiciel Marvin Sketch® a été obtenue. La valeur théorique calculée par le logiciel est de 7,38. Bien que cette valeur « théorique » soit supérieure à la valeur limite de Log P pour la méthode « shake flask », nous avons tout de même essayé de déterminer ce paramètre par cette méthode. En effet, celle-ci est la méthode recommandée par la Pharmacopée Européenne et la FDA dans le développement d'un médicament.

Néanmoins, nous avons été confrontés à plusieurs problèmes :

- La présence de la 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine

La présence systématique, même faible, du composé **20** dans les échantillons de LAVR-289 peut engendrer des erreurs sur la mesure du Log P. En effet, ce composé polaire va en grande partie passer de la phase octanol à la phase aqueuse et risque ainsi d'impacter la solubilité aqueuse du LAVR-289. D'ailleurs, après équilibre et analyse de la phase aqueuse en spectroscopie UV et en HPLC-UV nous avons seulement retrouvé la DAPy.

De plus, la concentration maximale de LAVR-289 pouvant être observée dans la phase aqueuse était très faible pour être détectée par HPLC-UV.

En effet, en prenant en compte l'équation du Log P, nous pouvons écrire l'équation suivante :

$$[\text{LAVR}]_{\text{éq}_{\text{eau}}} = [\text{LAVR}]_{\text{éq}_{\text{octanol}}} \times 10^{-7,38} \quad (\text{Eq. 5})$$

¹¹³ Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; *et. al.* Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (logD) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191.

¹¹⁴ Schönsee, C. D.; Bucheli, T. D. Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Selected Natural Toxins. *J. Chem. Eng. Data.* **2020**, *65*, 1946–1953.

En se basant sur cette équation et en considérant par exemple une solution de LAVR-289 à 1 M dans l'octanol, après équilibre, la concentration de LAVR-289 dans la phase aqueuse devrait valoir $4,17 \cdot 10^{-8}$ M, soit 41,7 nM. Cette valeur est inférieure à la limite de quantification de notre méthode, et même plus basse que la limite de détection.

➤ Le prélèvement de la phase aqueuse

L'octanol est moins dense et beaucoup plus visqueux que l'eau, ce qui rend compliqué le prélèvement de la phase aqueuse en passant par la phase surnageante. En effet, l'aiguille traverse la phase octanol avant la phase aqueuse et une partie du LAVR-289 contenu dans l'octanol se retrouve dans l'échantillon d'eau prélevé et fausse donc les résultats. En effet, l'analyse de la phase aqueuse, en HPLC-UV, présente un pic chromatographique trop important pour le LAVR-289.

➤ L'analyse de la phase octanol

Au vu du Log P, l'analyse de la phase octanol en HPLC-UV n'aurait pas été d'une grande utilité. En effet, la quantité qui s'échange de la phase octanol à la phase aqueuse est tellement faible qu'il n'est pas possible de mesurer une si petite variation de concentration.

Au vu des difficultés rencontrées, nous avons envisagé de déterminer le Log P du LAVR-289 par la méthode de rétention en chromatographie en phase inverse.

5.2. Détermination du Log P par chromatographie

5.2.1. Principe

La méthode moins conventionnelle pour calculer ce paramètre est l'utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse.¹¹⁵ Une substance chimique injectée sur une colonne se partage entre la phase mobile et la phase greffée hydrocarbonée de type « huile ». Les substances chimiques sont retenues proportionnellement à leur coefficient de partage « phase greffée » - eau. Les composés les plus polaires auront un temps de rétention inférieur aux composés les plus apolaires. La connaissance du temps de rétention permet donc de déterminer le facteur de capacité k qui est donné par l'expression suivante :

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (\text{Eq. 6})$$

où t_0 est le temps mort de la colonne, généralement mesuré avec l'uracile sur phase octadécyle et t_r est le temps de rétention du composé d'intérêt.

Une fois le facteur de capacité déterminé, le coefficient de partage peut être calculé de manière expérimentale, *via* l'équation suivante :

¹¹⁵ OECD Guideline for the testing of chemicals. Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method. OECD Guideline No. 117, 2014 (corrected 2022).

$$\text{Log } P = a \text{ Log } k + b \quad (\text{Eq. 7})$$

où a et b sont des coefficients de régression linéaire.

Pour effectuer les mesures, le choix de la colonne s'est porté sur la colonne Kromasil® de type C18 (2,1 x 100 mm, 3,5 µm).

5.2.2. Application au LAVR-289

En se basant sur le Log P théorique de 7,39 du LAVR-289 calculé par le logiciel MarvinSketch®, nous avons utilisé une phase mobile ACN/H₂O (75/25, v/v) qui permettait de l'éluer en moins d'une demi-heure. L'uracile et 24 autres composés ont été analysés en mode isocratique avec un débit de 0,5 mL/min et une température du four fixée à 25 °C. Les résultats sont répertoriés en Annexe 2. Parmi les composés analysés plusieurs appartiennent à la même famille chimique tels que les dérivés phényles et phénols. Deux promédicaments d'ANPs, à savoir le ténofovir disoproxyl et l'adéfovir dipivoxil, ont été ajoutés au modèle. Le brincidofovir étant chargé dans nos conditions d'analyse, celui-ci n'a pas pu être intégré au modèle. En effet, le pic chromatographique du brincidofovir est dédoublé et la valeur de son temps de rétention est beaucoup trop faible en comparaison de son Log P théorique de 4,53. A partir de ces résultats, nous pouvons tracer la droite Log P = f(Log k) représentée sur la Figure 89.

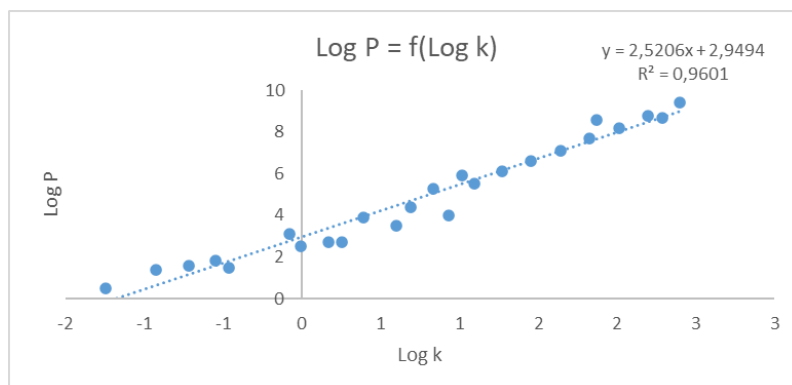


Figure 89 : Log P = f(Log k)

En utilisant l'équation de la droite, et en injectant, dans les mêmes conditions, des composés de coefficient de partage inconnu, le paramètre Log P peut être déterminé (Tableau 13).

Tableau 13 : Valeurs de Log P de plusieurs molécules synthétisées au laboratoire

Composés	Tr _{moyenne} (min)	k	Log k	Log P _{calculé}	Log P _{théorique} *
LAVR-289	24,12	53,41	1,73	7,33	7,38
LAVR-290 (42)	31,30	70,14	1,85	7,60	8,00
2,4-diamino-6-octyloxy-pyrimidine (31)	1,00	1,25	0,10	3,12	3,20
2,4-diamino-6-tétradécyloxy-pyrimidine (32)	7,15	15,13	1,18	5,92	5,87
2,4-diamino-6-hexadécyl-pyrimidine (33)	16,90	37,12	1,57	6,92	6,76

* Les valeurs ont été déterminées par le logiciel Marvin Sketch®

A l'aide de ce modèle, nous avons pu déterminer le coefficient de partage du LAVR-289 qui est de 7,33. Cette valeur est proche de la valeur théorique de 7,38. Ce modèle nous a permis également de mesurer le coefficient de partage d'autres composés tels que le LAVR-290 (7,60). Nous remarquons bien que celui-ci est plus hydrophobe que le LAVR-289 et que le groupement CH₂OAC diminue légèrement la lipophilie de ce composé. Les coefficients de partage des dérivés alkyles de la DAPys ont également été mesurés afin de s'assurer que la base pyrimidique, de nature polaire, ne faussait pas notre modèle. Les valeurs de Log P de 3,12, 5,92, et 6,92 pour les dérivés C8, C14 et C16, respectivement, sont très proches des valeurs théoriques ce qui confirme que ce modèle est bien adapté pour des composés ayant une base polaire.

Pour conclure sur cette partie nous avons :

- ✓ Déterminé le **Log de P du LAVR-289** en utilisant la méthode de chromatographie liquide en phase inverse. La valeur obtenue de **7,33, proche de la valeur théorique**, confirme que cette molécule est **très hydrophobe**.
- ✓ **Développé un modèle** permettant de déterminer des **Log P de composés apolaires** dont les valeurs sont comprises entre 0,5 et 9. Ce modèle pourra être utilisé pour déterminer ce paramètre pour de nouveaux composés apolaires synthétisés au laboratoire présentant un intérêt thérapeutique.

6. Stabilité aux solvants

Pour compléter les études de stabilité du LAVR-289, le comportement de celui-ci dans différents solvants organiques a été étudié. Comme montré précédemment (cf. paragraphe 5), le LAVR-289 est une molécule très hydrophobe. Ainsi, en attente d'une formulation adaptée, les essais biologiques du LAVR-289 sont réalisés par solubilisation de ce dernier dans le DMSO suivi de dilutions successives dans l'eau. Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats biologiques, nous avons donc étudié la stabilité du LAVR-289 dans ce solvant polaire aprotique.

Dans la partie stabilité plasmatique, les analyses de LAVR-289 sont faites à partir d'une solution composée à 75% d'acétonitrile et de 25% de plasma (phase aqueuse). Ainsi, dans le but de s'assurer que les échantillons peuvent être analysés jusqu'à 24 h après leur traitement, nous avons étudié la stabilité du LAVR-289 dans ce mélange. De plus, cette composition se rapproche également de la phase mobile utilisée dans notre méthode chromatographique. Ainsi, la stabilité dans ce mélange va nous permettre également de discriminer une éventuelle dégradation du LAVR-289 pendant son temps de résidence dans la colonne chromatographique qui est d'environ 8-9 min.

Nous avons également étudié la stabilité du LAVR-289 dans le méthanol. En effet, celui-ci est le solvant d'injection que nous avons choisi pour analyser les lots de synthèse en HPLC-UV, permettant d'obtenir

la pureté des échantillons envoyés en test biologique. De plus, le méthanol est utilisé en mélange binaire avec le dichlorométhane lors de la purification, sur gel de silice en phase normale, des isomères *Z/E* durant la dernière étape de synthèse. La stabilité du composé dans le mélange binaire DCM/MeOH est également étudiée. A titre de comparaison, la stabilité avec l'éthanol a également été réalisée, car celui-ci est toléré par l'organisme et est un solvant vert, peut être utilisé en galénique et non CMR contrairement au méthanol.

6.1. Mode opératoire

➤ Préparation des échantillons

Une masse du LAVR-289 est pesée dans un vial HPLC et 1 mL du solvant étudié est ajouté.

➤ Stockage et analyse

Les échantillons sont conservés à 25 °C et analysés à plusieurs intervalles de temps : toutes les heures pendant 12 h puis à 24 h et tous les jours pendant une semaine, puis à 14 et 21 jours. Les analyses de t_0 à 12 h ont été réalisées sur une colonne Zorbax Bonus RP (100 x 2,1 mm, 1,8 μ m).

6.2. Résultats

Sur la Figure 90 sont représentés les chromatogrammes obtenus initialement pour chaque solvant. Nous pouvons remarquer que le composé **21** (« diène sans base ») ayant un temps de rétention de 14 min est initialement présent dans nos échantillons. Le LAVR-289 est le composé majoritaire ayant un temps de rétention de 5,4 min. Un agrandissement entre 5 et 6 min permet de montrer que l'isomère *E* du LAVR-289 est également présent à 4% du mélange *E+Z*.

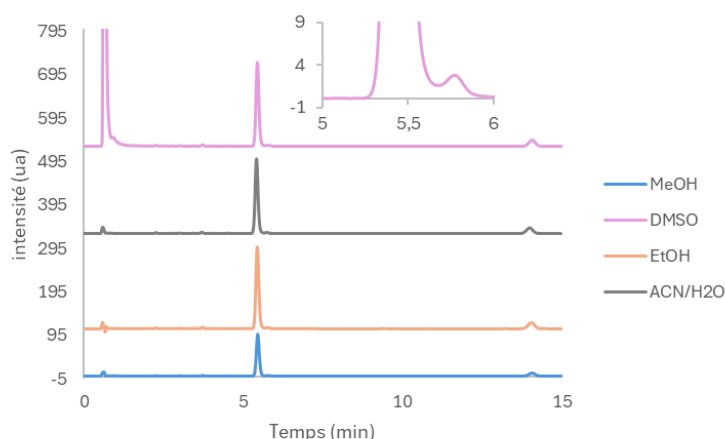


Figure 90 : Chromatogrammes du LAVR-289 à t_0 dans les quatre solvants ($\lambda = 230$ nm)

➤ Stabilité dans le DMSO

Au bout de 3 semaines dans le DMSO, le LAVR-289 est présent dans les mêmes proportions qu'initialement et le chromatogramme ne présente aucune apparition de nouveau pic ni aucune augmentation significative du diène (Tableau 14). En effet, le pourcentage relatif du LAVR-289 par

rapport au produit de dégradation reste constant. Le pic du DAPy **20** étant confondu avec celui du DMSO, celui-ci ne peut être pris en compte. **Le LAVR-289 est donc stable dans le DMSO à 25 °C**, sur la durée d'étude. Son emploi comme solution stock de LAVR-289, pour les analyses biologiques ou bien son emploi dans l'étude de la stabilité plasmatique n'influe donc pas sur les résultats obtenus.

Tableau 14 : Pourcentage relatif du LAVR-289 à t_0 et à 3 semaines dans le DMSO à 25 °C

Temps	DAPy (20)	LAVR Z	LAVR E	« Diène avec base » (34)	« Diène sans base » (21)
t_0	Pic solvant	84,6%	1,4%	0	14%
3 semaines	Pic solvant	84%	0,5%	0	15,5%

➤ Stabilité dans un mélange ACN/H₂O

Après 3 semaines dans le mélange ACN/H₂O (75/25, v/v) le LAVR-289 s'est dégradé. En effet, une augmentation du composé **21** est observée. Le pourcentage relatif de ce dernier varie de 14,01 % à 30,9%. De même, le composé **34** est également présent dans le mélange, après 3 semaines, à hauteur de 8,7% (Tableau 15).

Tableau 15 : Pourcentage relatif du LAVR-289 après différents temps d'incubation dans le mélange binaire ACN/H₂O à 25 °C

Temps	DAPy (20)	LAVR Z	LAVR E	« Diène avec base » (34)	« Diène sans base » (21)
t_0	Non quantifiable	84,5 %	1,4%	0%	14,01%
3 jours	Non quantifiable	84,4 %	1,3%	1,4%	12,9%
3 semaines	Non quantifiable	59,7 %	0,7%	8,7%	30,9%

Cette dégradation est cependant assez lente. En effet, la proportion du LAVR-289 calculée à 230 nm à 3 jours, est quasiment identique à celle mesurée à t_0 (Tableau 15). Cependant la proportion du LAVR-289 après 3 semaines a diminué de 25%. Ces résultats permettent d'infirmer que le composé **21** est formé dans la colonne chromatographique. De plus, notre méthode de précipitation des protéines, utilisant de l'acétonitrile, lors de l'étude de la stabilité du composé antiviral dans le plasma, n'influence pas les résultats obtenus. En effet, les échantillons sont analysés au maximum une heure après traitement.

➤ Stabilité dans le méthanol et l'éthanol

Nous pouvons remarquer que la dégradation est plus prononcée dans le méthanol que dans l'éthanol. En effet, le pourcentage relatif total de LAVR-289, après 3 semaines d'incubation, est plus faible dans le méthanol et les deux diènes sont présents à des plus fortes proportions (Tableau 16). Plus précisément, le LAVR-289 est présent à 54% dans le méthanol contre 75% dans l'éthanol. De même, le diène **21** a augmenté de plus de 15% dans le méthanol contre 4% dans l'éthanol. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le méthanol, dû à sa petite taille, est plus nucléophile que l'éthanol. Après

presque trois mois dans le méthanol, le pourcentage relatif du LAVR-289 n'est plus que de 25%, montrant donc une lente dégradation dans ce solvant. Toutefois, ces résultats montrent que l'utilisation du méthanol comme solvant d'injection pour l'analyse des lots de synthèse n'interfère pas sur les résultats si les injections sont effectuées dans la journée.

Cependant, l'éthanol, bien que moins éluant en phase normale que le méthanol, semble être plus adapté pour la purification, comme solvant d'injection et d'un point de vue toxicité.

Tableau 16 : Pourcentage relatif du LAVR-289 dans l'éthanol et le méthanol à 25 °C

Temps	DAPy (20)	LAVR Z	LAVR E	« Diène avec base » (34)	« Diène sans base » (21)
MeOH (t ₀)	4,1	81,1	1,4	0	13,4
MeOH (3 semaines)	8,1	54,2	0,8	5,3	31,6
MeOH (11 semaines)	11,8	25,5	0,2	9,5	53
EtOH (t ₀)	3,4	81,8	1,4	0	13,5
EtOH (3 semaines)	5,4	75,6	0,6	1,3	17,1

En complément, des stabilités dans le méthanol, du LAVR-289, à 24 h et à différentes températures ont été réalisées (Tableau 17). Le LAVR-289 est stable à basse température avec un pourcentage relatif proche des 100%. Cependant, cette molécule se dégrade à température ambiante (% relatif de 91%) et plus rapidement à 37 °C (% relatif de 82%) en formant les deux diènes. Ainsi, il est conseillé de stocker cette molécule au congélateur ou au réfrigérateur. Entre ces deux modes de conservation, il est préférable d'utiliser le réfrigérateur pour éviter le phénomène de décongélation - recongélation qui peut, dans certain cas, entraîner une dégradation de la molécule.

Tableau 17 : Pourcentage relatif du LAVR-289 après 24 h dans le méthanol à différentes températures

Température	DAPy	LAVR Z	« Diène avec base » (34)	« Diène sans base » (21)
25 °C	0,8	91,4	2,5	5,3
37 °C	1,8	82,1	4,9	11,2
4 °C	0,1	98,5	0	1,4
-18 °C	0,1	98,9	0	1

- Stabilité dans le DCM et dans le mélange DCM/MeOH (9/1, v/v)

Pour rappel, la synthèse du LAVR-289 conduit à l'obtention d'un mélange équimolaire des isomères Z et E. Une purification sur gel de silice, utilisant un mélange binaire DCM/MeOH (98/2 à 95/5, v/v) permet d'obtenir des fractions appauvries en isomère E. Afin de s'assurer que ce mélange ne soit pas responsable de la dégradation de la molécule durant sa purification, la stabilité dans le DCM seul, puis dans un mélange binaire DCM/MeOH (9/1, v/v) d'un mélange riche en E ont été étudiés. La Figure 91

représente le chromatogramme à t_0 dans le DCM. Nous pouvons remarquer que ce lot contient initialement les composé **20** et **21**. Pour le mélange DCM/MeOH, le même lot a été utilisé.

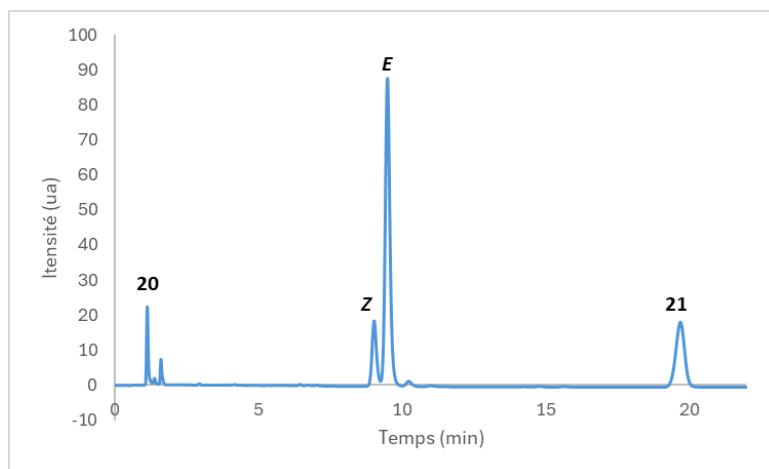


Figure 91 : Chromatogramme du LAVR-289 à t_0 dans le DCM ($\lambda = 230$ nm)

Dans le Tableau 18, les pourcentages relatifs du LAVR-289 sont répertoriés après 8 jours pour le DCM seul et après 5 jours pour le mélange binaire. Nous pouvons remarquer que la forme Z du LAVR-289 semble être plus stable que la forme E et que les deux diènes sont lentement formés dans ces solvants. Ainsi l'utilisation du mélange binaire DCM/MeOH est approuvé pour la purification chromatographique sur gel de silice des isomères Z/E en phase normale.

Tableau 18 : Pourcentages relatifs du LAVR-289 dans le DCM et le mélange DCM/MeOH (9/1, v/v) à 25 °C

Temps	DAPy (20)	LAVR Z	LAVR E	« Diène avec base » (34)	« Diène sans base » (21)
DCM (t_0)	Non soluble	12,5	61,6	1,1	24,8
DCM (8 jours)	Non soluble	12	52,7	1,1	34,2
DCM/MeOH (t_0)	4,7	16,2	47,4	3,1	28,5
DCM/MeOH (5 jours)	4,3	18	40,8	4,2	32,7

Pour conclure, la stabilité du LAVR-289 a été étudiée dans différents solvants. Il ressort de cette étude que ce composé est **stable dans le DMSO**, permettant son utilisation comme solvant de stockage. Le LAVR-289 est **sensible aux alcools**, avec une **dégradation plus prononcée dans le méthanol** que l'éthanol. Dans le méthanol cette dégradation est plus prononcée à 37 °C qu'à basses températures.

Les **phases mobiles utilisées en chromatographie** de polarité de phases normale (DCM/MeOH) et en chromatographie de polarité de phases inversée (ACN/H₂O) **sont tolérées** par le LAVR-289 et ne provoquent pas de dégradation pendant les temps d'analyse (30 min) et de purification (~1-2 h, avec le temps de collecte et d'évaporation).

7. Détermination du pKa de LAVR-289

La constante d'acidité (pKa) d'une nouvelle entité chimique à but thérapeutique est un paramètre physico-chimique qui va affecter ses propriétés ADMET. La lipophilie, la solubilité, la perméabilité ainsi que la fraction liée aux protéines plasmatiques vont être influencées par le pKa.¹¹⁶ En effet, une molécule basique ayant un pKa > 9-10 sera chargée à pH physiologique et aura une diffusion ralentie à travers les membranes physiologiques telles que la barrière hémato-encéphalique. Sur la gamme de pH entre 0 et 14, le LAVR-289, ainsi que tous les dérivés *O*-2,4-diaminopyrimidine ne présentant pas d'autres sites protonables, peuvent exister sous 4 formes (Figure 92). À l'aide du logiciel Marvin Sketch, le pourcentage de chaque espèce en fonction du pH peut être tracé (Figure 92). Ce graphique nous montre que pour des pH > 8, seule la forme neutre est présente tandis que la forme protonée 2 est majoritaire pour des pH compris entre 0 et 5. Il est intéressant de noter qu'à pH physiologique (7,4), la forme 1 est majoritaire (97%) et les formes 2 et 3 sont présentes à 2% et 1%, respectivement.

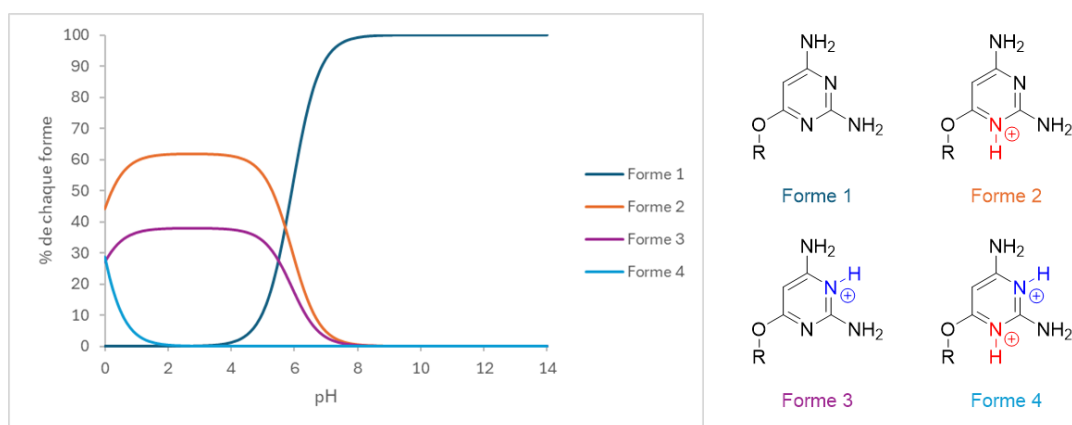


Figure 92 : Pourcentages des espèces du LAVR-289 en fonction du pH

La connaissance du pKa d'une molécule peut permettre de déterminer la force de l'acide ou de la base et aider la formulation de cette dernière sous forme de sel en choisissant un contre-ion adapté. De plus, le pKa permet de déterminer la forme neutre ou protonée de l'espèce en fonction du pH.

Tableau 19 : Relation entre le pKa et la force de l'acide ou de la base dans l'eau¹⁰⁷

pKa	Force de l'acide	Force de la base
< 0	Très fort	Extrêmement faible
0-4,5	Fort	Très faible
4,5-9,5	Faible	Très faible
9,5-14	Très faible	Faible
14	Extrêmement faible	Très fort

La formation de sel peut conférer plusieurs avantages comme l'augmentation de la biodisponibilité, de la solubilité ainsi que dans certains cas sa stabilité.¹⁰⁹ Par exemple, la formulation de

¹¹⁶ Manallack, D. T. The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect. Med. Chem.* **2007**, *1*, 25–38

l'amifampridine sous forme de sel de phosphate a permis à la fois d'augmenter sa solubilité et également sa stabilité à l'oxydation.¹¹⁷ De manière générale, la formation de sel est souvent un bon compromis entre la solubilité et la stabilité.

Dans la littérature, plusieurs méthodes existent pour déterminer la valeur du/des pKa.¹¹⁸ On pourrait citer, de manière non exhaustive, la potentiométrie qui est historiquement la première méthode à avoir été utilisée, la conductimétrie, la RMN ou encore l'électrophorèse capillaire. Le pKa de plusieurs analogues de purine a été déterminé¹¹⁹ par chromatographie en phase liquide et spectrophotométrie UV-visible. Parmi les méthodes à notre disposition, nous avons choisi la détermination par spectroscopie UV-Visible car elle est facile à mettre en œuvre et, comme mentionné dans la partie 2.1, le LAVR-289 absorbe en UV et sa base pyrimidine en est le chromophore principal.

7.1. Détermination par spectroscopie UV-visible

Pour utiliser cette méthode, la molécule doit être UV-active et son site de protonation doit être proche ou porté par le chromophore. Si cette condition est remplie, les spectres UV des formes protonées et neutres sont différents. En se plaçant à une longueur d'onde donnée et en traçant l'absorbance en fonction du pH du milieu dans lequel est solubilisée la molécule, un tracé de type sigmoïde est obtenu et le pKa correspond au point d'inflexion de la courbe.

Une autre méthode peut être utilisée et repose sur les équations suivantes.¹²⁰

- Cas d'une base

$$\text{Si } A_I > A_m, pKa = pH + \log \frac{A - A_m}{A_I - A}, \quad (\text{Eq. 8})$$

où A_I est l'absorbance de l'espèce ionisée, A_m est l'absorbance de l'espèce neutre et A est l'absorbance au pH mesuré.

Dans le cas inverse, $A_I < A_m$, l'équation devient :

$$pKa = pH + \log \frac{A_m - A}{A - A_I} \quad (\text{Eq. 9})$$

- Cas d'un acide

$$\text{Si } A_I > A_m, pKa = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_m} \quad (\text{Eq. 10})$$

¹¹⁷ Mahé, N.; Nicolăi, B.; Allouchi, H.; Barrio, M.; Do, B.; Céolin, R.; *et al.* Crystal Structure and Solid-State Properties of 3,4-Diaminopyridine Dihydrogen Phosphate and Their Comparison with Other Diaminopyridine Salts. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 708–715.

¹¹⁸ Reijenga J, van Hoof A, van Loon A, Teunissen B. Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal. Chem. Insights.* **2013**, *8*.

¹¹⁹ Daldal, Y. D.; Demiralay, E. Ç. Chromatographic and UV-Visible Spectrophotometric pKa Determination of Some Purine Antimetabolites. *J. Mol. Liq.* **2020**, *317*, 113930.

¹²⁰ Albert, A.; Serjeant, E. P. *The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Chapman and Hall: London, 1984.

Dans le cas inverse, $A_l < A_m$, l'équation devient :

$$pKa = pH + \log \frac{A - A_l}{A_m - A} \quad (\text{Eq. 11})$$

En traçant la valeur de pH en fonction du logarithme du ratio des absorbances à une longueur d'onde précise (où l'absorbance va varier), le pKa correspond à l'ordonnée à l'origine de la droite.

Nous avons donc appliqué la spectroscopie UV-visible et utilisé ces différentes équations pour déterminer le pKa du LAVR-289.

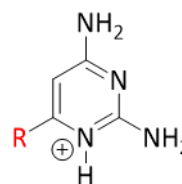
7.2. Application au LAVR-289

7.2.1. Etudes préliminaires et mode opératoire

Roth *et al.*⁸⁹ ont rapporté le pKa de plusieurs dérivés de 2,4-diamino-6-substituée pyrimidine dont la valeur varie en fonction du groupement en position 6 (Tableau 20). Sur les dérivés 2,4-diaminopyrimidine, la protonation se fait sur l'atome N1 qui est le plus basique. Ce résultat a été démontré par calcul d'orbitale moléculaire¹²¹ et le site de protonation a été confirmé par une étude RMN où un couplage entre le proton porté par l'azote N1 et le carbone C6 a été observé.⁸⁹

Tableau 20 : pKa de différents 2,4-diaminopyrimidines-6-substituées

R	pKa
COOH	7,79
CH ₃	7,63
H	7,40
OCH ₃	5,48
OH	3,33



Afin d'avoir une valeur théorique du pKa du LAVR-289, une estimation par le logiciel de simulation MarvinSketch® a été réalisée. L'estimation nous indique que le pKa provient bien de l'azote numéro 1 (en rouge) de la base pyrimidine (Figure 93) et a pour valeur 5,92. L'atome d'azote en position 3 ayant un pKa $\approx -0,40$ ne sera ainsi jamais totalement protoné dans nos conditions d'analyse puisque la gamme de pH étudiée est comprise entre 2,34 et 10,21.

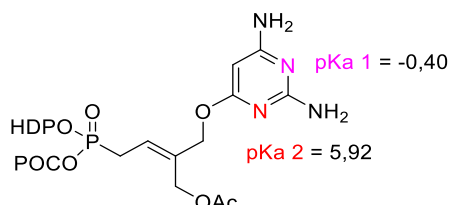


Figure 93 : Valeurs théoriques des pKa des azotes du noyau de la DAPy

Les formes mésomères des dérivés 2,4-diaminopyrimidine (5 ou 6 substitués) sont représentées sur la Figure 94. La délocalisation des charges conduit à 3 formes (I, II, III). Il a été montré qu'avec un groupement NH₂ ou OMe (groupe électro-donneur) en position 6 une nouvelle forme mésomère

¹²¹ Perault, A.-M.; Pullman, B. Structure électronique et mode d'action des antimétabolites de l'acide folique. *Biochim. Biophys. Acta.* **1961**, *52*, 266–280.

permettait de stabiliser la charge positive (IV).⁸⁹ Les groupements en position 5, en position méta de la charge, ne contribuent pas aux formes mésomères mais peuvent interférer, par encombrement stérique, dans la formation de la forme mésomère III.⁸⁹ Le LAVR-289 (où R₆ = O) pouvant être assimilé à la forme OMe, passera donc également par la forme mésomère IV.

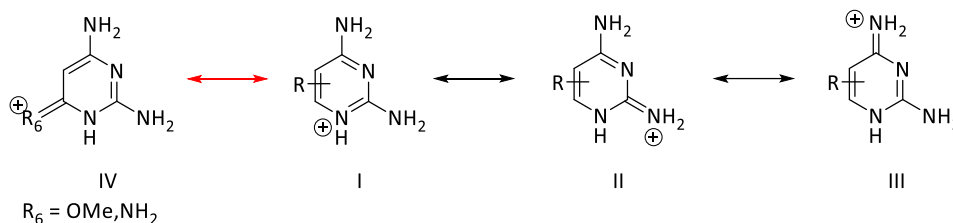


Figure 94 : Formes mésomères des dérivés 2,4-diaminopyrimidine

Dans la partie 4, il a été décrit que le LAVR-289 se dégradait en fonction du pH de la solution dans laquelle il est solubilisé. Pour des questions de stabilité nous avons donc décidé de faire la mesure du pKa sur un intermédiaire de synthèse du LAVR-289, le composé **9** (Figure 95). Notre choix s'est porté sur l'intermédiaire de synthèse car il possède la même base pyrimidine ainsi qu'un système vinylique. Avant de réaliser les mesures, le spectre UV de ce composé a été réalisé afin de s'assurer que celui-ci soit identique à celui du LAVR-289.

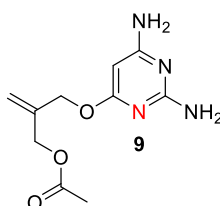


Figure 95 : Intermédiaire de synthèse **9** pour la détermination du pKa

- Préparation des solutions à différents pH

Pour cette expérience, les solutions à différents pH sont les mêmes qu'utilisées dans la partie 4.

- Préparation de la solution de **9**

Une pesée de 6,30 mg de **9** est diluée dans 1 mL de MeOH et ensuite 200 µL de cette solution sont dilués dans 1 mL de MeOH. La concentration finale est de 1,26 mg.mL⁻¹ équivalent à 5,29 mM.

- Préparation des échantillons

Aux solutions de 2 mL, comprises entre pH 2,34 et 10,21, sont ajoutés 20 µL de la solution méthanolique de **9** à 5,29 mM. Ces solutions sont agitées au vortex et les spectre UV sont ensuite enregistrés entre 200 et 320 nm.

7.2.2. Exploitation des résultats

En traçant les spectres UV-visible aux deux valeurs de pH les plus extrêmes de la gamme (Figure 96), un déplacement de la longueur d'onde maximale d'absorbance est observé. Cette valeur passe de 267 nm pour la forme neutre (conditions basiques) à 278 nm pour la forme protonée (conditions acides).

Il y a un déplacement bathochrome de la longueur d'onde maximale d'absorption quand le pH de la solution décroît.

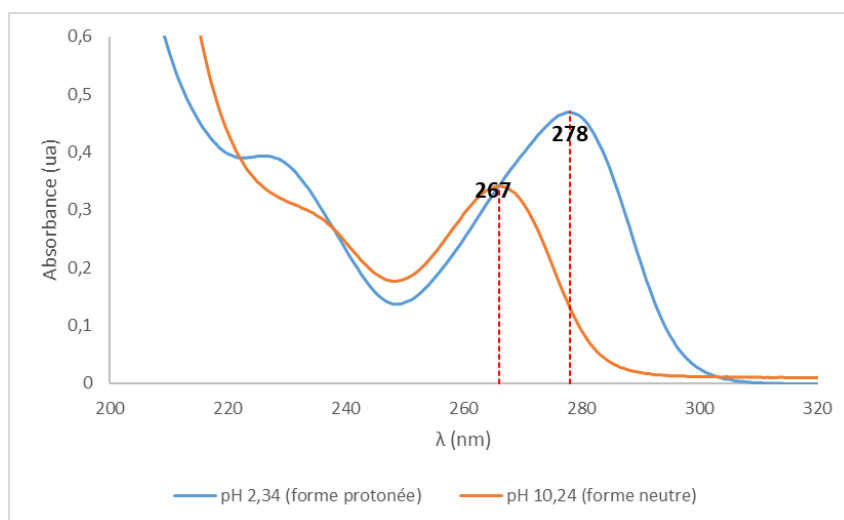


Figure 96 : Spectre UV du composé 9 (pH acide & pH basique)

Dans un premier temps, il est nécessaire de trouver la longueur d'onde d'absorption où la différence d'absorbance entre la forme protonée (pH 2,34) et la forme neutre est la plus grande (pH 10,21). Sur le graphique de la Figure 96, visuellement on peut estimer que cette longueur d'onde va se situer à 278 nm. Ainsi, la différence d'absorbance est calculée et certaines valeurs ont été répertoriées dans le Tableau 21 où l'on remarque que la différence est la plus grande à 281 nm.

Tableau 21 : Différence d'absorbance entre la forme neutre et la forme protonée en fonction de la longueur d'onde

λ (nm)	A forme protoné (pH 2,34) (ua)	A forme neutre (pH 10,21) (ua)	Δ Absorbance (ua)
260	0,25	0,294	0,044
267	0,357	0,34	0,017
278	0,469	0,131	0,338
281	0,449	0,075	0,374
285	0,365	0,036	0,329
290	0,209	0,019	0,19

En se plaçant à cette longueur d'onde, nous pouvons alors tracer l'absorbance en fonction du pH (Tableau 22, Figure 97).

Tableau 22 : Absorbance en fonction du pH à 281 nm

pH	A (281 nm) (ua)
2,34	0,449
3,01	0,443
4,03	0,458
4,83	0,369
5,56	0,183
6,71	0,081
7,36	0,075
8,4	0,068
9,24	0,071
10,21	0,075

A partir de ces valeurs et de ce graphique, le pKa peut être déterminé :

- ✓ En traçant la dérivée de l'absorbance en fonction du pH : le pKa correspond au maximum de la dérivée. Par lecture graphique celui-ci est de 5,1.
- ✓ Par la méthode des tangentes : sur le graphique, les deux tangentes sont représentées en rouge et le pKa correspond à l'intersection entre la droite jaune, droite perpendiculaire aux tangentes, et la courbe bleue. Par lecture graphique, le pKa est de 5,1.

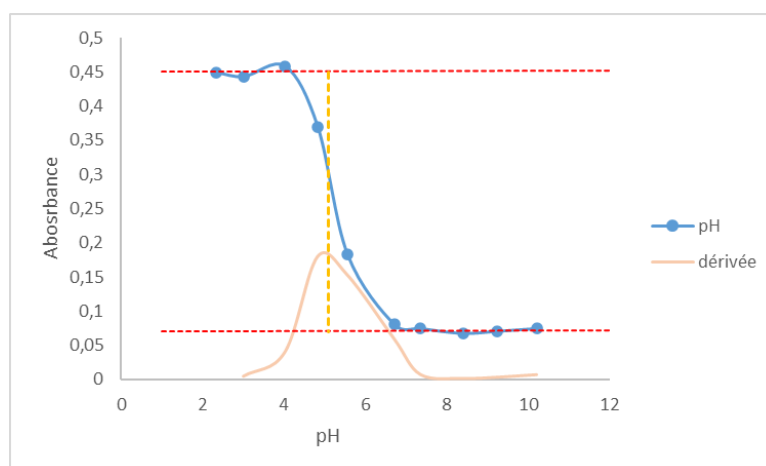


Figure 97 : Tracé de l'absorbance en fonction du pH et sa dérivée à 281 nm

Notre composé ayant son site de protonation sur sa fonction N1 est donc considéré comme étant une base. En se plaçant toujours à 281 nm, et sachant $A_I > A_m$, nous pouvons donc utiliser l'équation 8 et la réécrire :

$$pH = pka + \log \frac{A_I - A}{A - A_m} \quad (\text{Eq. 12})$$

Ainsi, en calculant pour chaque pH, le ratio $\log \frac{A_I - A}{A - A_m}$ dont les valeurs sont regroupées dans le Tableau 23, puis en traçant le pH en fonction du $\log \frac{A_I - A}{A - A_m}$, le pKa peut être déterminé (Figure 98). En effet, la valeur du pKa correspond à l'ordonnée à l'origine de la droite.

Tableau 23 : Absorbance du composé **9** à 281 nm et calcul du ratio $\log \frac{A_I - A}{A - A_m}$

pH	A à 281 nm (ua)	$\log \frac{A_I - A}{A - A_m}^*$
2,34	0,449	
3,01	0,443	-1,79
4,03	0,458	
4,83	0,369	-0,57
5,56	0,183	0,39
6,71	0,081	1,79
7,36	0,075	
8,4	0,068	
9,24	0,071	
10,21	0,075	

* Avec $A_m = 0,075$ et $A_I = 0,449$. Le ratio des cases grisées est négatif. Ces valeurs ne sont pas définies par la fonction logarithme décimal

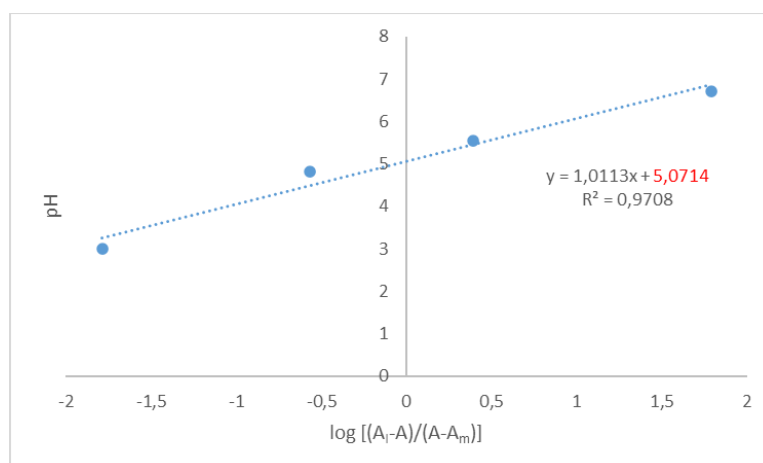


Figure 98 : pH en fonction de $\log \frac{A_I - A}{A - A_m}$ à 281 nm

Cette méthode nous donne une valeur de pKa de 5,07 ce qui est similaire à celles trouvées par les méthodes précédentes. Nous remarquons aussi que cette valeur est proche de la valeur théorique de 5,92 calculée initialement par le logiciel MarvinSketch® et celle trouvée dans la littérature pour la 6-méthoxy-2,4-diaminopyrimidine (**84**) de 5,48 (Tableau 20, Figure 99). Il est intéressant de corréliser cette valeur avec la stabilité au pH du LAVR-289 (cf. paragraphe 4). En effet, nous avons remarqué que le LAVR-298 présentait une instabilité autour d'une valeur de pH de 5 qui correspond donc à la valeur du pKa.

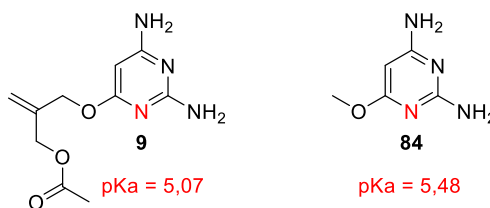


Figure 99 : Comparaison du pKa trouvé expérimentalement avec le pKa de la 6-méthoxy-2,4-diaminopyrimidine

En combinant les études de pKa et de stabilité au pH, nous pouvons donc conclure que la molécule est **stable à pH acide** et qu'il serait donc envisageable de former un sel. Ce sel aurait pour but **d'augmenter**

la **stabilité** de la molécule mais également de la rendre **un peu plus hydrophile** même si sa valeur HLB (Balance hydrophile et lipophile) sera toujours faible à cause du « poids » de la longue chaîne de 16 carbones dans la valeur lipophile de cette balance (Tableau 24).

Tableau 24 : Valeur de HLB de la forme neutre et protoné du LAVR-289

Forme du LAVR	HLB *
Neutre	8,44
Protoné	6,36

* Calculé par le logiciel Marvin Sketch®

De plus, le contre-ion choisi devrait avoir un pKa < 3 pour former le sel. **Une formulation du LAVR-289 en utilisant de l'acide chlorhydrique ou de l'acide sulfurique à faible concentration pourrait donc être envisagée.**

Enfin, la détermination du pKa du LAVR-289, nous permet d'émettre une hypothèse sur la formation du composé **21** « diène sans base ». Celui-ci pourrait être issu d'une déprotonation intramoléculaire entre l'azote *N1* de la base et le proton en α du phosphore conduisant à la forme zwitterionique **85 (I)**. Comme mentionné dans la Figure 94, ce composé existe également sous la forme mésomère **85 (II)** où la délocalisation de la charge négative provoquerait l'élimination de la base et la formation du diène **21** et de la DAPy **20** (Schéma 13).

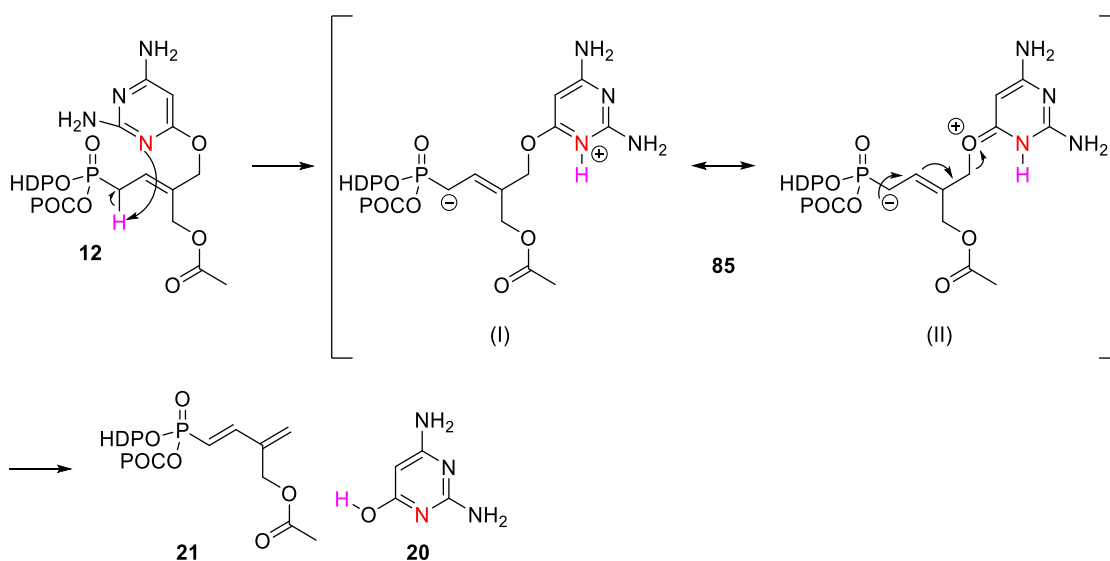


Schéma 13 : Proposition de mécanisme pour la formation des composés **20** et **21**

Ce mécanisme permet d'apporter une explication sur la stabilité de la molécule en conditions acides. En effet, la protonation de l'azote inhiberait la réaction intramoléculaire.

8. Détermination de la « concentration d'agrégation critique » (CAC)

Le LAVR-289 est une molécule qui peut s'apparenter à un tensioactif (Figure 100). En effet, elle possède à la fois un groupement polaire, la base 2,4-diaminopyrimidine (représentée en rouge), et un groupement lipophile, le groupement HDP (représenté en bleu).

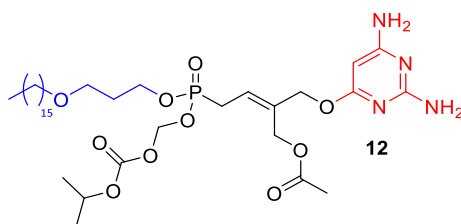


Figure 100 : Le LAVR-289, un tensioactif ?

Certaines molécules, dont des prodrogues nucléosidiques, peuvent s'autoorganiser, ou s'auto-assembler pour former des molécules stables. Par exemple, la gemcitabine dérivée en *N4* par une molécule de squalène est un exemple de prodrogue nucléosidique pouvant s'autoorganiser dans l'eau sous forme de vésicules uni-lamellaires d'un diamètre de 100 nm.¹²² L'auto-assemblage de la gemcitabine conjuguée au squalène a montré une efficacité accrue *in vivo* et *in vitro* en comparaison de la gemcitabine libre. De même, Ma *et al.*¹²³ ont proposé une formulation du brincidofovir sous forme de micelle pour la délivrance par voie intravitréenne. Le brincidofovir a montré une concentration micellaire critique de 19 mg.L⁻¹ dans l'eau avec une taille de micelle moyenne de 274 nm.

Il est plus judicieux de parler de concentration d'agrégation critique (CAC) et non de concentration micellaire critique (CMC) tant qu'aucune preuve n'est apportée pour attester de la formation de micelles à partir de ces composés. En effet, les composés peuvent s'autoorganiser de bien des façons. Certains peuvent former des micelles directes ou inverses, sphériques ou cylindriques, des vésicules bicouches, ou même des vésicules uni-lamellaires.⁹¹

La mesure de la CAC d'un composé peut être effectuée par différentes méthodes, impliquant par exemple, des mesures de conductivité¹²⁴, de tension de surface,¹²⁴ de potentiel zêta¹²⁵ ou encore d'intensité de fluorescence.¹²⁶ C'est cette dernière technique que nous avons choisie pour caractériser la CAC du LAVR-289 et de l'un de ses analogues. Parmi les différentes méthodes de spectroscopie UV-visible,¹²⁷ nous avons sélectionné la spectroscopie de fluorescence utilisant le pyrène « comme » révélateur d'agrégation, car cette méthode est robuste et facile à mettre en œuvre.

¹²² Maksimenko, A.; Caron, J.; Mougin, J.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Gemcitabine-Based Therapy for Pancreatic Cancer Using the Squalenoyl Nucleoside Monophosphate Nanoassemblies. *Int. J. Pharm.* **2015**, *482*, 38–46.

¹²³ Ma, F.; Nan, K.; Lee, S.; Beadle, J. R.; Hou, H.; Freeman, W. R.; *et. al.* Micelle Formulation of Hexadecyloxypropyl-Cidofovir (HDP-CDV) as an Intravitreal Long-Lasting Delivery System. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *89*, 271–279.

¹²⁴ Zhang, S.; Yu, J.; Wu, J.; Tong, W.; Lei, Q.; Fang, W. Micellization Parameters of Six Gemini Quaternary Ammonium Surfactants from Measurements of Conductivity and Surface Tension. *J. Chem. Eng. Data.* **2014**, *59*, 2891–2900.

¹²⁵ Song, Y.; Sun, R.; Zhao, K.; Pan, X.; Zhou, H.; Li, D. An Induction Current Method for Determining the Critical Micelle Concentration and the Polarity of Surfactants. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293*, 1525–1534.

¹²⁶ Mehreteab, A.; Chen, B. Fluorescence Technique for the Determination of Low Critical Micelle Concentrations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 49–52.

¹²⁷ Mabrouk, M. M.; Hamed, N. A.; Mansour, F. R. Spectroscopic Methods for Determination of Critical Micelle Concentrations of Surfactants; a Comprehensive Review. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2023**, *58*, 206–234.

8.1. Le pyrène

Le pyrène (Figure 101), constitué de 4 cycles benzéniques fusionnés, est une molécule hydrophobe fluorescente dont l'intensité de son émission est exacerbée par la lipophilie de son environnement direct. Son spectre UV dans le DMSO (Figure 101) présente 5 bandes dont deux longueurs d'onde maximales d'absorption à 275 nm et 338 nm. Pour effectuer les mesures de fluorescence, la longueur d'onde d'excitation sera donc de 330 nm pour les mesures d'absorbance afin de ne pas saturer le signal.

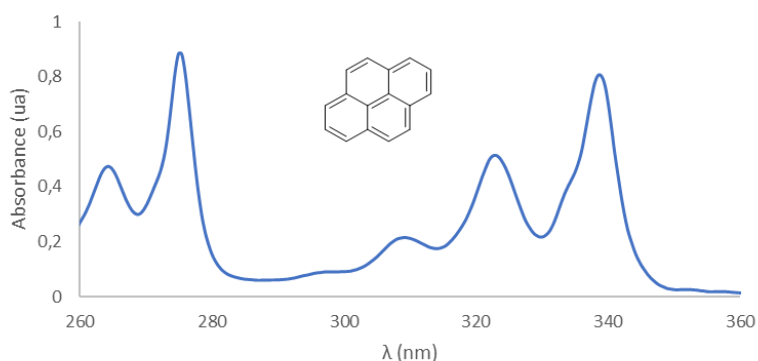


Figure 101 : Structure et spectre d'absorbance UV-visible du pyrène

Le spectre d'émission du pyrène (Figure 102) comporte 5 bandes caractéristiques, désignées par les appellations « band I, II, III, IV, V », respectivement à environ 372, 379, 382, 395 et 410 nm. Parmi ces 5 bandes, seules deux d'entre elles reflètent les changements environnementaux de la molécule. Dans un environnement hydrophobe, l'intensité de la bande III à 382 nm est significativement augmentée. Au contraire, l'intensité de la bande I à 372 nm est plus grande que l'intensité de la bande III dans un environnement polaire. Le ratio des intensités de fluorescence I_{372}/I_{382} peut donc être employé pour détecter le passage du pyrène d'un environnement hydrophile à un environnement hydrophobe.

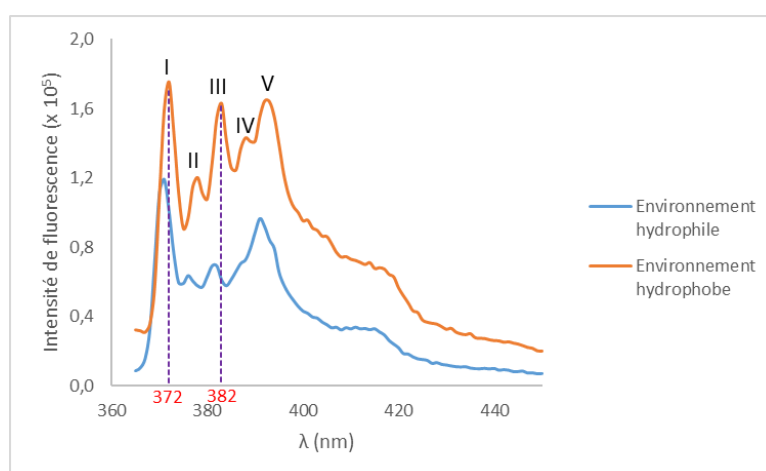


Figure 102 : Spectres d'émission du pyrène en fonction de l'environnement hydrophobe ou hydrophile

Lorsque la concentration du tensioactif étudiée est inférieure à la CMC ou CAC, le ratio I_{372}/I_{382} est constant. Au-delà de cette valeur, la molécule s'autoassemble et offre aux molécules de pyrène un environnement plus hydrophobe. Le ratio I_{372}/I_{382} diminue drastiquement et traduit l'incorporation du pyrène dans les micelles/agrégats. En exprimant ce ratio en fonction du logarithme de la concentration, la CAC peut être déterminée. Les spectres de la Figure 102, montrent bien l'exacerbation des bandes à 372 nm et 382 nm en milieu hydrophobe et donc la pertinence du rapport I_{372}/I_{382} pour la détermination de la CAC d'un composé amphiphile.

8.2. Mode opératoire

Les mesures ont été effectuées sur le spectrofluorimètre – Horiba FluotroMax. En se plaçant à la longueur d'onde de 330 nm en excitation, le spectre d'émission du pyrène est obtenu. En faisant varier la concentration de LAVR-289 entre 0,4 μM et 1 mM et celle de l'analogue entre 0,39 μM et 0,2 mM, nous avons pu obtenir la CAC du LAVR-289 et de l'analogue LAVR-290. Une augmentation de l'intensité au niveau des bandes I et III est bien observée à partir d'une certaine concentration. En fonction de l'environnement du pyrène le spectre d'émission est plus ou moins intense.

8.3. Résultats

Cette expérience nous a permis de déterminer la CAC du LAVR-289 et de l'analogue LAVR-289. Les résultats des analyses en spectrofluorimétrie sont répertoriés dans le Tableau 25 pour le LAVR-289 et le Tableau 26 pour le LAVR-290 (42).

Tableau 25 : Résultats des mesures de fluorescence pour le LAVR-289

Concentration (mM)	Log C	I_{372}/I_{382}
1,02	0,01	1,13
$5,12 \cdot 10^{-1}$	-0,29	1,13
$2,56 \cdot 10^{-1}$	-0,59	1,18
$1,28 \cdot 10^{-1}$	-0,89	1,17
$6,40 \cdot 10^{-2}$	-1,19	1,20
$3,20 \cdot 10^{-2}$	-1,49	1,24
$1,60 \cdot 10^{-2}$	-1,80	1,33
$8,00 \cdot 10^{-3}$	-2,10	1,43
$4,00 \cdot 10^{-3}$	-2,40	1,47
$2,00 \cdot 10^{-3}$	-2,70	1,47
$6,40 \cdot 10^{-4}$	-3,19	1,47
$4,00 \cdot 10^{-4}$	-3,40	1,46

Tableau 26 : Résultats des mesures de fluorescence pour le LAVR-290 (42)

Concentration (mM)	Log C	I_{372}/I_{382}
$2,04 \cdot 10^{-2}$	-0,69	1,17
$5,10 \cdot 10^{-2}$	-0,99	1,25
$2,55 \cdot 10^{-2}$	-1,29	1,38
$1,27 \cdot 10^{-2}$	-1,59	1,51
$6,12 \cdot 10^{-3}$	-1,90	1,57
$3,18 \cdot 10^{-3}$	-2,21	1,64
$7,85 \cdot 10^{-4}$	-2,50	1,55
$3,92 \cdot 10^{-4}$	-3,11	1,59

Ces valeurs nous ont permis de tracer le rapport des intensités en fonction du logarithme de la concentration en LAVR-289 (Figure 103) et le composé **42** (Figure 104).

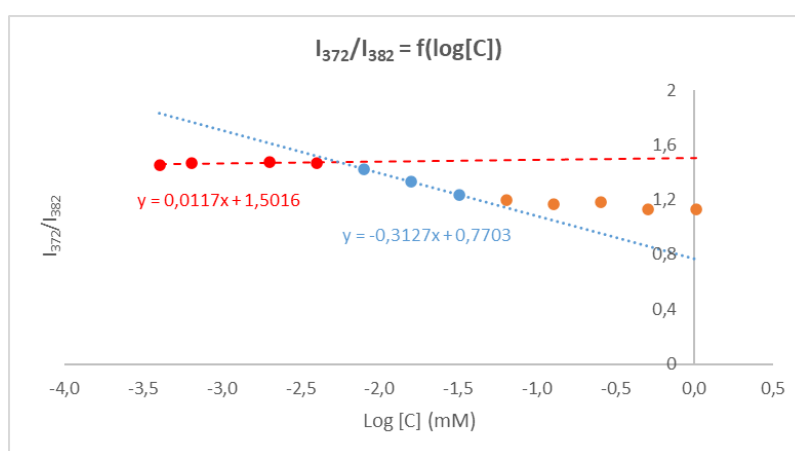


Figure 103 : Courbes représentant le ratio des intensités I_{372}/I_{382} en fonction du Log de la concentration du LAVR-289

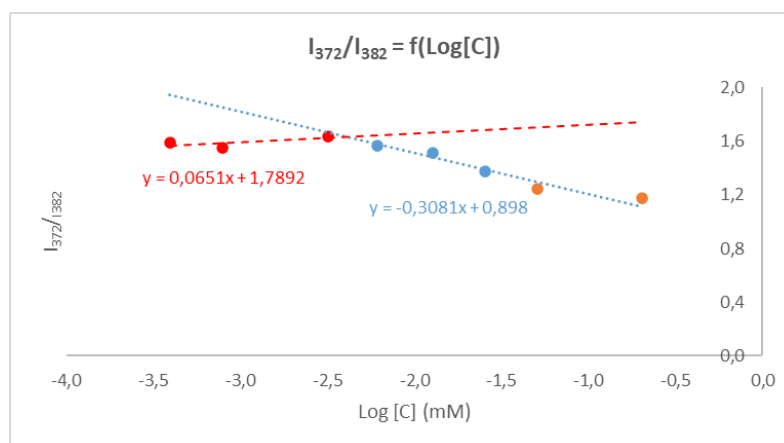


Figure 104 : Courbes représentant le ratio des intensités I_{372}/I_{382} en fonction du Log de la concentration du LAVR-290

Dans le domaine en rouge, la concentration de la molécule d'intérêt est inférieure à la CAC et le pyrène est dans un environnement hydrophile. La perte de linéarité traduit par la droite bleue est synonyme d'agrégation et donc que le pyrène se trouve dans un environnement hydrophobe. La CAC correspond donc à l'intersection entre les droites rouge et bleue. Le domaine en orange correspond à la saturation en molécule de pyrène au sein des agrégats.

En utilisant les équations des droites, nous pouvons déterminer que la $CAC_{LAVR-290}$ est de **4,09 μM** et que la $CAC_{LAVR-289}$ est de **5,57 μM** . La CAC des deux composés est du même ordre de grandeur et semble nous informer que le groupement CH_2OAc du LAVR-289 n'intervient pas dans l'auto-organisation de celui-ci.

Ces résultats sont donc cohérents avec notre hypothèse selon laquelle le LAVR-289 peut se comporter comme un tensioactif. Pour compléter cette étude, des analyses de Dynamic Light Scattering (DLS ou « diffusion dynamique de la lumière ») sont en cours (en collaboration) afin de déterminer la nature et la taille de cette auto-organisation.

9. Essais de formulation en micelles

Une autre approche permettant de formuler le LAVR-289 dans l'eau, sans utiliser de DMSO est l'utilisation d'un tensioactif à une concentration supérieure ou égale à sa CMC et de solubiliser le principe actif hydrophobe à l'intérieur de micelles formées.

C'est dans ce but qu'un premier essai de solubilisation micellaire du LAVR-289 a été envisagé. Pour ce faire, un tensioactif anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS) et un tensioactif non ionique, le Tween® 80 ont été utilisés (Figure 105). Dans la littérature, les CMC du SDS et du Tween 80 sont de 8 μM et 0,01 μM , respectivement.¹²⁸

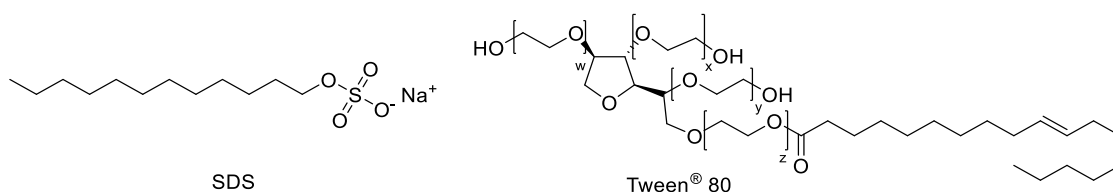


Figure 105 : Structures du SDS et du Tween® 80

9.1. Mode opératoire

➤ Solution de SDS à la CMC

Une masse de 57,9 mg de SDS est solubilisée dans 20 mL d'eau. La concentration finale est de 10 μM , soit une contraction de SDS de 0,29% en unité de masse par unité de volume.

➤ Solution de Tween 80 à la CMC

Une masse de 50 mg de Tween 80 est solubilisée dans 20 mL d'eau. 125 μL de cette solution sont ensuite dilués dans 20 mL d'eau. La concentration finale est de 14,5 nM, soit une concentration en Tween 80 < 0,002 % en unité de masse par unité de volume.

➤ Pesées de LAVR-289

Pour le SDS, la masse utilisée de LAVR-289 est de 3,7 mg soit 5,07 mmol.

¹²⁸ Sharma, R.; Shaheen, A.; Mahajan, R. K. Cyclic Voltammetry and Viscosity Measurements of Aggregated Assemblies of Anionic Surfactants with Nonionic Surfactants and Triblock Copolymers. *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289*, 43–51.

Pour le Tween 80, la masse utilisée de LAVR-289 est de 4,8 mg soit 6,57 mmol.

➤ Solubilisation micellaire

Un volume de 10 mL de solution de tensioactif est ajouté à la quantité de LAVR-289 et le mélange est agité 24 h.

➤ Observations

Au bout de 24 h, la solution de SDS est limpide et le LAVR-289 n'est plus visible sur les parois du ballon. Concernant la solution de Tween 80, le LAVR-289 est toujours visible sur les parois et la solution est trouble. De ces observations visuelles, l'utilisation d'un tensioactif anionique semble être le plus enclin à solubiliser le LAVR-289 en solution aqueuse. Nous nous sommes focalisés sur la solution de SDS et nous avons voulu déterminer la quantité de LAVR-289 solubilisée.

9.2. Caractérisation de la solution

En admettant que toute la quantité de LAVR-289 ait été solubilisée, la concentration dans la solution aqueuse serait de 0,5 mM.

➤ Détermination de la concentration du LAVR-289

Dans le but de s'assurer que le LAVR-289 est bien présent dans la solution aqueuse et afin de déterminer sa concentration, une analyse UV de la solution est réalisée et la gamme d'étalonnage du LAVR-289 effectuée par spectrophotométrie UV (cf. chapitre 2, paragraphe 2.1) est utilisée. Le blanc est réalisé avec la solution de SDS seule. L'analyse de la solution micellaire aqueuse, après dilution par 8, présente bien le spectre UV caractéristique du LAVR-289, sous sa forme protonée (λ_{\max} à 278 nm), montrant que celui-ci a bien été mis en solution dans la solution aqueuse de SDS.

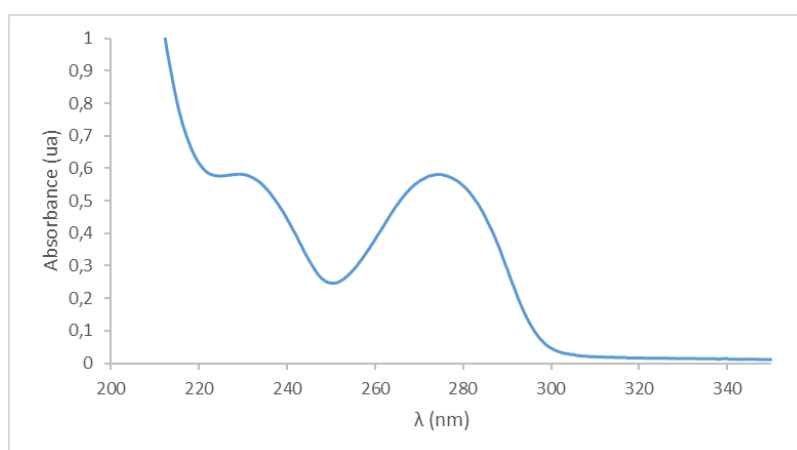


Figure 106 : Spectre UV de la solution de LAVR-289 avec le SDS

Les absorbances, de la Figure 106, mesurées à 267 nm et 278 nm sont de 0,522 et de 0,565, respectivement. En reprenant les spectres UV de la Figure 96, les aires obtenues à 267 nm pour l'intermédiaire **9**, pour la forme protonée et pour la forme neutre sont de 0,357 et 0,34. Ainsi, le ratio des absorbances à 267 nm entre la forme neutre et la forme protonée est de 0,95. En émettant

l'hypothèse que ce ratio est identique pour le LAVR-289, nous pouvons l'appliquer et déterminer la concentration de LAVR-289 dans la solution micellaire de SDS.

En rapportant ce ratio à l'aire mesurée à 267 nm pour la solution de SDS, l'aire corrigé est de 0,497.

En reportant cette aire sur la gamme d'étalonnage de la gamme UV (cf. chapitre 2, paragraphe 2.1), dont l'équation est

$$A = 8554,4 \times C_{LAVR} \quad (\text{Eq. 13})$$

la concentration de la phase aqueuse peut être calculée. En prenant en compte le facteur de dilution, la concentration du LAVR-289 est de 4,65 mM, cela correspond à la solubilisation de 92% (quasi-totale) de la quantité initiale du composé hydrophobe.

9.3. Test *in vitro*

La formulation a ensuite été évaluée *in vitro* sur des cellules infectées par le virus de la vaccine par la société Néovirtech du Dr Franck Gallardo. L'activité antivirale (Figure 107) et la toxicité (Figure 108) de notre formulation ont été mesurées et comparées à celle du LAVR-289 dans le DMSO et celle de SDS.

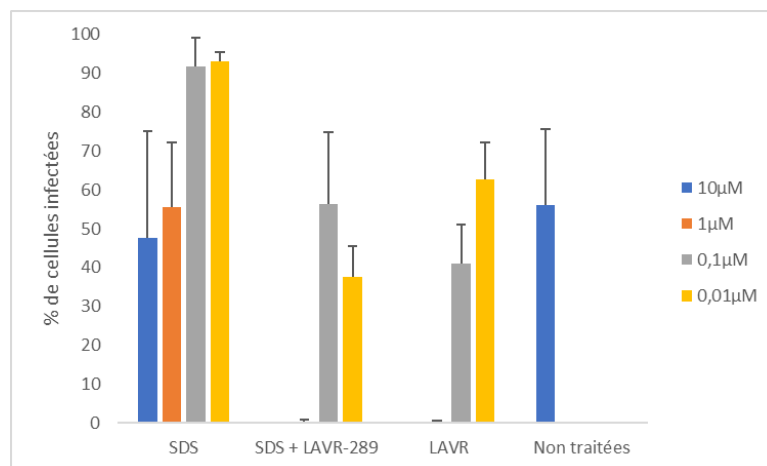


Figure 107 : Pourcentage d'infection des cellules en fonction de l'échantillon et de la concentration

L'activité de notre formulation est quasiment identique à celle du LAVR-289 avec une inhibition très marquée à 10 et 1 µM.

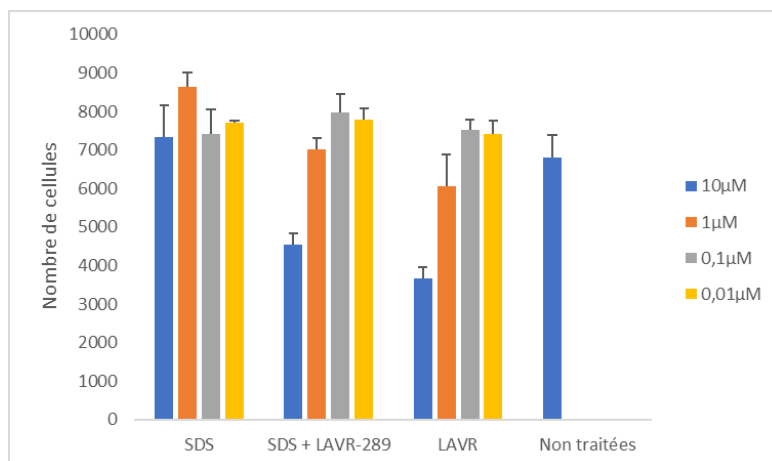


Figure 108 : Nombre de cellules viables après 24 h de mise en contact avec les différentes solutions

Concernant la toxicité, la solution de SDS seule n'est pas cytotoxique aux quatre concentrations étudiées. A la concentration de 10 µM, le LAVR-289 présente une cytotoxicité qui semble légèrement atténuée en présence de SDS. Ainsi, en couplant ses deux graphiques, la formulation du LAVR-289 avec le SDS à la concentration de 1 µM semble être un bon compromis entre une activité antivirale marquée et une cytotoxicité limitée.

En complément de ces études, une analyse en diffusion dynamique de la lumière de la solution de LAVR-289 dans le SDS nous indique une taille d'objet de 218 ± 23 nm. Concernant la nature de ces nano-objets, l'hypothèse la plus probable est que le LAVR-289 s'intercale dans la couche formée par les tensio-actifs et crée une interaction de type ionique avec le groupement sulfate et une interaction de type London ou de dispersion entre la chaîne alkyle à 12 carbones du SDS et le groupement HDP (Figure 109).

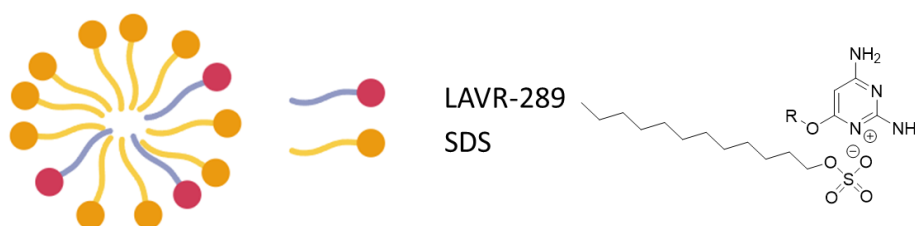


Figure 109 : Représentation plausible de la micelle SDS-LAVR-289

9.4. Alternatives au SDS

Bien que les résultats de cytotoxicité *in vitro* de notre formulation soient prometteurs, l'utilisation du SDS est discutée : son utilisation dans les dentifrices est assez controversée et son utilisation dans l'agroalimentaire est interdite en France. Cependant, récemment, ce tensioactif a été utilisé comme excipient ($\leq 0,1\%$, m/v) afin d'augmenter la charge de surface des niosomes et améliorer la stabilité de

vésicules.¹²⁹ L'encapsulation de la salidoside par des niosomes contenant du SDS ont montré une bonne compatibilité avec les cellules de la peau et une amélioration de l'administration par voie transdermique.

Afin d'éviter toute toxicité liée à ce tensioactif, bien qu'il soit référencé dans le « handbook of Pharmaceutical excipients », ¹³⁰ nous avons envisagé de remplacer le SDS par des dérivés d'acides gras linéaires saturés à longueurs de chaîne comprises entre 12 et 18 carbones (Tableau 27). Ces molécules sont naturellement tensioactives, constituées d'une partie hydrophobe représentée par la chaîne aliphatique et d'une partie hydrophile (entouré en rouge sur la Figure 110), la fonction acide carboxylique (entouré en bleu sur la Figure 110).



Figure 110 : Structure chimique d'un acide carboxylique (exemple avec l'acide laurique)

Ces acides gras sont couramment utilisés dans la cosmétique et comme stabilisateurs d'émulsions. La faible taille de leur tête polaire et leur longue chaîne carbonée entraînent une température de Krafft (T_{Krafft}) élevée, température minimale requise pour la formation de micelle. Au-dessous de cette température, les agrégats ne peuvent pas se former et les tensioactifs peuvent cristalliser. Pour les acides gras, cette température augmente proportionnellement au nombre de carbones : elle est de 25 °C pour le laurate de sodium et de 71 °C pour le stéarate de sodium (Tableau 27).

Tableau 27 : Evolution de la température de Krafft avec la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras et de la nature du contre-ion

Nombre de carbone	Nom	Contre-ions	T_{Krafft} (°C) ¹³¹
12	Acide laurique	Na ⁺	25
		K ⁺	10
14	Acide myristique	Na ⁺	45
		K ⁺	30
16	Acide palmitique	Na ⁺	60
		K ⁺	46
18	Acide stéarique	Na ⁺	71
		K ⁺	57

¹²⁹ Zhang, Y.; Jing, Q.; Hu, H.; He, Z.; Wu, T.; Guo, T.; *et al.* Sodium Dodecyl Sulfate Improved Stability and Transdermal Delivery of Salidoside-Encapsulated Niosomes via Effects on Zeta Potential. *Int. J. Pharm.* **2020**, *580*, 119183.

¹³⁰ Raymond, C.; Rowe, P.J.S.; Marian, E. *Quinn Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed.; Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association: Washington, DC, USA, 2009.

¹³¹ Fameau, A.-L.; Zemb, T. Self-Assembly of Fatty Acids in the Presence of Amines and Cationic Components. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 43–64.

Elle est également dépendante du contre-ion utilisé : pour une même longueur de chaîne, cette température est de 25 °C pour le laurate de sodium et de 10 °C pour le laurate de potassium (Tableau 27). A titre d'information la température de Krafft (T_{Krafft}) du SDS est de 15 °C.¹³²

En se basant sur ce tableau, l'acide laurique, au vu de ces températures de Krafft basses, semble être le meilleur tensioactif pouvant substituer le SDS. Toutefois, il est également nécessaire de mentionner que les acides gras sont sensibles au pH car il influence l'état d'ionisation de la tête polaire qui peut être neutre (COOH) ou déprotoné (COO⁻). Le pKa de ces acides va également être dépendant et proportionnel à la longueur de la chaîne alkyle. Le pKa des acides gras à faible longueur de chaîne, comme l'acide hexanoïque, est proche de celui du pKa de l'acide acétique qui est de 4,8. En revanche, les acides gras à plus grande longueur de chaîne présentent un pKa plus élevé. L'acide laurique, l'acide myristique ou encore palmitique possèdent des pKa de 7,5, 8,6, et 8,6, respectivement.¹³³ Le comportement de l'acide gras en solution va donc dépendre du pH¹³⁴ :

- ✓ Quand $\text{pH} > \text{pKa}$, l'acide gras est présent sous sa forme ionisée et va alors s'assembler sous forme de micelles.
- ✓ Quand $\text{pH} < \text{pKa}$, l'acide gras est présent sous sa forme neutre. La dispersion des acides n'est plus possible et ceux-ci vont agir comme une phase huileuse ou comme un précipité.
- ✓ Quand $\text{pH} = \text{pKa}$, les deux formes vont co-exister en solution ce qui va induire la formation d'assemblage sous forme de bicouche.

Ainsi, en prenant l'exemple de l'acide laurique, celui-ci ne peut être utilisé, pour former des micelles, que pour des $\text{pH} > 9,5$. Cependant, comme montré précédemment dans le paragraphe 4, le LAVR-289 est instable en conditions basiques, rendant ainsi l'utilisation de l'acide laurique incompatible avec notre principe actif.

Conclusions et perspectives

Au cours de ces premiers travaux de thèse, nous avons **mis en place une méthode analytique HPLC-UV** qui nous a permis de vérifier la pureté des lots de synthèse et de mettre en évidence la présence systématique de deux composés (Figure 111). La présence de ces composés **rend plus complexe** la purification envisagée du LAVR-289 par chromatographie semi-préparative.

¹³²Vautier-Giongo, C.; Bales, B. L. Estimate of the Ionization Degree of Ionic Micelles Based on Krafft Temperature Measurements. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5398–5403.

¹³³Kanicky, J. R.; Poniatoski, A. F.; Mehta, N. R.; Shah, D. O. Cooperativity among Molecules at Interfaces in Relation to Various Technological Processes: Effect of Chain Length on the pKa of Fatty Acid Salt Solutions. *Langmuir*. **2000**, *16*, 172–177.

¹³⁴Cistola, D. P.; Hamilton, J. A.; Jackson, D.; Small, D. M. Ionization and Phase Behavior of Fatty Acids in Water: Application of the Gibbs Phase Rule. *Biochemistry*. **1988**, *27*, 1881–1888.

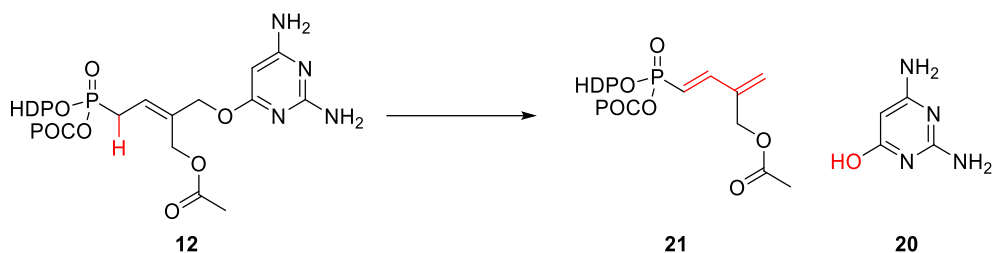


Figure 111 : Impuretés systématiques dans les lots du LAVR-289

Cette méthode analytique nous a aussi permis de déterminer la **stabilité plasmatique du LAVR-289**. Cette dernière étude a été complétée avec un **couplage UPLC-HRMS** qui a contribué à la détermination des structures de métabolites. Parmi **les 11 métabolites** trouvés seuls 3 avaient été anticipés, ce qui montre donc la complexité du schéma métabolique de ce promédicament. La stabilité plasmatique à 50% du LAVR-289 de **6 h** a été comparée à celle de deux analogues, le *bis*(POC)-LAVR (**41**) et le LAVR-290 (**42**). Ceux-ci ont montré une stabilité à 50% de 12 et 6 fois inférieure, respectivement, à celle du LAVR-289, laissant envisager que le groupement **HDP confère une stabilité supplémentaire** à la molécule. La méthode analytique nous a également permis de connaître la **stabilité au pH** de cette molécule. Cette molécule est **stable en milieu acide et se dégrade en milieu basique amenant à la formation du composé 34, issue de la labilité du proton en α du phosphore**. La séparation analytique des **4 diastéréoisomères** dus à la chiralité du phosphore (non contrôlée durant la synthèse) semble nous indiquer qu'une forme P_R ou P_S est majoritaire. La synthèse de ces résultats est regroupé dans le schéma ci-dessous (Figure 112).

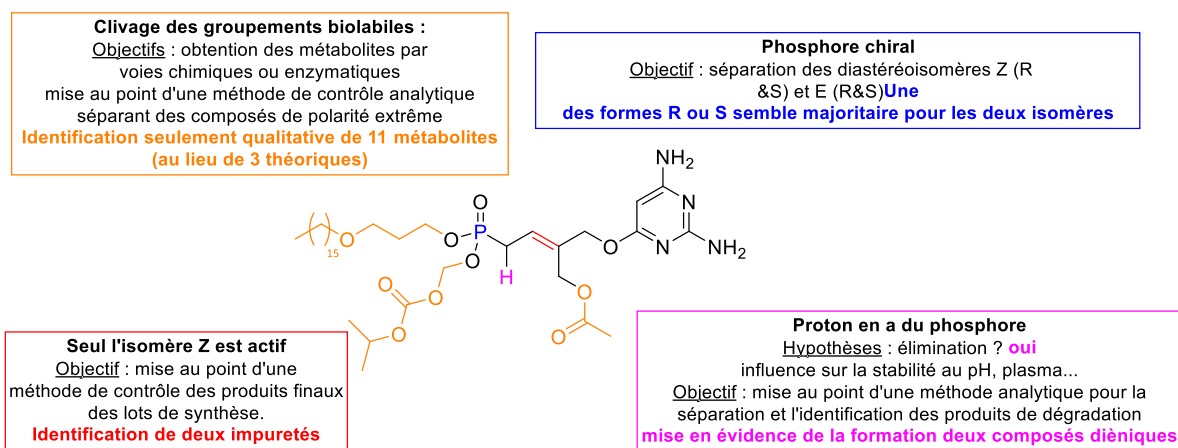


Figure 112 : Résumé des résultats analytiques

Malgré la difficulté engendrée par la purification des deux isomères, nous avons pu **déterminer les paramètres physico-chimiques** du LAVR-289. Le **pKa, la CAC et le Log P** ont pu être déterminés par spectroscopie UV-visible, HPLC-UV et spectroscopie de fluorescence, respectivement (Figure 113). Notre modèle développé pour le Log P pourra être utilisé afin de déterminer le Log P d'autres promédicaments nucléosidiques synthétisés au laboratoire.

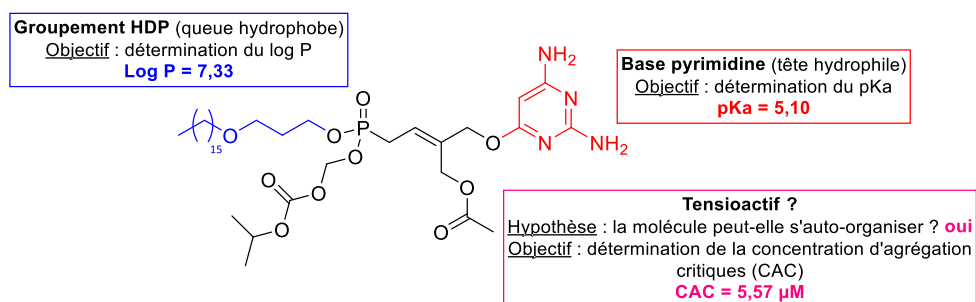


Figure 113 : Résumé des résultats des paramètres physico-chimiques

Par ailleurs, la synthèse des métabolites (cf. Figure 68 pour les structures), de la forme phosphonate libre et des deux diènes issus de la dégradation du LVR-289 sera nécessaire pour compléter les études de stabilité plasmatique. Ces composés serviront de **standards analytiques**, permettront d'effectuer les gammes HPLC-UV et UPLC-UV et ainsi de pouvoir **les doser dans le plasma**.

La synthèse des diènes, nous permettra d'en avoir accès à des quantités suffisantes pour mener à bien tout type d'activité biologique, cytotoxicité, activité antivirale et **quantifier la présence du « diène sans base » 21** dans les lots de synthèse.

A la suite de ces études, deux problèmes majeurs ont été identifiés :

- ✓ **La séparation et la purification des isomères Z (Pr, Ps) / E (Pr, Ps)** sur gel de silice ainsi que la purification en semi-préparative restent complexes et difficiles. Pour rappel, la montée en échelle est l'un des points importants dans le développement d'un médicament. Pour surmonter ces problèmes, une séparation chirale par chromatographie en phase supercritique pourrait être envisagée.
- ✓ **Son importante hydrophobie.** La formation de sel ne permet pas de diminuer l'apolarité de la molécule. Les données théoriques calculées par Marvin Sketch® indiquent que la forme neutre sera toujours considérée comme non soluble dans l'eau ($HLB_{\text{neutre}} = 8,72$; $HLB_{\text{protoné}} = 6,83$). Une autre manière de diminuer l'hydrophobie du LVR-289, tout en conservant le groupement POC, est de diminuer la longueur de la chaîne alkyle du groupement HDP. Ainsi, deux analogues du LVR-289 ayant des chaînes réduites de 10 et 6 carbones ont été synthétisés, au sein du laboratoire. Le Log $D_{7,4}$ de 7,37 pour le LVR-289 diminue d'environ 3 et 4 unités pour les analogues à 10 et 6 carbones, respectivement (Tableau 28).

Tableau 28 : Log P et Log $D_{7,4}$ théorique du LVR-289 et des analogues à 6 et 10 carbones

Composé	Nbres carbones Chaîne alkyle	Log P *	Log $D_{7,4}$ *	Solubilité (Log $S_{7,4}$) *
LVR-289 (neutre)	16	7,39	7,37	-9,36
LVR-291	10	4,87	4,85	-6,87
LVR-292	6	3,18	3,17	-5,15

* Estimé par le logiciel Marvin Sketch®

Cependant, la diminution de l'hydrophobie du LAVR-289, par diminution du nombre de carbone de la chaîne alkyle, a engendré une perte d'activité biologique sur les virus de la vaccine. Toutefois, ces résultats sont concordants avec ceux observés avec les différentes chaînes alkyles développées sur le cidofovir^{26,27} (cf. chapitre 1, paragraphe 2.3).

En se basant sur ces résultats et sur les paramètres physico-chimiques, des premiers essais d'encapsulation du LAVR-289 au sein de nanoémulsions lipidiques ont été entrepris au sein du laboratoire.

Chapitre 3 : Les polymères à empreintes moléculaires

1. Généralité sur les polymères à empreintes moléculaires

Le développement des polymères empreintes moléculaires a commencé dans les années 1970 par les travaux de Wulff et Sarhan¹³⁵ puis a été poursuivi par ceux de Arshady et Mosbach¹³⁶ dans les années 1980. La synthèse de ces matériaux se fait en présence de la molécule d'intérêt, appelée « template », ce qui permet la création de sites actifs spécifiques et complémentaires entre la matrice polymérique et le template. Cette technologie peut être assimilée aux phénomènes de reconnaissance de type anticorps-antigène ou enzyme-substrat, mettant en jeu le concept clef-serrure proposé pour la première fois en 1894 par E. Fischer¹³⁷. Les polymères à empreintes moléculaires (Molecularly Imprinted Polymers ou MIP, en anglais) sont obtenus par copolymérisation d'un ou plusieurs monomères fonctionnels et d'un agent réticulant dont les choix vont être déterminés par la nature de la molécule template et les interactions souhaitées. La synthèse commence par une étape cruciale qui repose sur l'association de la molécule cible et du ou des monomères fonctionnels selon différentes approches afin de former le complexe de pré-polymérisation. Les interactions stabilisant ce complexe peuvent être de types covalentes ou non covalentes, tels que les interactions intermoléculaires basées sur l'attraction électrostatique, les forces de Van der Waals, les effets hydrophobes, l'échange de ligands avec un cation métallique ou la liaison hydrogène. Après l'ajout d'un réticulant, dont le rôle est d'assurer la stabilité de la structure tridimensionnelle du polymère, la polymérisation est généralement initiée par les voies thermique, photochimique ou à l'abri de la lumière à différentes températures (cryogel). Après polymérisation, la molécule cible est extraite de la matrice polymérique par des lavages successifs aboutissant à un polymère possédant en son sein des cavités « empreintes » du template utilisé. Ces cavités ou empreintes montrent des complémentarités de taille, de forme et de caractéristiques chimiques (groupes fonctionnels) avec la molécule cible¹³⁸ (Figure 114).

En plus de cette forte reconnaissance moléculaire, les MIPs présentent des stabilités physiques et chimiques plus importantes que les macromolécules naturelles, telles que les enzymes ou les anticorps, qui jouent le rôle de récepteurs. En effet, ces matériaux peuvent résister à des pressions et des températures élevées, aux solvants organiques ainsi qu'à des solutions aqueuses avec des pH

¹³⁵ Wulff, G.; Sarhan, A. The Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 364–364.

¹³⁶ Arshady, R.; Mosbach, K. Mosbach, K., Synthesis of substrate - selective polymers by host - guest polymerization. *Makromol. Chem.* **1981**, *182*, 687–692.

¹³⁷ Fischer, E. Einfluss Der Configuration Auf Die Wirkung Der Enzyme. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985–2993.

¹³⁸ Whitcombe, M. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A. Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years 2004-2011: molecular imprinting science and technology: 2004-2011. *J. Mol. Recognit.* **2014**, *27*, 297–401.

extrêmes.¹³⁹ De plus, la synthèse de ces matériaux est facile à mettre en œuvre et est également peu onéreuse.

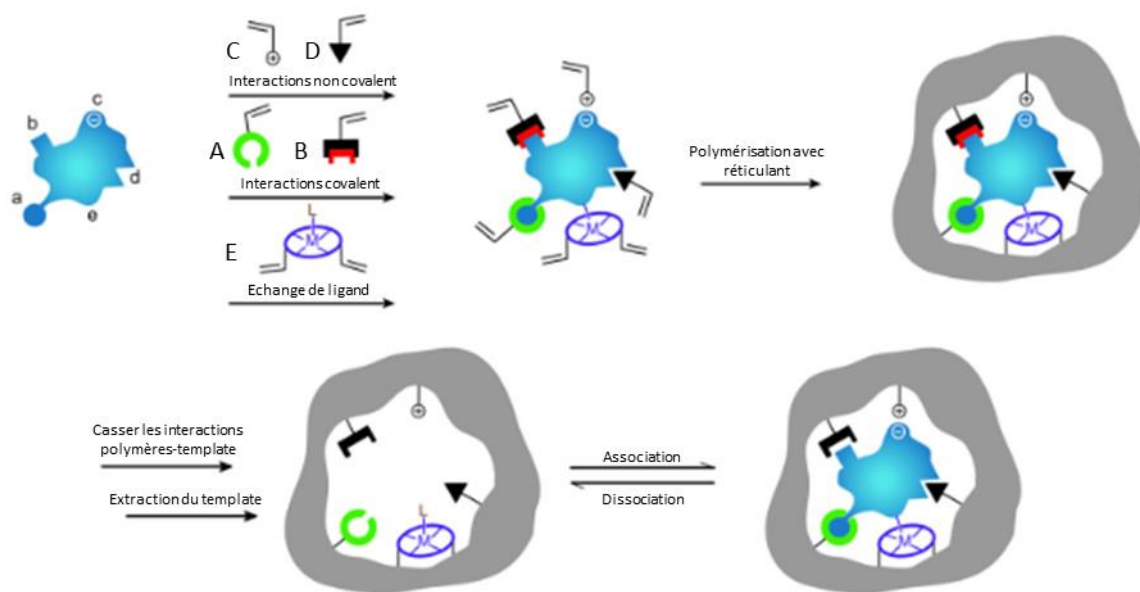


Figure 114 : Synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires : formation des différentes interactions entre le template et les différents monomères fonctionnels : (A-B) interactions covalentes réversibles, (C) interactions électrostatiques, (D) interactions hydrophobes ou de type Van der Waals, (E) interactions de type métal-ligand ; ces interactions sont formées respectivement avec les groupes fonctionnels adéquats de la molécule cible (a-e). (Adaptée de Whitcombe et al.¹³⁸)

Les MIPs permettent des applications variées. Ils ont montré des affinités de reconnaissance avec de très nombreuses molécules cibles différentes telles que des principes actifs de médicaments, des acides aminés, des polluants, des pesticides... jusqu'à des macromolécules, telles que des protéines, des peptides, ou encore des lipides.¹⁴⁰ Plus surprenant encore, certains MIPs ont été synthétisés afin de reconnaître des micro-organismes, comme des bactéries, des virus, voire même des cellules humaines (Figure 115), on parle alors de polymères à empreintes de surfaces ou en anglais « Surface Imprinted Polymers ».¹⁴¹ Ces matériaux innovants sont utilisés dans des domaines variés comme l'alimentaire, la cosmétique ou le biomédical... En effet, les MIPs peuvent être utilisés comme adsorbants pour extraire ou séparer sur colonne chromatographique des molécules actives dans une matrice complexe¹⁴², ou comme films sensibles de capteurs chimiques.¹⁴³ Parmi leurs applications biomédicales, les MIPs peuvent servir à diagnostiquer des maladies, comme le cancer, en

¹³⁹ Svenson, J.; Nicholls, I. A. On the Thermal and Chemical Stability of Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *435*, 19–24.

¹⁴⁰ El-Schich, Z.; Zhang, Y.; Feith, M.; Beyer, S.; Sternbæk, L.; Ohlsson, L.; *et al.* Molecularly Imprinted Polymers in Biological Applications. *BioTechniques.* **2020**, *69*, 406–419.

¹⁴¹ Cui, F.; Zhou, Z.; Zhou, H. S. Molecularly Imprinted Polymers and Surface Imprinted Polymers Based Electrochemical Biosensor for Infectious Diseases. *Sensors.* **2020**, *20*, 996.

¹⁴² Henry, N.; Favetta, P.; Delépée, R.; Seigneuret, J. -M.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of a Molecularly Imprinted Polymer to Isolate Glucosamine from Plant Extracts by an Ionic–Non-covalent Dual Approach. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, *37*, 196–206.

¹⁴³ Leibl, N.; Haupt, K.; Gonzato, C.; Duma, L. Molecularly Imprinted Polymers for Chemical Sensing: A Tutorial Review. *Chemosensors.* **2021**, *9*, 123.

reconnaissant sélectivement des biomarqueurs de la maladie dans des matrices biologiques¹⁴⁴, être utilisés *in vivo* comme agents d'imagerie¹⁴⁵, ou servir de systèmes de délivrance de médicaments.¹⁴⁶

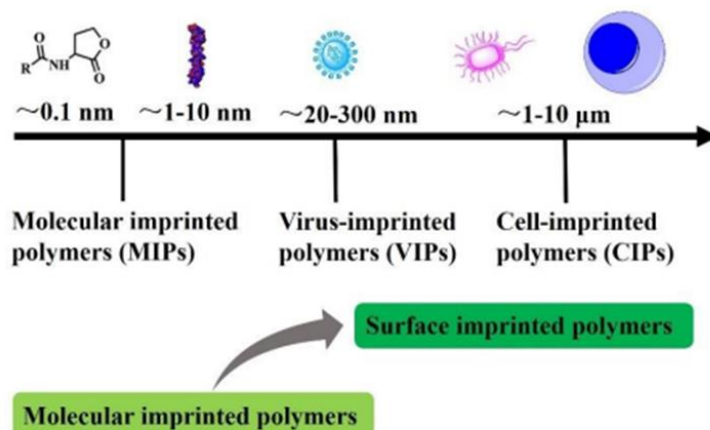


Figure 115 : Différents templates reconnus pour la synthèse des MIPs (adapté de Cui *et al.*¹⁴¹)

2. Les MIPs comme systèmes de libération contrôlée de bioactifs

Un grand nombre de principes actifs souffrent d'une faible solubilité et/ou d'une faible perméabilité et ne peuvent donc pas être administrés avec les formulations classiques. Les systèmes de délivrance (drug delivery systems, DDS) plus élaborés vont permettre de surmonter ces problèmes en protégeant et véhiculant la molécule active jusqu'à sa cible thérapeutique puis en la libérant à une concentration efficace. La régulation du processus de libération du médicament vise à prolonger la durée de l'action pharmacologique, à réduire les effets indésirables, à minimiser la fréquence d'administration et à améliorer l'observance thérapeutique du patient. Parmi les systèmes de délivrance, les MIPs répondent parfaitement à ce cahier des charges et permettraient, étant donné leurs nombreux avantages, de surmonter les limitations existantes des DDS polymériques conventionnels (Figure 116).

L'utilisation des MIPs en tant que transporteurs de médicaments est un domaine récent dans le champ d'application de ces polymères.¹⁴⁷ Les recherches se sont concentrées sur le développement de

¹⁴⁴ Krstulja, A.; De Schutter, C.; Favetta, P.; Manesiotis, P.; Agrofoglio, L. A. Artificial Receptors for the Extraction of Nucleoside Metabolite 7-Methylguanosine from Aqueous Media Made by Molecular Imprinting. *J. Chromatogr. A*. **2014**, *1365*, 12–18.

¹⁴⁵ Vaneckova, T.; Bezdekova, J.; Han, G.; Adam, V.; Vaculovicova, M. Application of Molecularly Imprinted Polymers as Artificial Receptors for Imaging. *Acta Biomater*. **2020**, *101*, 444–458.

¹⁴⁶ Ayari, M. G.; Favetta, P.; Warszycki, D.; Vasseur, V.; Hervé, V.; Degardin, P.; *et al.* Molecularly Imprinted Hydrogels Selective to Ribavirin as New Drug Delivery Systems to Improve Efficiency of Antiviral Nucleoside Analogue: A Proof-of-Concept Study with Influenza A Virus. *Macromol. Biosci*. **2022**, *22*, 2100291.

¹⁴⁷ Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. Molecularly Imprinted Polymers for Drug Delivery. *J. Chromatogr. B*. **2004**, *804*, 231–245.

systemes polymériques ayant la capacité de reconnaître spécifiquement la molécule d'intérêt et de la libérer en réponse à des stimuli externes.¹⁴⁸

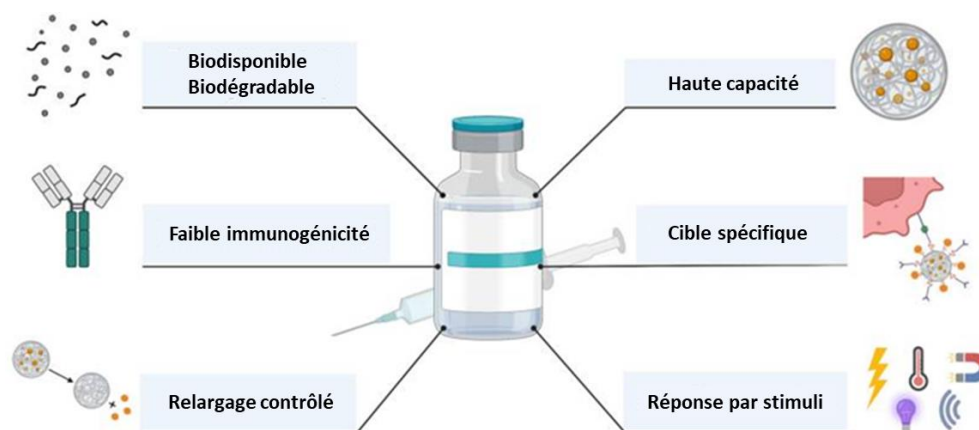


Figure 116 : Avantages des MIPs comme DDS (adapté de Bărăian *et al.*¹⁴⁹)

Ainsi, contrairement aux autres types de DDS, les polymères à empreintes moléculaires sont capables, grâce aux interactions spécifiques « polymère-template », de « retenir » le principe actif de façon énergétique au sein de sa cavité et de ralentir sa libération *in vivo*, provoquant ainsi un relargage contrôlé. En modulant la sélectivité du MIP, c'est-à-dire la stabilité du complexe principe actif-fonctions chimiques présentes dans la cavité, ou énergie d'association principe actif-cavité, le processus de libération est plus ou moins retardé. De plus, le rapport entre le nombre de molécules de réticulant et celui du template influe sur la rigidité de la cavité augmentant ainsi la sélectivité de reconnaissance moléculaire. Mais, si ce ratio est trop important, alors la molécule d'intérêt aura beaucoup de difficultés à quitter sa cavité dans les conditions physico-chimiques correspondant aux milieux physiologiques. Ainsi, pour bénéficier d'un profil de libération adéquat, de type retardé ou prolongé, il faut que le MIP bénéficie d'une mobilité de ses chaînes polymériques accrue. C'est pourquoi, les MIPs possédant un degré de réticulation plus faible que ceux utilisés pour mener à bien une extraction sélective d'un composé d'intérêt dans une matrice chargée sont plus corrélés à une application de type administration et délivrance d'un principe actif.

Pour des applications médicales, il est extrêmement important que le matériau synthétisé puisse être non seulement performant dans un environnement aqueux mais aussi être toléré par l'organisme dans lequel il sera mis en contact ou absorbé. Ainsi, pour obtenir cette biocompatibilité et diminuer la toxicité, il est essentiel de privilégier l'utilisation de solvants organiques non toxiques, d'effectuer une extraction soignée du template et éliminer les réactifs, monomères, réticulant et initiateur, n'ayant pas réagi. Des polymères à base d'acides acryliques ou méthacryliques se retrouvent largement utilisés

¹⁴⁸ Zhang, LP., Liu, Z. Stimuli Responsive Imprinted DDS. In *Molecularly Imprinted Polymers as Advanced Drug Delivery Systems*. Springer Singapore, 2021; pp 93–109.

¹⁴⁹ Bărăian, A.-I.; Iacob, B.-C.; Bodoki, A. E.; Bodoki, E. In Vivo Applications of Molecularly Imprinted Polymers for Drug Delivery: A Pharmaceutical Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14071.

dans les différentes applications des MIPs et peuvent aussi être envisagés dans le domaine des DDS au vu de leur biocompatibilité.¹⁵⁰ Cependant, la toxicité sur le long terme de ces matériaux polymériques, après administration chez l'être humain n'est pas complètement connue. Il faut donc, dans l'absolu, non seulement travailler sur des particules polymériques biocompatibles mais aussi biodégradables. La stabilité d'un MIP est donc une question complexe. Il est connu que cette dernière est généralement longue car les MIPs peuvent être stocker pendant plusieurs années à température ambiante sans perdre leur propriété de reconnaissance.¹⁵⁰ Mais, cette stabilité devrait pouvoir être raccourcie dès lors que le MIP est mis en contact d'un milieu physiologique, permettant sa biodégradabilité. Cette biodégradation peut aussi être envisagée comme un des mécanismes de libération du principe actif. Les MIPs, en retenant le template au sein de leur réseau polymérique, ont l'avantage de le protéger des dégradations chimiques et enzymatiques extérieures qui pourraient se produire avant que le template n'atteigne sa cible thérapeutique. Paul *et al.*¹⁵¹ ont synthétisé un MIP sélectif de l'insuline et ont étudié sa capacité à délivrer l'insuline dans les intestins de rats. Après administration par voie orale, le nanomatériau s'est montré efficace pour libérer de façon prolongée l'insuline. Leur étude a également mis en avant la capacité de ce MIP à protéger le principe actif de la dégradation, et à améliorer son absorption gastro-intestinale.

Durant ces dernières années, le nombre de publications concernant le domaine d'application des MIPs comme systèmes d'administrations de médicament a considérablement augmenté. La première application d'un MIP en tant que DDS a été rapporté en 1998, avec le transport de la théophylline comme agent de traitement de l'asthme. Norell *et al.*¹⁵² ont montré que le polymère synthétisé avait une meilleure affinité avec la théophylline que la caféine qui diffèrent seulement d'un groupement méthyle. De plus ce polymère présentait un profil de relargage différent par rapport au matériau non imprimé. Ce polymère a été synthétisé à partir d'acide méthacrylique (MAA) comme monomère fonctionnel et l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) comme réticulant. La libération de la théophylline a été effectuée dans un tampon phosphate ou PBS (Phosphate buffered Saline) de pH neutre en ajustant la quantité de template chargée. Comme le montre la Figure 117, ce paramètre peut influencer le profil de libération.

¹⁵⁰ Liu, R.; Poma, A. Advances in Molecularly Imprinted Polymers as Drug Delivery Systems. *Molecules*. **2021**, *26*, 3589.

¹⁵¹ Paul, P. K.; Treetong, A.; Suedee, R. Biomimetic Insulin-Imprinted Polymer Nanoparticles as a Potential Oral Drug Delivery System. *Acta Pharm.* **2017**, *67*, 149–168.

¹⁵² Norell, M. C.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A. Theophylline Molecularly Imprinted Polymer Dissociation Kinetics: A Novel Sustained Release Drug Dosage Mechanism. *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 98–102.

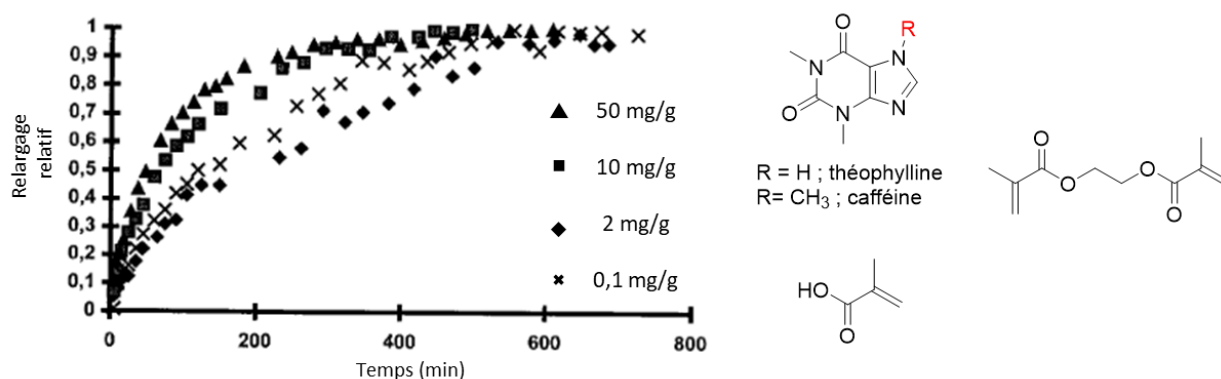


Figure 117 : Profils de relargage de la théophylline à partir des polymères imprimés chargés en mg de théophylline par gramme de MIP

Dans une autre étude menée par Allender *et al.*¹⁵³ le relargage du propranolol montre un profil de libération ralenti pour le MIP vis-à-vis du NIP. Suedee *et al.*¹⁵⁴ ont décrit une libération contrôlée énantiosélective. Le nanomatériau imprimé avec le *R*-propranolol, chargé avec un mélange des deux énantiomères, a montré un profil de relargage prolongé pour l'énantiomère *R*- en comparaison de celui obtenu pour l'énantiomère *S*-. Ces études ont permis de mettre en évidence la capacité des MIPs à libérer de manière différenciée deux formes énantiomériques d'un médicament.

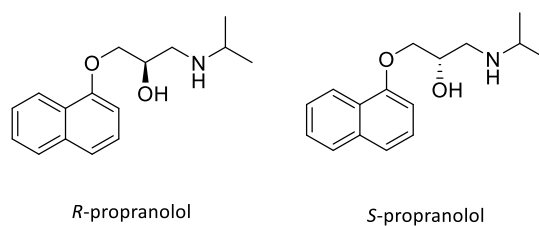


Figure 118 : Structures des énantiomères du propranolol

Le premier MIP à être administré et étudié *in vivo* chez la souris, a été synthétisé par Hoshino *et al.* en 2010.¹⁵⁵ Leurs recherches ont abouti à une plateforme capable de reconnaître dans un milieu biologique la méliittine, un peptide cytotoxique, principale constituant du venin des abeilles. Ces nanoparticules chargées sont ensuite éliminées du corps par phagocytose, permettant ainsi de neutraliser ce peptide et d'augmenter le taux de survie des souris. Par la suite, le premier MIP spécifiquement utilisé pour l'administration de médicaments et étudié *in vivo* sur des souris a été développé par Wu *et al.*¹⁵⁶ Leurs travaux, publiés en 2015, portaient sur la thérapie de l'infection à *Helicobacter pylori* traitée par des MIP chargés d'amoxicilline. Depuis, d'autres DDS ont été

¹⁵³ Allender, C. J.; Richardson, C.; Woodhouse, B.; Heard, C. M.; Brain, K. R. Pharmaceutical Applications for Molecularly Imprinted Polymers. *Int. J. Pharm.* **2000**, *195*, 39–43.

¹⁵⁴ Suedee, R.; Srichana, T.; Martin, G. P. Evaluation of Matrices Containing Molecularly Imprinted Polymers in the Enantioselective-Controlled Delivery of β -Blockers. *J. Control. Release.* **2000**, *66*, 135–147.

¹⁵⁵ Hoshino, Y.; Koide, H.; Urakami, T.; Kanazawa, H.; Kodama, T.; Oku, N.; *et al.* Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6644–6645.

¹⁵⁶ Wu, Z.; Hou, J.; Wang, Y.; Chai, M.; Xiong, Y.; Lu, W.; *et al.* Preparation and Evaluation of Amoxicillin Loaded Dual Molecularly Imprinted Nanoparticles for Anti- *Helicobacter Pylori* Therapy. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 1006–1014.

développés : Ayari *et al.*¹⁴⁶ ont synthétisé un hydrogel sélectif de la ribavirine pour le traitement de la grippe ; Pawley *et al.*¹⁵⁷ ont étudié le relargage de l'aspirine à l'aide d'une matrice d'argent nanoporeuse ; tandis que Anirudhan *et al.*¹⁵⁸ ont synthétisé des lentilles de contact imprimées, réutilisables et capables de contrôler le relargage du timolol ; ou encore, Kazemi *et al.*¹⁵⁹ ont créé des nanoparticules magnétiques polymériques pour la libération du létrozole dans le cadre du traitement du cancer du sein.

Ces différents exemples nous montrent que les utilisations des MIPs en tant que DDS visent diverses pathologies telles que le cancer, les maladies du système nerveux central ou encore les infections virales. De leur administration, qui peut se faire aussi bien par voie orale, parentérale ou topique, va dépendre la nature et la forme du polymère.

3. Synthèse des polymères à empreinte moléculaire

3.1. Les différentes méthodologies de synthèse

Les polymères à empreintes moléculaires sont synthétisés selon trois approches différentes : covalente, non-covalente ou semi-covalente (Figure 119). Pour les 3 approches, les monomères fonctionnels doivent avoir la capacité de créer des interactions avec le template lors de la formation du complexe de pré-polymérisation. Parmi ces stratégies, l'approche non-covalente est la plus utilisée en car :

- ✓ elle ne nécessite pas de modification chimique du template,
- ✓ le lavage du template est généralement plus facile,
- ✓ un grand nombre de fonctionnalités chimiques peuvent être utilisées pour créer des interactions spécifiques,
- ✓ la synthèse est facile à mettre en œuvre.

¹⁵⁷ Pawley, C.; Perez-Gavilan, A.; Foley, K.; Lentink, S.; Welsh, H.; Tuijthof, G.; *et al.* Studying the Drug Delivery Kinetics of a Nanoporous Matrix Using a MIP-Based Thermal Sensing Platform. *Polymers*. **2017**, *9*, 560.

¹⁵⁸ Anirudhan, T. S.; Nair, A. S.; Parvathy, J. Extended Wear Therapeutic Contact Lens Fabricated from Timolol Imprinted Carboxymethyl Chitosan-g-Hydroxy Ethyl Methacrylate-g-Poly Acrylamide as a Onetime Medication for Glaucoma. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *109*, 61–71.

¹⁵⁹ Kazemi, S.; Sarabi, A. A.; Abdouss, M. Synthesis and Characterization of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Letrozole. *Korean J. Chem. Eng.* **2016**, *33*, 3289–3297.

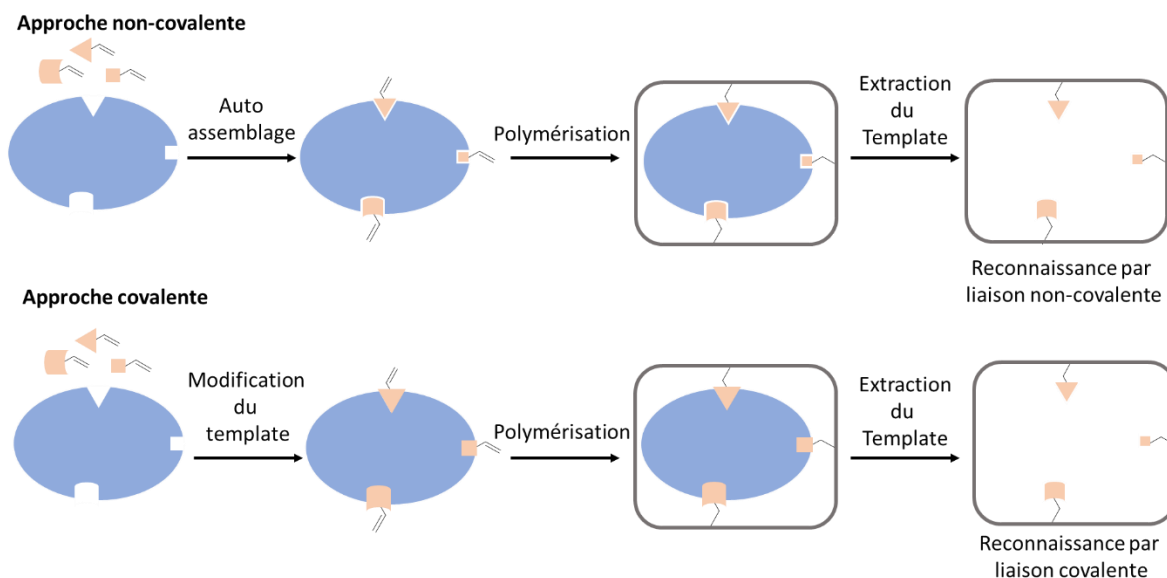


Figure 119 : Représentation des approches covalente et non covalente dans la conception des MIPs (Adapté de Yan *et al.*¹⁶⁰)

3.1.1. Approche covalente

Dans cette approche, historiquement développée en 1972 par Wulff *et al.*¹³⁵, la molécule cible est liée de manière covalente aux monomères fonctionnels. Le complexe de pré-polymérisation est donc obtenu par réaction chimique entre le template et les monomères formant des liaisons réversibles. Après polymérisation, le template est clivé chimiquement et extrait de la matrice, formant le matériau imprimé. L'avantage principal de cette technique est la formation d'un complexe template/monomère stœchiométrique permettant une plus grande homogénéité des sites actifs. L'un des premiers exemples de cette approche a été proposé et publié par Wulff *et al.*¹⁶¹ qui ont créé des liaisons covalentes de type ester boronate entre des diols-*cis* portés par les sucres, tels que le fructose ou le galactose, et un acide boronique (Figure 120). Par la suite, cette approche a été étendue à d'autres molécules telles que les nucléosides.¹⁶²

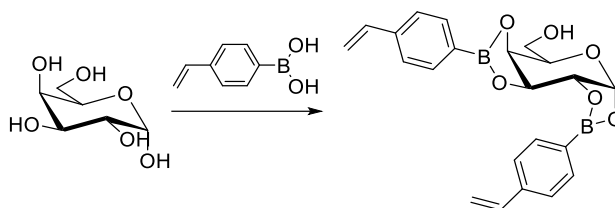


Figure 120 : Schéma de la complexation entre le galactose et l'acide 4-vinylphényl boronique

¹⁶⁰ Yan, H.; Row, K. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int. J. Mol. Sci.* **2006**, *7*, 155–178.

¹⁶¹ Wulff, G.; Schauhoff, S. Enzyme-Analog-Built Polymers. 27. Racemic Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting. Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional Groups versus Spatial Requirements. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395–400.

¹⁶² Jégourel, D.; Delépée, R.; Breton, F.; Rolland, A.; Vidal, R.; Agrofoglio, L. A. Molecularly Imprinted Polymer of 5-Methyluridine for Solid-Phase Extraction of Pyrimidine Nucleoside Cancer Markers in Urine. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8932–8939.

Cependant, cette approche est limitée aux molécules empreintes possédant des groupements pouvant établir des liaisons covalentes tels que les fonctions amines ou alcools, par exemple. De plus, le clivage des liaisons covalentes réversibles se fait généralement à des valeurs de pH inatteignables physiologiquement, rendant cette approche peu exploitée dans l'utilisation de MIPs comme systèmes de délivrance.

3.1.2. Approche non-covalente

L'approche non covalente, ou auto-assemblage, a été développée par Mosbach en 1981¹³⁶, en se basant sur une approche « biochimique » : dans la nature, la plupart des phénomènes de reconnaissances structurelles sont basés sur des interactions faibles non covalentes. Cette approche est la plus couramment utilisée dans la synthèse de MIP en raison de sa facilité de conception et du grand nombre de monomères fonctionnels capables d'interagir avec la molécule empreinte. Lors de la synthèse, les monomères fonctionnels interagissent avec le template via des interactions de types liaisons hydrogène, ionique et/ou Van der Waals ou hydrophobe, formant le complexe de pré-polymérisation. Ces mêmes interactions seront mises en jeu lors de l'étape de recapture. Cette reconnaissance spécifique, *via* des interactions faibles, nécessite l'utilisation d'un large excès de monomère (généralement le ratio template/monomère est de 1/4¹⁶³). En conséquence, cela donne lieu à un nombre élevé de configurations différentes du complexe template/monomère, qui conduit à une distribution hétérogène des sites actifs, dans le matériau final, ayant des constantes d'affinité différentes avec le template.¹⁶⁴ De plus, les monomères n'étant pas complexés avec le template sont incorporés aléatoirement dans la matrice polymérique, formant des sites non spécifiques. La seconde limitation de cette approche provient de la nature de ces interactions, qui sont stabilisées dans des environnements hydrophobes tandis que les environnements polaires les perturbent facilement. Avec cette approche, les propriétés de reconnaissance du MIP dépendent donc de la force des interactions existant entre le template et les monomères fonctionnels. Le bon choix des réactifs, basé sur leur fonctionnalité complémentaire avec le template, ainsi que le bon ratio template/monomère, permettent d'augmenter la sélectivité du MIP *vis-à-vis* du matériau non imprimé. Ainsi, plusieurs techniques prédictives¹⁶⁵ ont été mises en œuvre pour déterminer ces paramètres et obtenir la meilleure affinité. Parmi celles-ci, la titration par RMN, utilisée la première fois, en 1988, par Sellergren

¹⁶³ Vasapollo, G.; Sole, R. D.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; *et al.* Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5908–5945.

¹⁶⁴ Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D. Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584–4591.

¹⁶⁵ Karim, K.; Breton, F.; Rouillon, R.; Piletska, E.; Guerreiro, A.; Chianella, I.; *et al.* How to Find Effective Functional Monomers for Effective Molecularly Imprinted Polymers? *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1795–1808.

*et al.*¹⁶⁶ leur a permis de trouver que le complexe ayant la plus grande stabilité était l'association de 2 molécules d'acide méthacrylique (monomère) pour une molécule de phénylalanine (template). Contrairement à l'approche covalente, l'approche non-covalente peut être adaptée à un grand nombre de molécules empreintes, notamment aux nucléotides¹⁶⁷ ou les nucléosides,¹⁶⁸ et peut être utilisée pour créer des MIP-DDS.

3.1.3. Approche semi-covalente

L'approche semi-covalente introduite par Sellergren *et al.*¹⁶⁹, en 1990, est une approche hybride des deux précédentes : elle consiste à greffer, de manière covalente, sur la molécule template des fonctions polymérisables et d'utiliser ce composé comme lors d'une approche covalente. Le polymère formé subit ensuite un clivage chimique de la liaison et le template est retiré de la matrice. Lors de l'étape de recapture, la reconnaissance du template dans les sites actifs se fera *via* des interactions non covalentes entre les fonctions chimiques des monomères fonctionnels, se trouvant bien positionnés, et celle du template. Cette approche semble combiner les avantages des deux approches précédemment décrites.

En se basant sur cette approche, Whitcombe *et al.*¹⁷⁰ ont proposé la synthèse d'un MIP spécifique du cholestérol : celui-ci a été dérivé pour former l'ester de carbonate de cholestéryle (4-vinyl)phényle, et utilisé comme complexe. La fonctionnalité carbonate est ensuite clivée chimiquement, créant ainsi un espace dans le site actif et laissant un groupe hydroxyle phénolique auquel le cholestérol peut se lier par une liaison hydrogène (Figure 121).

Cependant, deux inconvénients sont à noter pour cette approche :

- ✓ La création du polymère est limitée au template possédant des fonctions pouvant être dérivées. Certaines molécules ne possédant qu'une fonctionnalité dérivable conduisent à des polymères à empreintes moléculaires ayant une faible capacité de reconnaissance. Par cette méthode, il est donc difficile de créer plusieurs sites d'interaction au sein de la cavité, pour une molécule bioactive.

¹⁶⁶ Sellergren, Boerje.; Lepistoe, Matti.; Mosbach, Klaus. Highly Enantioselective and Substrate-Selective Polymers Obtained by Molecular Imprinting Utilizing Noncovalent Interactions. NMR and Chromatographic Studies on the Nature of Recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853–5860.

¹⁶⁷ Spivak, D. A.; Shea, K. J. Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers. *Macromolecules.* **1998**, *31*, 2160–2165.

¹⁶⁸ Krstulja, A.; Lettieri, S.; Hall, A. J.; Delépée, R.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A. Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers Using 2',3',5'-Tri-O-Acyluridines as Templates for Pyrimidine Nucleoside Recognition. *Anal Bioanal Chem.* **2014**, *406*, 6275–6284.

¹⁶⁹ Sellergren, B.; Andersson, L. Molecular Recognition in Macroporous Polymers Prepared by a Substrate Analog Imprinting Strategy. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3381–3383.

¹⁷⁰ Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105–7111.

- ✓ Les contraintes stériques imposées par l'approche semi-covalente lors de la polymérisation peuvent être différentes de celles requises lors de la recapture du template par les interactions non covalentes.

Ces deux inconvénients peuvent donc être responsables d'une mauvaise sélectivité du MIP par rapport au NIP et engendrer une diminution des performances du matériau imprimé.

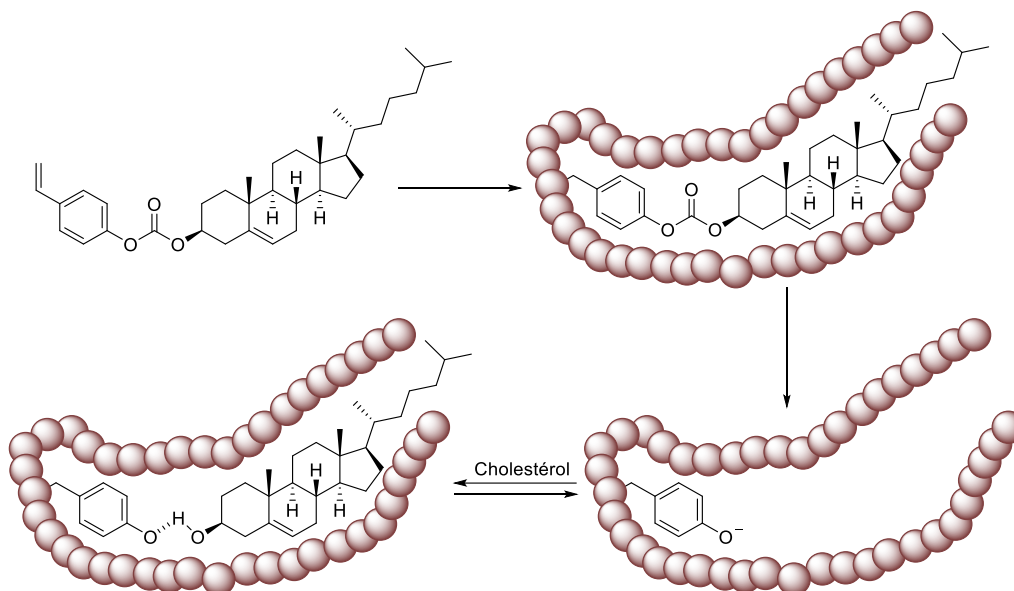


Figure 121 : Illustration de l'approche semi covalente lors de l'impression moléculaire du cholestérol en utilisant l'ester de carbonate de cholestéryle (4-vinyl)phényle comme monomère/template

Parmi ces trois techniques de synthèse, nous avons opté pour l'approche non-covalente pour la synthèse de nos polymères, qui est l'approche la plus appropriée pour créer des MIPs-DDS (cf. Chapitre 4).

3.2. Choix des réactifs pour la synthèse des MIPs

La synthèse d'un MIP est un processus complexe qui demande des compétences dans des domaines variés tels que les équilibres chimiques, la thermodynamique, la théorie sur la reconnaissance structurale ainsi que la chimie des polymères afin d'obtenir un matériau ayant une forte affinité avec le template. Le polymère formé doit être à la fois assez rigide afin de préserver la forme des cavités mais également assez flexible pour faciliter la ré-adsorption et le relargage de la molécule bioactive. Pour l'approche covalente et généralement pour la synthèse de MIPs, les choix du template, des monomères, du solvant, du réticulant et de l'initiateur sont des paramètres cruciaux et déterminants dans la nature du polymère.

3.2.1. Le template

Le template est la molécule cible que l'on cherche à imprimer dans le polymère et tient le rôle central dans la conception d'un MIP. En effet, de ses interactions avec les monomères fonctionnels va dépendre la nature et la forme des cavités. La molécule cible doit comporter un ou plusieurs groupes fonctionnels pouvant créer des interactions intermoléculaires avec les monomères choisis. Pour former un complexe stable, le template doit être inerte chimiquement vis-à-vis des monomères mais également être non dégradable et non modifiable sous l'effet de la température ou du rayonnement UV lors du processus de polymérisation.¹⁶⁰ Plusieurs procédés de polymérisation ont recours à un chauffage thermique, à l'utilisation de générateurs de radicaux libres ou à des solvants, pouvant affecter la stabilité du template.¹⁷¹ Ainsi, les groupements fonctionnels, mais aussi la forme et la taille de la molécule empreinte, permettent de choisir les monomères fonctionnels les plus adéquats à la formation d'un complexe de pré-polymérisation stable.¹⁷² A la suite de l'étape de polymérisation, l'étape de lavage permet d'extraire la molécule empreinte de la matrice polymérique afin d'éviter les cavités et les rendre disponibles à la molécule d'intérêt lors de l'étape de recapture. Lorenzo *et al.*¹⁷³ ont rapporté qu'une extraction incomplète du template lors du lavage du MIP pouvait engendrer une diminution de l'efficacité de la recapture. Il est à noter que le processus de lavage peut également être responsable de plusieurs problèmes, tels que la modification chimique de la surface du polymère,¹⁷² sa distorsion, l'effondrement ou la rupture des cavités imprimées¹⁷³ (Figure 122).

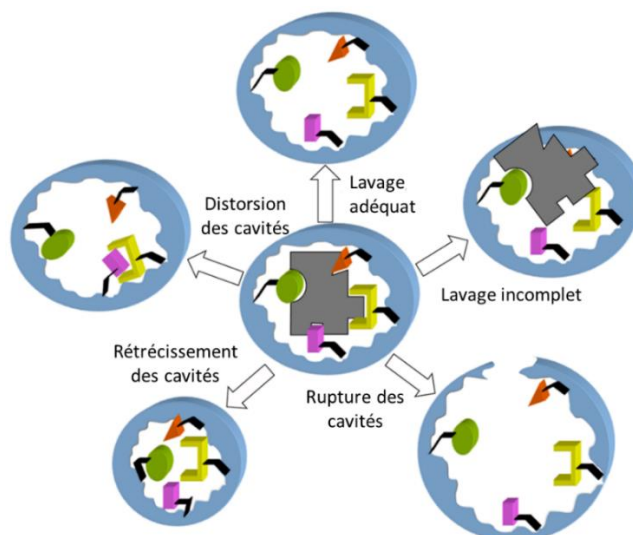


Figure 122 : Changements potentiels des cavités induits par le processus d'extraction du template (adapté de Lorenzo *et al.*¹⁷³)

¹⁷¹ Bunte, G.; Hürttlen, J.; Pontius, H.; Hartlieb, K.; Krause, H. Gas Phase Detection of Explosives Such as 2,4,6-Trinitrotoluene by Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *591*, 49–56.

¹⁷² Lamaoui, A.; Palacios-Santander, J. M.; Amine, A.; Cubillana-Aguilera, L. Molecularly Imprinted Polymers Based on Polydopamine: Assessment of Non-Specific Adsorption. *Microchem. J.* **2021**, *164*, 106043

¹⁷³ Lorenzo, R.; Carro, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. To Remove or Not to Remove? The Challenge of Extracting the Template to Make the Cavities Available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). *IJMS.* **2011**, *12*, 4327–4347.

De plus, pour obtenir une comparaison correcte, il est recommandé de réaliser le processus de lavage de manière identique entre le MIP et le NIP. Une différence de traitement entre les deux polymères peut engendrer des facteurs d'impression aberrants.^{172,173} Lamaoui *et al.*¹⁷⁴ comparent dans leur article les différents processus de lavage, dont l'utilisation d'un appareil micro-ondes ou d'un bain à ultrasons, en fonction du type de template choisi.

Malheureusement, le processus de lavage ne permet pas d'extraire 100% du template même après plusieurs cycles de lavage. Ce phénomène est dû généralement à la faible accessibilité du solvant aux cavités dans un matériau fortement réticulé, à une solubilité insuffisante du template dans le solvant, ou à une faible compétition du solvant vis-à-vis des interactions formées entre le template et la cavité imprimée.¹⁷⁵ Ceci engendre une diminution des sites actifs disponibles. Cependant, au cours de l'étape de recapture ou de libération finale, le changement de solvant, le temps de contact ou l'effet de compétition, peuvent amener le template résiduel à « sortir » de la matrice : ce phénomène est appelé saignement ou « bleeding ».

Dans le cas de la synthèse d'un MIP utilisé comme cargo, le problème lié à ce phénomène sera plus ou moins important en fonction de l'efficacité du principe actif, de la charge de ce même principe actif par masse de matériau et de la quantité de template restant à l'intérieur dudit matériau. La première réponse à cette question est que le principe actif relargué est la même molécule qui a servi à créer les cavités, et donc la toxicité et l'efficacité de ce principe actif sont connues. De plus, la quantité possiblement libérée par effet de « bleeding » serait très faible et ne changerait pas fondamentalement le profil de libération. Ces affirmations ne sont vérifiées que si le lavage a été correctement effectué.

Afin de contourner ce phénomène, plusieurs auteurs, dont les pionniers Matsui *et al.*¹⁷⁶ ont proposé la synthèse de matériaux imprimés en présence d'un analogue de la molécule d'intérêt nommé « dummy-template » ou « molécule empreinte factice ». Cette molécule « factice », doit posséder une structure proche de la molécule cible (une stéréochimie et des groupes fonctionnels similaires). L'utilisation de cette méthode peut être une bonne alternative dans les cas suivants :

- ✓ La molécule cible présente une faible solubilité dans le solvant de polymérisation,
- ✓ Elle possède une faible disponibilité commerciale et/ou un prix excessivement élevé
- ✓ Elle est instable dans les conditions de polymérisation
- ✓ Elle présente une toxicité marquée avérée

¹⁷⁴ Lamaoui, A.; Mani, V.; Durmus, C.; Salama, K. N.; Amine, A. Molecularly Imprinted Polymers: A Closer Look at the Template Removal and Analyte Binding. *Biosens. Bioelectron.* **2024**, *243*, 115774.

¹⁷⁵ Ellwanger, A.; Karlsson, L.; Owens, P. K.; Berggren, C.; Crencenzi, C.; Ensing, K.; *et al.* Evaluation of Methods Aimed at Complete Removal of Template from Molecularly Imprinted Polymers. *Analyst.* **2001**, *126*, 784–792.

¹⁷⁶ Matsui, J.; Fujiwara, K.; Takeuchi, T. Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1810–1813.

La Figure 123 présente l'utilisation de « dummy-templates » dans le développement de MIPs visant les domaines thérapeutique,^{177,178} environnemental,¹⁷⁶ ou l'extraction de bioactifs naturels.¹⁷⁹

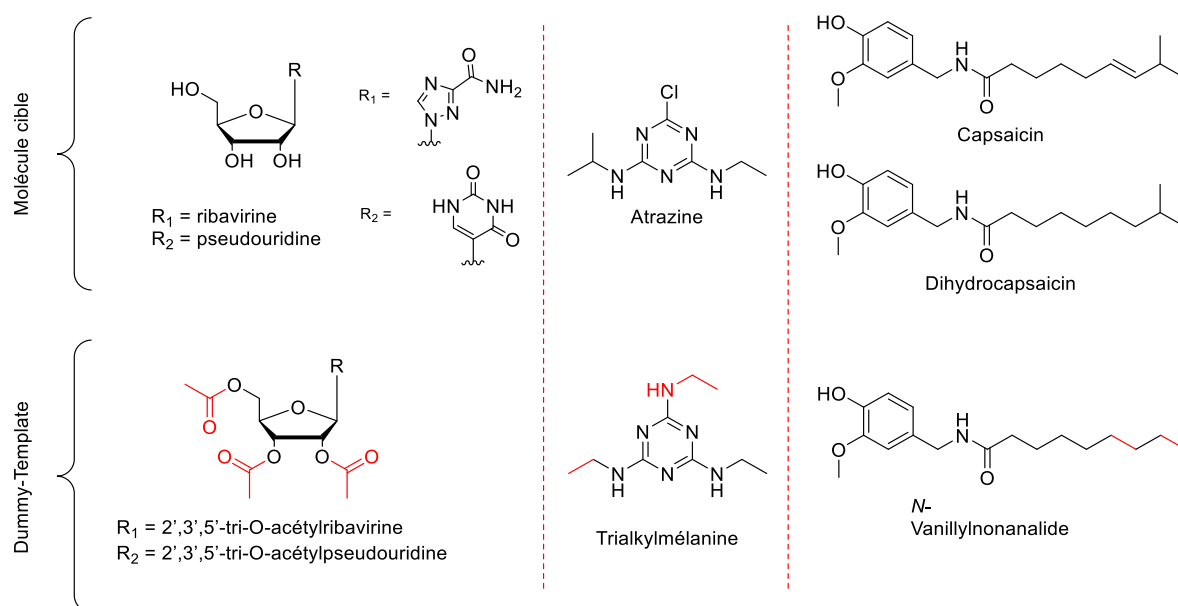


Figure 123 : Exemples de « dummy-templates » utilisés dans le développement de MIPs

L'utilisation d'un « dummy-template » pour synthétiser des MIPs comme cargos permet d'améliorer la solubilité du principe actif dans le solvant porogène, afin qu'il puisse créer facilement le complexe de pré-polymérisation. En effet, un grand nombre de molécules, dont les analogues nucléosidiques, sont peu solubles dans les solvants polaires aprotiques tels que l'acétonitrile ou apolaire comme le toluène. Par exemple, notre équipe a développé un MIP sélectif de la 7-méthylguanosine en utilisant la 2',3',5'-tri-O-acétylguanosine comme « molécule empreinte factice » afin de pouvoir utiliser le chloroforme comme solvant porogène.¹⁴⁴ Il est également important de préciser que le « dummy-template », pour la synthèse d'un MIP utilisé comme système de délivrance d'un médicament, doit être un analogue du principe actif recapturé mais n'avoir aucun effet thérapeutique avéré.

3.2.2. Les monomères

En se basant sur la structure du template, les monomères doivent posséder des fonctions complémentaires pouvant créer des interactions avec celui-ci (site donneur de liaison hydrogène lié à un site accepteur de liaison hydrogène, par exemple). Le choix des monomères est donc crucial car de ce choix va dépendre la stabilité du complexe de pré-polymérisation qui impactera directement la capacité de reconnaissance du MIP. Pour rappel, l'approche covalente ne nécessite pas, contrairement

¹⁷⁷ M. G. Ayari. Développement de Polymères à Empreintes Moléculaires pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine et de l'Adénosine-5'-monophosphate. Thèse de doctorat. Université d'Orléans, 2018.

¹⁷⁸ Krstulja, A.; Lettieri, S.; Hall, A. J.; Roy, V.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A. Tailor-Made Molecularly Imprinted Polymer for Selective Recognition of the Urinary Tumor Marker Pseudouridine. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1700250.

¹⁷⁹ Ma, X.; Ji, W.; Chen, L.; Wang, X.; Liu, J.; Wang, X. Molecularly Imprinted Polymers with Synthetic Dummy Templates for the Preparation of Capsaicin and Dihydrocapsaicin from Chili Peppers: Preparation of Capsaicin and Dihydrocapsaicin by DMIPs. *J. Sep. Science* **2015**, *38*, 100–107.

à l'approche non-covalente, une optimisation du ratio template/monomère. Cependant, il est important de s'assurer que la copolymérisation soit réalisable et que les monomères ne préfèrent pas interagir ensemble au lieu d'interagir avec la molécule empreinte.

Un grand nombre de monomères est disponible commercialement dont une partie peut être utilisée dans la synthèse de MIPs-DDS (Figure 124).

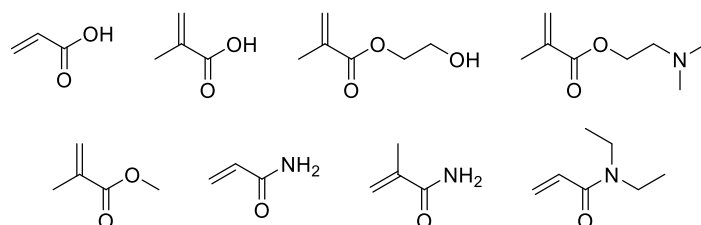


Figure 124 : Différents monomères fonctionnels utilisés dans la synthèse des MIPs-DDS

Parmi ces monomères, l'acide méthacrylique (MAA) est l'un des plus utilisés dans la conception de MIPs¹⁸⁰ car il présente l'avantage de ne montrer aucune toxicité et d'être biodégradable sous la forme polymérique. Par ailleurs, il est connu pour interagir avec le template par plusieurs interactions différentes (donneur de liaison hydrogène, accepteur de liaison hydrogène, interaction de Van der Waals). En complément, les simulations informatiques montrent que le MAA est l'un des monomères les plus intéressants pour créer des interactions spécifiques¹⁸⁰ avec un large panel de molécules empreintes. En effet, il a été utilisé pour la délivrance *in vitro* d'anticancéreux¹⁸¹ (5-fluorouracil), d'analgésique¹⁸² (Tramadol®), ou d'anti-inflammatoire non stéroïdien¹⁸³ (Diclofénac®), entre autres principes actifs. Cependant pour certains MIPs, les polymères imprimés ont montré une meilleure sélectivité vis-à-vis du template en utilisant l'acrylamide (AA) à la place du MAA.¹⁸⁴ Un template possédant une fonction basique, comme l'histamine, peut être protoné par la fonction acide du MAA créant ainsi une interaction de type ionique, tandis que l'histamine forme une liaison hydrogène avec l'acrylamide. Les interactions électrostatiques étant non directionnelles, ni spécifiques, celles-ci ne permettent pas d'obtenir une liaison sélective, contrairement aux liaisons hydrogène.

¹⁸⁰ Nishchaya, K.; Rai, V. K.; Bansode, H. Methacrylic Acid as a Potential Monomer for Molecular Imprinting: A Review of Recent Advances. *Results Mater.* **2023**, *18*, 100379.

¹⁸¹ Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Picci, N.; Matricardi, P.; Alhaique, F. Molecularly Imprinted Polymers for 5-Fluorouracil Release in Biological Fluids. *Molecules.* **2007**, *12*, 805–814.

¹⁸² Seifi, M.; Hassanpour Moghadam, M.; Hadizadeh, F.; Ali-Asgari, S.; Aboli, J.; Mohajeri, S. A. Preparation and Study of Tramadol Imprinted Micro- and Nanoparticles by Precipitation Polymerization: Microwave Irradiation and Conventional Heating Method. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471*, 37–44.

¹⁸³ Mohajeri, S. A.; Malaekheh-Nikouei, B.; Sadegh, H. Development of a pH-Responsive Imprinted Polymer for Diclofenac and Study of Its Binding Properties in Organic and Aqueous Media. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2012**, *38*, 616–622.

¹⁸⁴ Boukadida, M.; Anene, A.; Jaoued-Grayaa, N.; Chevalier, Y.; Hbaieb, S. Choice of the Functional Monomer of Molecularly Imprinted Polymers: Does It Rely on Strong Acid-Base or Hydrogen Bonding Interactions? *Colloid Interface Sci. Commun.* **2022**, *50*, 100669.

En résumé, il existe beaucoup de monomères fonctionnels de structures variées, pouvant être utilisés dans la conception de MIPs. Le plus utilisé d'entre eux est le MAA mais peut être remplacé par l'AA lorsque le milieu est polaire et protique ou par le méthacrylate d'hydroxyéthyle (hydroxyméthacrylate ou HEMA, en anglais) lorsque la molécule empreinte est hydrophile.

3.2.3. Le réticulant

Dans la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires, la morphologie du matériau va dépendre de l'agent réticulant qui va conférer à la matrice polymérique sa structure tri-dimensionnelle. Le réticulant, qui peut constituer plus de 80% du polymère final, a pour but de préserver la structure des sites de reconnaissances moléculaires au sein de la matrice polymérique ainsi que d'apporter une certaine rigidité au matériau. Les propriétés de reconnaissance des matériaux imprimés, les stabilités physique et chimique, la morphologie, la taille des particules et le rendement de polymérisation vont donc dépendre de la quantité et de la nature du réticulant. En effet, Yoshimatsu *et al.*¹⁸⁵ ont montré que l'utilisation du divinylbenzène ou DVB conduit à des nanoparticules polydispersées (entre 0,6 et 3,1 μm) avec un rendement de polymérisation de 33% tandis le triméthylpropane triméthacrylate (triméthylolpropane triméthacrylate ou TRIM, en anglais) permet d'obtenir des nanoparticules monodispersées (1,8 μm) avec un rendement de polymérisation de 91%.

Le ratio 1/4/20 en équivalents template/monomère/réticulant est l'un des plus couramment utilisé. Il a montré son efficacité dans différentes synthèses et est généralement choisi comme mélange initial dans l'étude d'optimisation de la synthèse d'un MIP. Il existe un grand nombre de réticulants disponibles commercialement dont les plus utilisés sont représentés dans la Figure 125.

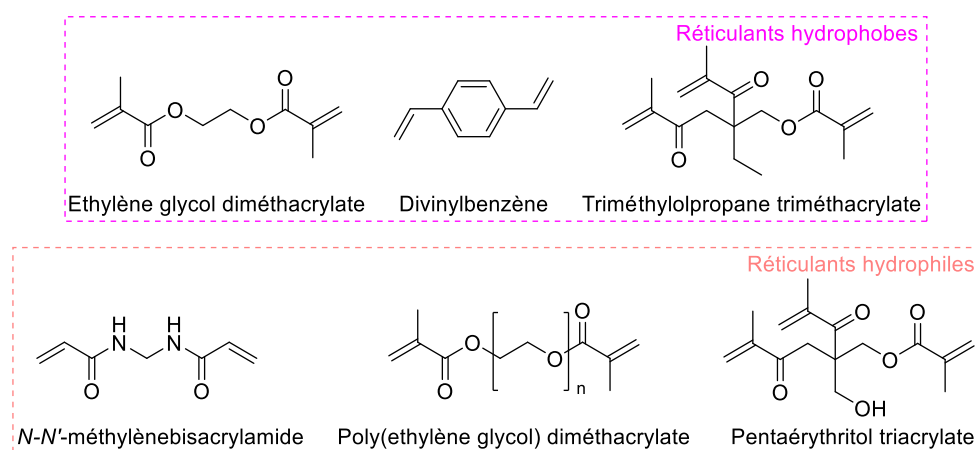


Figure 125 : Structures des réticulants les plus couramment utilisés dans la conception de MIPs

¹⁸⁵ Yoshimatsu, K.; Reimhult, K.; Krozer, A.; Mosbach, K.; Sode, K.; Ye, L. Uniform Molecularly Imprinted Microspheres and Nanoparticles Prepared by Precipitation Polymerization: The Control of Particle Size Suitable for Different Analytical Applications. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *584*, 112–12

Récemment, en 2022, Ceglowski *et al.*¹⁸⁶ ont comparé dans la synthèse de MIPs-DDS du 5-fluorouracil, l'impact de deux des réticulants, les plus cités dans la littérature, le TRIM et l'EGDMA. Ils en ont conclu que les matériaux synthétisés avec le TRIM montrent une meilleure adsorption du template qu'avec l'EGDMA. De plus, les profils de libération ont montré des différences en fonction du réticulant utilisé mais également en fonction du pH du milieu dans lequel a eu lieu le relargage (Tableau 29). Selon les auteurs, cette différence peut s'expliquer par le fait que les polymères synthétisés avec le TRIM sont plus rigides et plus hydrophobes qu'avec l'EGDMA,¹⁸⁶ pour un nombre d'équivalents identique.

Tableau 29 : Pourcentage relargué de 5-fluorouracile au bout de 40 h en fonction du pH et du réticulant

Réticulant \ pH	2,2	5,0	7,4
TRIM	50%	70%	80%
EGDMA	40%	20%	10%

Pour la synthèse de polymères plus hydrophiles, dans des solvants polaires tels que l'eau ou des alcools (méthanol, éthanol), l'EGDMA et le TRIM peuvent être remplacés par des réticulants hydrophiles comme la *N,N*-méthylènebisacrylamide, les diméthacrylates de polyéthylène glycol ou le triacrylate de pentaérythritol (Figure 125).

En résumé, le réticulant utilisé va impacter la capacité de reconnaissance du MIP, le relargage ainsi que la morphologie de la matrice polymérique. Le choix du réticulant peut-être corrélé à la rigidité souhaitée, à l'hydrophobie du matériau ou encore au solvant porogène. Ce dernier va également jouer un rôle important dans la conception d'un polymère à empreintes moléculaires.

3.2.4. Le solvant porogène

Dans la conception d'un MIP, le solvant porogène ou solvant de polymérisation exerce une influence sur les propriétés morphologiques et la sélectivité des MIPs. Selon sa nature et sa proportion dans le milieu de polymérisation, le solvant porogène exerce une influence directe sur la porosité de polymères classiques¹⁸⁷ ou MIPs^{188,189} (Tableau 30). Rappelons qu'il existe trois types de pores, les micropores ($\phi < 2$ nm), les mésopores ($2 < \phi < 50$ nm) et les macropores ($\phi > 50$ nm). En général, l'utilisation d'un solvant porogène, dans lequel les constituants de la formulation sont très solubles,

¹⁸⁶ Ceglowski, M.; Kurczewska, J.; Lusina, A.; Nazim, T.; Ruszkowski, P. EGDMA- and TRIM-Based Microparticles Imprinted with 5-Fluorouracil for Prolonged Drug Delivery. *Polymers*. **2022**, *14*, 1027.

¹⁸⁷ Yu, S.; Ng, F. L.; Ma, K. C. C.; Mon, A. A.; Ng, F. L.; Ng, Y. Y. Effect of Porogenic Solvent on the Porous Properties of Polymer Monoliths. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *127*, 2641–2647.

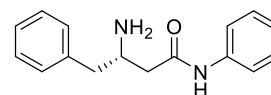
¹⁸⁸ Luliński, P.; Maciejewska, D. Effect of Functional Monomers and Porogens on Morphology, Structure and Recognition Properties of 2-(4-Methoxyphenyl)Ethylamine Imprinted Polymers. *Mater. Sci. Eng., C*. **2013**, *33*, 1162–1169.

¹⁸⁹ Che Lah, N. F.; Ahmad, A. L.; Low, S. C.; Shoparwe, N. F. The Role of Porogen-Polymer Complexation in Atrazine Imprinted Polymer to Work as an Electrochemical Sensor in Water. *J. Environ. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 103500.

augmente la surface et la microporosité du matériau, alors que l'utilisation d'un solvant porogène dans lequel ces mêmes constituants sont peu solubles augmente la macroporosité du matériau, ce qui diminue sa surface spécifique.

Tableau 30 : Exemple de la variation des tailles de pores en fonction du solvant porogène dans la synthèse d'un MIP spécifique de la L-phénylalanine anilide.¹⁹⁰

Solvant porogène	Taille moyenne des pores (nm)
Acétonitrile	9,4
Chloroforme	9,1
Benzène	7,8
Dichlorométhane	7,1
N,N-Diméthylformamide	5,2



Le second rôle du solvant est de solubiliser les monomères fonctionnels, le template et le réticulant, de favoriser la formation du complexe de pré-polymérisation et, surtout, de ne pas interférer dans le processus de polymérisation. Les polymères à empreintes moléculaires sont usuellement synthétisés dans un solvant organique (l'acétonitrile, le chloroforme, le dichlorométhane, le *N,N*-diméthylformamide, le méthanol, le tétrahydrofurane (THF) ainsi que le toluène) permettant aux liaisons hydrogène et aux interactions électrostatiques de se créer entre le template et le monomère. Ainsi, la polarité du solvant exerce une grande influence sur les interactions intermoléculaires monomères-template. Les solvants les moins polaires vont promouvoir la formation du complexe de pré-polymérisation tandis que des solvants plus polaires peuvent interférer dans les interactions monomères-template.¹⁹¹ Song *et al.*¹⁹² ont illustré ce concept avec la quercétine. Pour la reconnaissance de cette dernière, ils ont utilisé quatre solvants organiques différents, à savoir le 1,4-dioxane, le THF, l'acétone et l'acétonitrile, classés par polarité croissante. Le MIP synthétisé dans le THF, solvant de polarité intermédiaire (moment dipolaire $\mu = 1,75$ Debye), montre un meilleur facteur d'impression (ou « imprinting factor » en anglais (IF)) que ceux synthétisés dans les autres solvants. Ce paramètre permettant de caractériser la différence d'adsorption MIP/NIP sera développé dans le paragraphe 4.

Les paramètres physico-chimiques du solvant porogène influent donc sur la nature et la force des interactions se mettant en place entre la molécule template et les monomères fonctionnels lors de la formation du pré-complexe de polymérisation. La connaissance de la constante diélectrique ϵ et des paramètres de solubilité de Hansen, qui sont le paramètre définissant les forces de Keesom δ_p (interaction dipôle permanent – dipôle permanent), ainsi que le paramètre correspondant aux forces

¹⁹⁰ Sellergren, B.; Shea, K. J. Influence of Polymer Morphology on the Ability of Imprinted Network Polymers to Resolve Enantiomers. *J. Chromatogr. A.* **1993**, *635*, 31–49.

¹⁹¹ Włoch, M.; Datta, J. Synthesis and Polymerisation Techniques of Molecularly Imprinted Polymers. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2019; Vol. 86, pp 17–40.

¹⁹² Song, X.; Wang, J.; Zhu, J. Effect of Porogenic Solvent on Selective Performance of Molecularly Imprinted Polymer for Quercetin. *Mat. Res.* **2009**, *12*, 299–304.

de liaisons hydrogène δ_h et celui représentant les forces dites de « dispersions » de London δ_d , est très importante dans le choix du solvant de polymérisation.¹⁹³ Ces paramètres pour les solvants les plus utilisés dans la polymérisation des MIPs sont répertoriés dans le Tableau 31. Le type d'interaction faible souhaitée entre le template et le monomère va donc conditionner le choix du solvant. En effet, pour obtenir un MIP dont la reconnaissance est basée sur des interactions de type liaison hydrogène, il sera judicieux de choisir un solvant ayant un δ_h le plus faible possible, comme le chloroforme. La limitation de ce raisonnement se trouve dans la solubilité des constituants du mélange avant polymérisation dans le solvant porogène. Ainsi, le solvant doit être capable de solubiliser les monomères, le template, le réticulant et l'initiateur sans pour autant interagir sur la stabilité du complexe de pré-polymérisation. De plus, pour des MIPs utilisés dans la délivrance de médicaments, le choix du solvant n'est pas uniquement conditionné par les paramètres physico-chimiques mais aussi par sa toxicité. De ce fait, leur synthèse se limite le plus souvent à des solvants biocompatibles comme l'eau ou l'éthanol ou à ceux montrant une non-toxicité à faible concentration comme le diméthylsulfoxyde ou l'acétonitrile.

Tableau 31 : Constantes diélectriques et paramètres de solubilité de Hansen de différents solvants utilisés pour la synthèse de MIPs.

Solvant porogène	ϵ (20 °C) a=194 ; b = 195	δ_d *	δ_p *	δ_h *
Eau ^a	80,0 ^a	15,5	16,0	42,3
Méthanol	33,4 ^a	15,1	12,3	22,3
Ethanol	25,0 ^a	15,8	8,8	19,4
Acétonitrile	36,4 ^a	15,3	18,0	6,1
Chloroforme	4,80 ^a	17,8	3,1	5,7
DMSO	47,3 ^b	18,4	16,4	10,2
DMF	38,4 ^b	17,4	13,7	11,3
Toluène	2,42 ^a	18,0	1,4	2,0
THF	7,49 ^a	16,8	5,7	8

* Ces paramètres ont été mesurés à 25 °C pour une pression atmosphérique de 1 atmosphère. Ces valeurs sont extraites du livre de Hansen,¹⁹⁶ et sont exprimés en (MPa)^{1/2}

Un autre paramètre à prendre en compte dans le choix du solvant porogène est ce qui est nommé « l'effet de solvant ». En effet, il a été montré également que la reconnaissance d'un MIP envers son template est améliorée lorsque le solvant de recapture est identique au solvant de polymérisation.¹⁹⁷

¹⁹³ Renkecz, T.; László, K.; Horváth, V. Molecularly Imprinted Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization at High Monomer Concentrations. *Molecular Imprinting* **2014**, 2, 1–17.

¹⁹⁴ Rosengren, A. M.; Golker, K.; Karlsson, J. G.; Nicholls, I. A. Dielectric Constants Are Not Enough: Principal Component Analysis of the Influence of Solvent Properties on Molecularly Imprinted Polymer–Ligand Rebinding. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 553–557.

¹⁹⁵ Hunger, J.; Buchner, R.; Kandil, M. E.; May, E. F.; Marsh, K. N.; Hefter, G. Relative Permittivity of Dimethylsulfoxide and *N,N*-Dimethylformamide at Temperatures from (278 to 328) K and Pressures from (0.1 to 5) MPa. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 55, 2055–2065.

¹⁹⁶ Hansen, C. M. *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition*, 0 ed.; CRC Press, 2007

¹⁹⁷ Spivak, D.; Gilmore, M. A.; Shea, K. J. Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4388–4393.

Certains auteurs parlent de « l'effet d'impression » du solvant porogène pour exprimer son influence sur le comportement du polymère.¹⁹⁸

3.3. Les différentes formes de polymères imprimés

En fonction du domaine d'application choisi (analytique, capteur, délivrance de médicaments...) les propriétés, la taille et la nature du polymère vont varier. Ainsi, différentes méthodes pour la conception des MIPs ont été développées. Ces matériaux sont le plus souvent créés par polymérisation radicalaire libre ou contrôlée, ce qui implique que les techniques les plus utilisées sont la polymérisation en masse, en suspension, par précipitation ou encore par core-shell.

Pérez-Moral *et al.*¹⁹⁹ ont comparé ces différentes techniques de polymérisation pour la reconnaissance moléculaire du propanolol en termes de morphologie et de taille des particules obtenues. Sur la Figure 126, sont représentés les clichés en microscopie électronique des particules obtenues en fonction des techniques de polymérisation. L'observation de ces analyses microscopiques mettent en valeur le fait que la taille et la forme des particules varient en fonction de la technique de polymérisation utilisée. Par exemple, après polymérisation en bulk, les particules sont agglomérées et forment des micro-objets supérieurs à 5 µm, tandis que les polymérisations par suspension ou par « step swelling » (polymérisation par gonflement progressif) permettent d'obtenir des particules sphériques comprises entre 6 et 40 µm.

¹⁹⁸ Yoshizako, K.; Hosoya, K.; Iwakoshi, Y.; Kimata, K.; Tanaka, N. Porogen Imprinting Effects. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 386–389.

¹⁹⁹ Pérez-Moral, N.; Mayes, A. G. Comparative Study of Imprinted Polymer Particles Prepared by Different Polymerisation Methods. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *504*, 15–21.

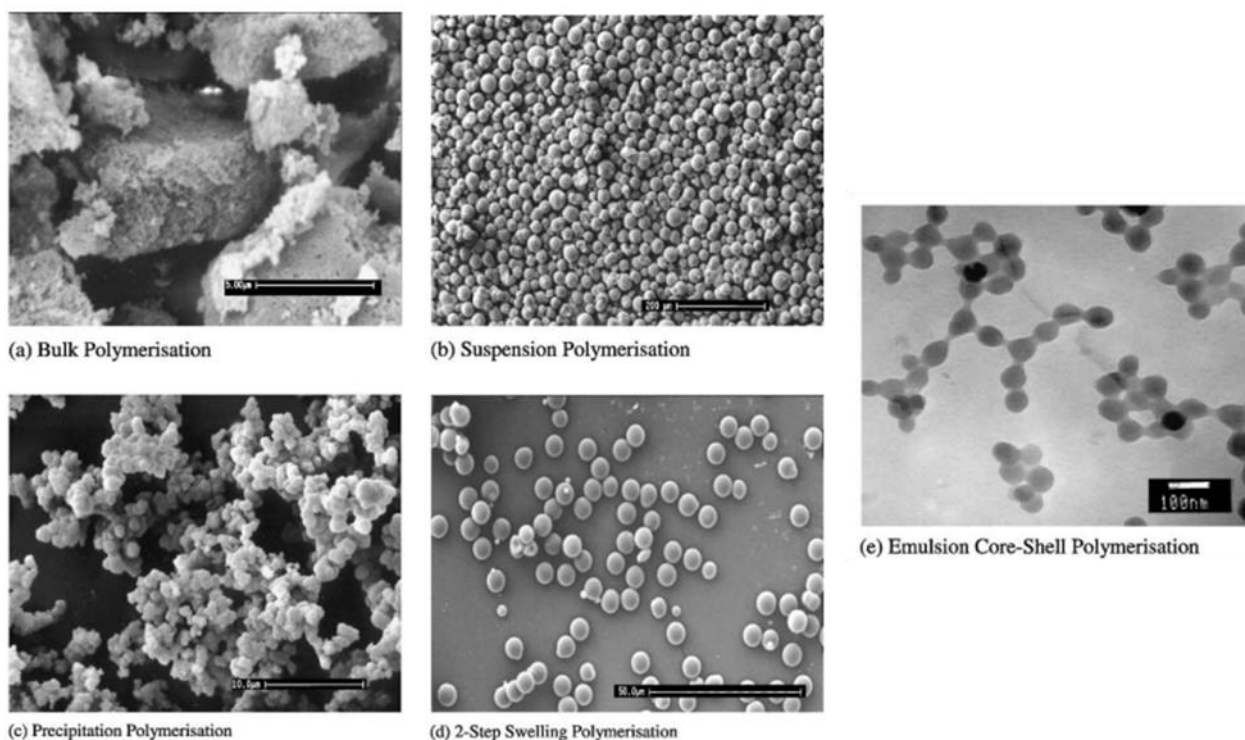


Figure 126 : Analyses microscopiques des polymères obtenus par différentes méthodes de polymérisation¹⁹⁹

3.3.1. Polymère monolithique ou en bulk

Initialement, les MIPs étaient préparés par polymérisation monolithique dite en masse ou en « bulk ». Cette méthode présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et conduit à de bons rendements de polymérisation. La procédure consiste à mélanger le template avec les monomères fonctionnels, le réticulant et l'initiateur dans un petit volume de solvant. Après polymérisation, une étape de traitement assez fastidieuse est nécessaire afin de rendre exploitable le polymère. Celui-ci est broyé et tamisé avant d'être lavé. Cette technique permet d'obtenir des particules micrométriques irrégulières et polydispersées de taille moyenne comprise généralement entre 25 et 60 μm . De plus, les particules présentent une sélectivité et une capacité moindre que les particules sphériques. En effet, lors du broyage et du tamisage, les sites de reconnaissance ou cavités sélectives sont en partie irrémédiablement détruites par ces dommages physiques.

Pour l'utilisation d'un MIP comme système de délivrance, il est primordial de synthétiser des particules sphériques et monodispersées dont la taille est contrôlée, rendant cette technique inappropriée. En effet, la taille des particules doit s'adapter à la voie d'administration du médicament (Figure 127).

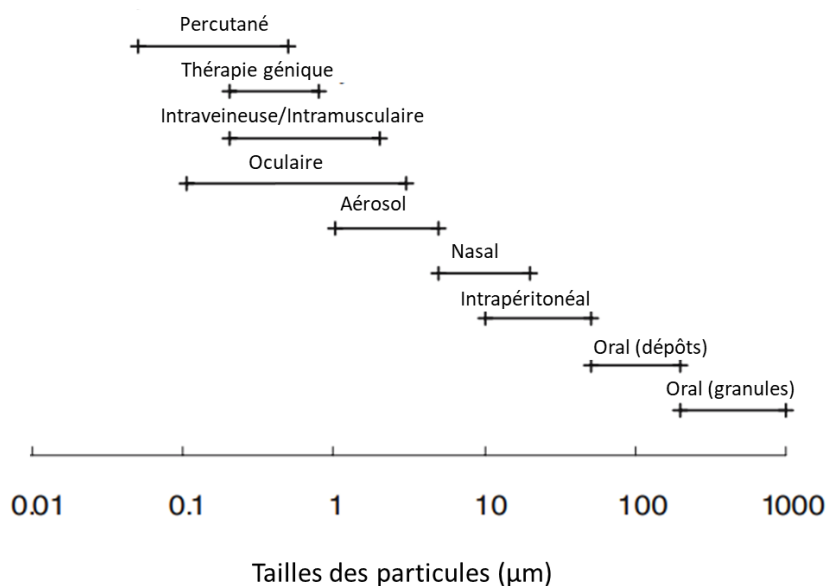


Figure 127 : Tailles des particules en fonction de la voie d'administration (adapté de Shekunov *et al.*²⁰⁰)

Contrairement à la synthèse de particules irrégulières, la synthèse de MIPs sphériques conduit à l'obtention de particules homogènes (en taille et en forme) nécessaires pour améliorer la répétabilité au niveau de la reconnaissance de la molécule d'intérêt.

C'est pour cela que d'autres stratégies de synthèse, empruntées à la chimie macromoléculaire, incluant la suspension, la dispersion et la précipitation et le core-shell, sont de plus en plus utilisées dans le domaine des MIPs.²⁰¹

Par exemple, Pratiwi *et al.*²⁰² ont comparé la méthode de polymérisation en bulk à celle par précipitation pour la reconnaissance et l'extraction de l'aténolol. Bien que le MIP obtenu par bulk présente une meilleure capacité que celui synthétisé par précipitation (7,8 mg/g contre 2,95 mg/g), ce dernier est plus sélectif vis-à-vis du template que celui en bulk.

Par la suite, nous nous focaliserons sur **la polymérisation par précipitation et la méthode core-shell** qui seront les deux méthodes utilisées dans cette thèse et présentés dans le chapitre 4.

3.3.2. La polymérisation par précipitation

La polymérisation par précipitation est l'une des méthodes les plus utilisées dans la synthèse de nanoparticules sphériques imprimées. La comparaison avec les autres techniques est répertoriée dans le Tableau 32. Cette méthode de polymérisation a été développée par le groupe de Stöver en 1993²⁰³

²⁰⁰ Shekunov, B. Y.; Chattopadhyay, P.; Tong, H. H. Y.; Chow, A. H. L. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 203–227.

²⁰¹ Lu, H.; Tian, H.; Wang, C.; Xu, S. Designing and Controlling the Morphology of Spherical Molecularly Imprinted Polymers. *Mater. Adv.* **2020**, *1*, 2182–2201.

²⁰² Pratiwi, R.; Megantara, S.; Rahayu, D.; Pitaloka, I.; Hasanah, A. N. Comparison of Bulk and Precipitation Polymerization Method of Synthesis Molecular Imprinted Solid Phase Extraction for Atenolol Using Methacrylic Acid. *JYP.* **2018**, *11*, 12–16.

²⁰³ Li, K.; Stöver, H. D. H. Synthesis of Monodisperse Poly(Divinylbenzene) Microspheres. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **1993**, *31*, 3257–3263.

et permet la synthèse de particules monodispersées dont la taille peut varier de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres.

Tableau 32 : Comparaison des différentes techniques de polymérisation²⁰⁴

Techniques	Suspension	Emulsion	Dispersion	Précipitation	Ensemencement
Découverte	1920	1920	1970	1993	1980
Tailles des particules (µm)	5-2000	0,06-0,8	0,1-20	0,1-8	0,5-200
Solubilité des constituants	Monomère et initiateur non solubles	Monomère soluble et initiateur insoluble	Monomère et initiateur solubles	Monomère et initiateur solubles	Monomère et initiateur solubles
Facilité et coût	Facile et peu coûteuse	Facile et peut être coûteuse	Facile et peu coûteuse	Facile et peut être coûteuse	Peu coûteuse mais chronophage
Forme des particules	Polydispersée Polymère poreux	Polydispersée Polymère poreux	Monodispersées Polymère non poreux et non réticulé	Monodispersées Polymère poreux et très réticulé	Monodispersées Uniforme Particules poreuses

Plus précisément, la taille des nanoparticules est directement liée au pourcentage du volume d'agent polymérisable par rapport au volume total. Celui-ci doit être inférieur à 5%²⁰⁵ pour créer des microparticules de l'ordre de 5 µm et inférieur à 2% lorsque des nanoparticules de l'ordre de quelques centaines de nanomètres sont souhaitées. Cette technique, facile à mettre en œuvre et proche de la polymérisation par bulk, consiste à polymériser directement et sans ajout d'additifs les monomères fonctionnels, le réticulant et le template dans un solvant porogène. Les oligomères formés ont le temps de croître, de s'agglutiner et de précipiter, formant ainsi des particules sphériques (Figure 128). La formation de ces sphères dépend de nombreux paramètres tels que la concentration en monomères, le solvant utilisé, ou encore le système d'agitation. Le contrôle de ces paramètres permet d'engendrer des billes de diamètres identiques, dites monodispersées. Si ces paramètres ne sont pas optimisés, les billes formées posséderont des diamètres variés, on parlera alors de polydispersité.

²⁰⁴ Chaudhary, V.; Sharma, S. Effect of Various Synthesis Parameters on Styrene–Divinylbenzene Copolymer Properties. *J Porous Mater* **2019**, *26*, 1559–1571.

²⁰⁵ Wang, J.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.; Khoshdel, E. Monodisperse, Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization for Affinity Separation Applications. *Angew Chem Int Ed*. **2003**, *42*, 5336–5338.

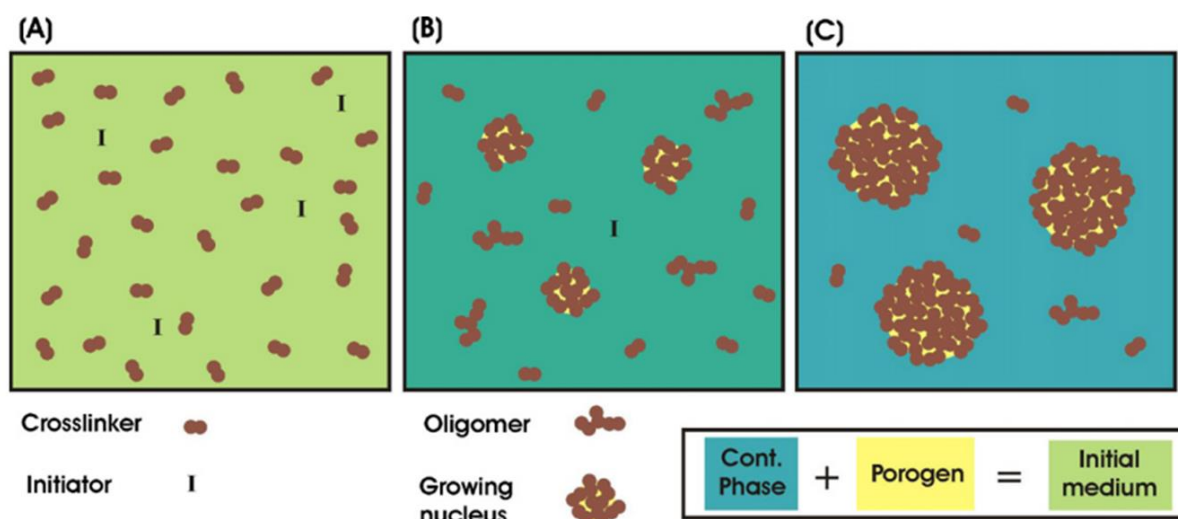


Figure 128 : Schéma descriptif des différents stades de la polymérisation par précipitation. (A) Initialement, seul le réticulant et l'initiateur sont dans le milieu de façon aléatoire. (B) la polymérisation radicalaire est initiée et des oligomères se forment et s'agglomèrent. (C) La réaction continue et les agglomérats continuent à croître par addition de monomères ou d'oligomères. A partir d'une certaine taille ces agglomérats (sphériques) vont précipiter (adapté de Talha Gokmen et al.²⁰⁶).

On peut citer les travaux de Abouzarzadeh *et al.*²⁰⁷ qui ont appliqué cette technique à la synthèse d'un MIP sélectif de l'acide nalidixique en utilisant l'acide méthacrylique comme monomère et le triméthacrylate de triméthylolpropane comme réticulant. En faisant varier le ratio template / réticulant / monomère, 3 tailles de particules ont pu être obtenues (94 nm, 256 nm et 1,2 µm). Dans leur étude, les particules de petites tailles ont montré une bonne reconnaissance du template en comparaison du matériau non imprimé. Ces travaux font écho à ceux de Li *et al.*²⁰⁸ portant sur la synthèse d'un MIP spécifique de l'éthyluracile. Ils ont montré que les billes ayant un diamètre de 0,1 µm possédaient une capacité d'adsorption plus grande que les billes de diamètre de 1 µm (480 µmol.g⁻¹ et 180 µmol.g⁻¹, respectivement). Ces résultats mettent en évidence l'impact de la taille des particules sur la surface spécifique du polymère et donc sur la capacité de recapture du template.

Cependant, l'utilisation d'un volume de solvant porogène très important est à l'origine de deux inconvénients majeurs. La dilution importante des monomères engendre des rendements de polymérisation variables (40 à 80%) et une cinétique de polymérisation lente. De plus, cet effet de dilution entraîne également un affaiblissement des interactions monomères fonctionnels-template lors de la formation du complexe de pré-polymérisation, ce qui va entraîner une diminution du nombre

²⁰⁶ Gokmen, M. T.; Du Prez, F. E. Porous Polymer Particles—A Comprehensive Guide to Synthesis, Characterization, Functionalization and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 365–405.

²⁰⁷ Abouzarzadeh, A.; Forouzani, M.; Jahanshahi, M.; Bahramifar, N. Synthesis and Evaluation of Uniformly Sized Nalidixic Acid-Imprinted Nanospheres Based on Precipitation Polymerization Method for Analytical and Biomedical Applications. *J. Mol. Recognit.* **2012**, *25*, 404–413.

²⁰⁸ Li, Z.; Ding, J.; Day, M.; Tao, Y. Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly. *Macromolecules.* **2006**, *39*, 2629–2636.

de sites actifs sélectifs créés. De plus, il est nécessaire d'utiliser une faible agitation pour éviter une coagulation des particules durant le processus de polymérisation. Parmi tous les solvants porogènes décrits dans la partie 3.2.4, l'acétonitrile est celui le plus utilisé pour ce type de polymérisation. Ceci est dû à son pouvoir de solubilisation d'une large gamme de monomères ainsi qu'à sa capacité à précipiter les agrégats polymériques de petite taille formés. Par exemple Shim *et al.*²⁰⁹ ont comparé l'influence de différents solvants, incluant l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol, le 2-méthoxyéthanol, le 2-propanol, le benzène, le toluène, sur la morphologie des particules synthétisées. La conclusion de cette étude est que **seul l'acétonitrile** permet l'obtention de particules sphériques et de taille homogène. Il est intéressant de noter que **l'utilisation d'un co-solvant** avec l'acétonitrile tel que le toluène ou le 2-propanol, n'empêche pas la formation de nanoparticules sphériques.^{209,210} **Cela peut être un choix pertinent afin de solubiliser le template ou les monomères insolubles dans l'acétonitrile pur.** Une revue récente présente les nouvelles techniques, outre la polymérisation thermique, utilisées pour la polymérisation par précipitation²¹¹ dont, par exemple, la polymérisation par précipitation induite par distillation.²¹²

3.3.3. Core-shell

Les nanoparticules de type core-shell (« cœur/coquille ») peuvent être définies de manière générale comme comprenant un cœur (matériau interne) et une coquille (matériau externe). La nature du cœur et de la coquille peut être différente et les combinaisons peuvent varier : organique/organique, organique/inorganique, inorganique/organique ou inorganique/inorganique. Le choix de cette combinaison va dépendre des propriétés et de l'application cherchés. Le champ d'action de ces nanoparticules est ainsi riche et varié. Dans le domaine biomédical, les nanoparticules de type core-shell sont, par exemple, utilisées comme agent d'imagerie²¹³, ou pour la délivrance de médicaments

²⁰⁹ Shim, S. E.; Yang, S.; Jin, M.-J.; Chang, Y. H.; Choe, S. Effect of the Polymerization Parameters on the Morphology and Spherical Particle Size of Poly(Styrene-Co-Divinylbenzene) Prepared by Precipitation Polymerization. *Colloid Polym Sci.* **2004**, *283*, 41–48.

²¹⁰ Jiang, H.; Chen, H.; Zong, G.; Liu, X.; Liang, Y.; Tan, Z. Precipitation Polymerization in Acetonitrile and 1-propanol Mixture: Synthesis of Monodisperse Poly(Styrene- Co -divinylbenzene) Microspheres with Clean and Smooth Surface. *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 2096–2103.

²¹¹ Zhang, R.; Gao, R.; Gou, Q.; Lai, J.; Li, X. Precipitation Polymerization: A Powerful Tool for Preparation of Uniform Polymer Particles. *Polymers.* **2022**, *14*, 1851.

²¹² Bai, F.; Yang, X.; Huang, W. Synthesis of Narrow or Monodisperse Poly(Divinylbenzene) Microspheres by Distillation–Precipitation Polymerization. *Macromolecules.* **2004**, *37*, 9746–9752.

²¹³ Bhogal, S.; Kaur, K.; Malik, A. K.; Sonne, C.; Lee, S. S.; Kim, K.-H. Core-Shell Structured Molecularly Imprinted Materials for Sensing Applications. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2020**, *133*, 116043

ciblée et/ou contrôlée.^{214,215} Pour leur utilisation dans le domaine biomédical, les nanoparticules choisies doivent être biocompatibles et biodégradables. Dans ce contexte, les nanoparticules présentant un matériau externe montrent des propriétés de surface améliorées et des meilleures stabilités thermique et chimique,²¹⁶ comparé aux nanoparticules « nues ». Cela inclue une moindre cytotoxicité, une grande dispersibilité, une biocompatibilité plus élevée, une meilleure conjugaison avec les biomolécules ou les médicaments.

Ces propriétés ont amené les chercheurs à se pencher sur l'utilisation du core-shell couplé à l'impression moléculaire. Les nanoparticules core-shell imprimées moléculairement peuvent être classées en deux groupes, selon la localisation de leurs les cavités spécifiques²¹⁷ :

- ✓ Les nanoparticules ayant un « cœur » non imprimé et une couche externe imprimée, possédant donc les cavités.
- ✓ Les nanoparticules avec un « cœur » imprimé et une couche externe non imprimée.

Nous nous focaliserons, par la suite, sur la première famille (pour plus de détails, la revue rédigée par Wan L. *et al.*²¹⁷ présente des exemples de ces deux familles).

Concernant la synthèse d'un core-shell imprimé, le procédé est identique à celui d'un MIP classique, à la seule différence de la présence de nanoparticules que l'on appelle « core » en suspension dans le porogène solubilisant le complexe de pré-polymérisation ainsi que le réticulant et l'initiateur. Les différentes molécules ainsi que les nanoparticules sont agitées toutes ensemble et la réaction de polymérisation va permettre de créer une fine couche autour de chaque nanoparticule en suspension. L'association de la technologie de l'empreinte moléculaire et du core-shell induit la localisation des sites de reconnaissance à la surface du nanomatériau (Figure 129). Cette localisation permet un meilleur lavage du template après la polymérisation et avant recapture, une reconnaissance plus sélective de la molécule template, et une plus grande capacité que celle d'une nanoparticule imprimée moléculairement dans son volume total.²¹⁸ De plus, ces nanoparticules imprimées sont généralement

²¹⁴ Fytory, M.; Mansour, A.; El Roubay, W. M. A.; Farghali, A. A.; Zhang, X.; Bier, F.; *et al.* M. Core-Shell Nanostructured Drug Delivery Platform Based on Biocompatible Metal-Organic Framework-Ligated Polyethyleneimine for Targeted Hepatocellular Carcinoma Therapy. *ACS Omega*. **2023**, *8*, 20779–20791.

²¹⁵ Joshy, K. S.; Snigdha, S.; George, A.; Kalarikkal, N.; Pothen, L. A.; Thomas, S. Core-Shell Nanoparticles of Carboxy Methyl Cellulose and Compritol-PEG for Antiretroviral Drug Delivery. *Cellulose*. **2017**, *24*, 4759–4771

²¹⁶ Moczko, E.; Guerreiro, A.; Piletska, E.; Piletsky, S. PEG-Stabilized Core-Shell Surface-Imprinted Nanoparticles. *Langmuir*. **2013**, *29*, 9891–9896.

²¹⁷ Wan, L.; Chen, Z.; Huang, C.; Shen, X. Core-Shell Molecularly Imprinted Particles. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *95*, 110–121.

²¹⁸ Niu, M.; Pham-Huy, C.; He, H. Core-Shell Nanoparticles Coated with Molecularly Imprinted Polymers: A Review. *Microchim. Acta*. **2016**, *183*, 2677–2695.

de tailles régulières uniformes vu que ce paramètre dépend fortement de la synthèse du « cœur », qui lui a facilement une taille homogène monodispersée.

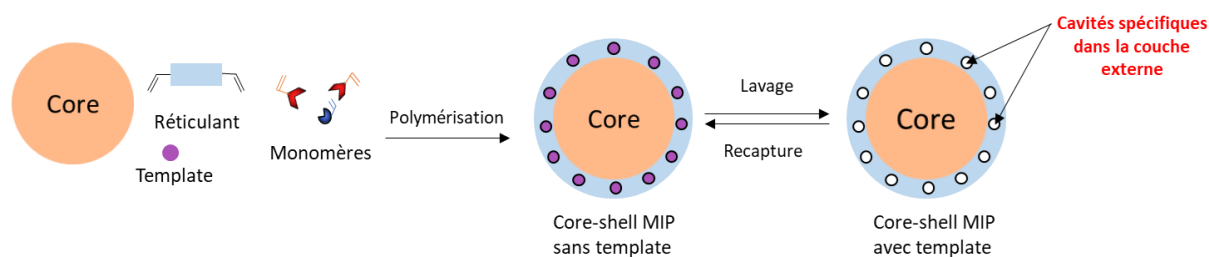


Figure 129 : Synthèse d'un core-shell imprimé (inspiré de Bhogal *et al.*²¹³)

A titre de comparaison, Niu *et al.*²¹⁸ ont listé les propriétés d'un MIP de type core-shell vis-à-vis d'un MIP synthétisé par polymérisation en bulk. Certaines de ces propriétés sont regroupées dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Comparaison des MIP-core shell avec les polymères synthétisés par polymérisation par bulk

Propriétés	Bulk MIP	Core-shell MIP
Procédé de synthèse	Simple	Complexe
Rendement	Faible	Haut
Morphologie	Irrégulière	Sphérique et uniforme
Surface spécifique	Petite	Grande
Distribution des sites actifs	Aléatoire	Sur la surface des particules
Fuite du template	Elevé	Faible

Afin d'obtenir des nanoparticules ayant une couche externe imprimée, le choix du « cœur » est primordial. La facilité de synthèse, l'obtention de nanoparticules monodispersées et une modification de surface facile à mettre en œuvre sont des paramètres à prendre en compte dans le choix du « cœur ». La modification de surface est une stratégie couramment employée dans la synthèse de core-shell car elle permet de modifier les propriétés de ces nanoparticules.²¹⁹ Pour une application biomédicale, la nature du « cœur » est variée²²⁰ : il peut être de nature inorganique, telles que les particules magnétiques dérivées d'oxydes de fer ou de cobalt, par exemple, ou de silice, mais peut aussi être de nature organique. Une récente²²¹ revue recense un certain nombre de nanoparticules

²¹⁹ Wackerlig, J.; Lieberzeit, P. A. Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles in Chemical Sensing – Synthesis, Characterisation and Application. *Sens. Actuators., B.* **2015**, *207*, 144–157.

²²⁰ Chatterjee, K.; Sarkar, S.; Jagajjani Rao, K.; Paria, S. Core/Shell Nanoparticles in Biomedical Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *209*, 8–39.

²²¹ Zhang, Y.; Wang, Q.; Zhao, X.; Ma, Y.; Zhang, H.; Pan, G. Molecularly Imprinted Nanomaterials with Stimuli Responsiveness for Applications in Biomedicine. *Molecules.* **2023**, *28*, 918.

imprimées présentant des applications biomédicales. Ces nanoparticules sont aussi bien développées pour être sélectives envers de petites molécules organiques comme la ribavirine, l'ibuprofène, ... mais aussi envers des macromolécules, ce qui démontre le fait qu'elles peuvent parfaitement être appliquées à la libération d'antiviraux.

4. Caractérisations des polymères imprimés

Un polymère imprimé est synthétisé afin de reconnaître sélectivement une molécule d'intérêt par le biais de ces cavités ou « binding site ». La présence de ces cavités est usuellement vérifiée en comparant le polymère imprimé (MIP) avec le polymère non imprimé (NIP) qui a été synthétisé dans les mêmes conditions mais sans l'ajout de la molécule template. L'un des paramètres expérimentaux permettant de montrer une différence entre le MIP et le NIP est le facteur d'impression ou « imprinting factor » (IF). Ce facteur est défini comme étant le ratio du rapport de distribution de l'analyte dans le MIP (Q_{MIP}) et du rapport de distribution de l'analyte dans le NIP (Q_{NIP}), dans des conditions de volume et de température identiques (Equation 14).

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \text{ où } Q_i = \frac{\frac{n_{lié}}{m_i}}{\frac{n_{libre}}{V}}, \quad \text{Eq. 14}$$

avec n étant la quantité d'analyte libre ou dans les cavités (mol), m la masse de polymère en contact avec la solution d'analyte (g) et V le volume de la solution d'analyte mis en contact avec le polymère (L).

Pour observer une différence entre le MIP et le NIP, l'IF doit être supérieur à 1 et plus la valeur est élevée, plus le MIP possède une population de sites imprimés élevé par rapport aux interactions non-spécifiques caractérisés par la capacité du NIP. Cependant une haute valeur de facteur d'impression ne prouve pas que la majorité des sites actifs possède une reconnaissance spécifique de la molécule d'intérêt. En effet, dans certains cas comme dans l'utilisation de MIP en analytique, il est nécessaire que le MIP montre une reconnaissance structurale la plus marquée possible vis-à-vis du template. Pour le vérifier, il est possible de calculer le facteur d'impression du MIP avec le template et avec une molécule de structure proche du template. Dans le cas de l'utilisation d'un MIP comme transporteur de médicament, une sélectivité structurale poussée est un facteur intéressant mais pas déterminant dans le choix d'un MIP.

Ainsi, les propriétés de reconnaissance et de recapture des MIPs dépendent de la qualité et du nombre de cavités spécifiques formées. L'évaluation de l'équilibre d'adsorption des molécules cibles peut être mené par une analyse en batch ou une analyse frontale.²²²

²²² García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E. Characterization of Binding Sites in Molecularly Imprinted Polymers. *Sens. Actuators, B.* **2007**, *123*, 1180–1194.

4.1. Etude de la recapture par Batch

L'étude de recapture par Batch est très utilisée pour la caractérisation des polymères et consiste à mettre en contact une quantité de matériaux (MIP ou NIP) avec différentes concentrations du template. Après équilibre thermodynamique de partage de la molécule cible entre la solution en contact et le matériau, à une vitesse d'agitation et une température constante, le surnageant est récupéré soit par filtration, soit par centrifugation. L'analyse par spectrophotométrie UV-visible, ou HPLC-UV, ... permet de déterminer la quantité d'analyte qui a été adsorbée par le polymère (Figure 130). Cette méthode nécessite que le **template soit détectable facilement** et qu'il y ait eu, au préalable **l'établissement d'une droite d'étalonnage**.

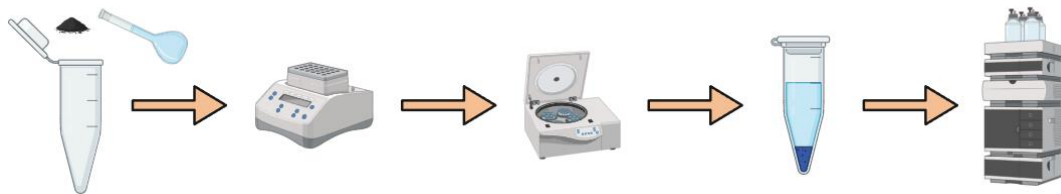


Figure 130 : Etude de la recapture par Batch

Pour cette expérience, la masse de polymère mise en contact est généralement comprise entre 10 mg et 50 mg pour un volume de solution entre 0,5 et 2 mL. Comme mentionné précédemment, la recapture est souvent la plus optimale dans le solvant de polymérisation.¹⁹⁷ Ainsi, les solutions de template sont, de préférence, préparées dans le solvant de polymérisation. Un autre solvant peut être envisagé dans le cas où il favorise les interactions avec les sites de reconnaissance, évite les interactions non spécifiques et règle un éventuel problème de solubilité du composé. L'analyse du surnageant permet de calculer la concentration libre après équilibre F, comme « free » (mol/L ou g/L), ou adsorbée B, comme « bound » (mol/L ou g/L), à partir de la concentration mise en contact C et de déterminer la quantité Q adsorbée par gramme de polymère (mol/g ou g/g) selon l'équation suivante :

$$Q = \frac{(C - F) * V}{m_{polymère}} \text{ avec } B = C - F \quad \text{Eq. 15}$$

Le tracé de Q en fonction de F (ou C) est appelé isotherme d'adsorption (Figure 131).

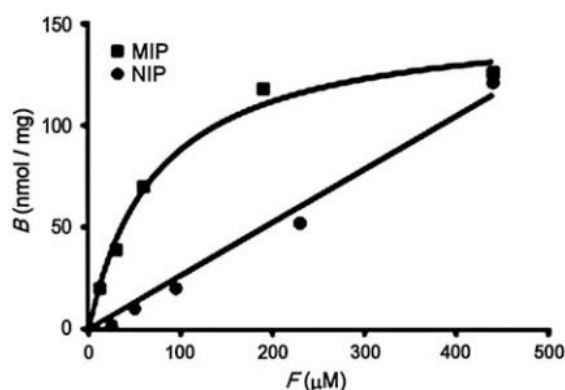


Figure 131 : Représentation standard des isothermes d'absorption d'un MIP et du NIP correspondant²²³

Une fois le tracé obtenu, il ne reste qu'à corrélérer les courbes avec les modèles de la littérature.

4.2. Les modèles d'isothermes d'adsorption

Différents modèles d'absorption ont été développés et sont couramment utilisés pour caractériser la surface des polymères à empreintes moléculaires. Ces modèles fournissent des informations importantes sur le nombre et la distribution des sites de reconnaissance moléculaire en fonction de leur constante d'association relative. Selon Umpleby *et al.*²²⁴, ces modèles peuvent être classés en fonction de la nature de la surface du polymère (homogène ou hétérogène) avec des modèles discrets (Langmuir et ses dérivés), continus (Freundlich) ou encore hybrides (Freundlich-Langmuir). Dans des systèmes homogènes, tous les sites actifs ou de reconnaissance moléculaire ont la même affinité et sélectivité du fait de la taille et de la forme identiques des cavités. Au contraire, dans les systèmes hétérogènes, les sites actifs présentent des affinités différentes qui préfigurent des tailles et des formes de cavités différentes.

Une grande partie des MIPs rapportés dans la littérature sont basée sur le modèle le plus simple, celui de **Langmuir** (L). Ce modèle repose sur les hypothèses que l'adsorption des molécules a lieu sur des sites de reconnaissance homogènes en énergie, ne pouvant accueillir qu'une seule molécule, n'étant pas dépendant des sites voisins et montrant une adsorption de type monocouche. Ce modèle est exprimé par l'équation 16.

$$Q = \frac{N * K * F}{1 + K * F} \quad \text{Eq. 16}$$

²²³ Ansell, R. J. Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. In *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*; Mattiasson, B., Ye, L., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 150, pp 51–93.

²²⁴ Umpleby, R.; Baxter, S.; Rampey, A.; Rushton, G.; Chen, Y.; Shimizu, K. Characterization of the Heterogeneous Binding Site Affinity Distributions in Molecularly Imprinted Polymers. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *804*, 141–149.

Avec Q étant la quantité de template adsorbée, F la concentration libre (après équilibre) du template dans la solution, N le nombre de sites d'adsorption homogènes en énergie et K la constante d'association qui est identique pour tous les sites actifs.

Cependant, en pratique, la surface des MIPs est caractérisée par une distribution hétérogène des énergies de liaison. Ainsi, les hypothèses du modèle de Langmuir sont assez éloignées de la réalité d'un MIP. La liaison du template au MIP peut impliquer plusieurs points et peut être affectée par une distribution locale non homogène des sites de liaison. De cette manière, un modèle dérivé de Langmuir, appelé **Bi-Langmuir** (BL) a été développé et suppose que la surface du MIP comprend un ensemble spécifique de deux types de sites (à forte et à faible affinité) possédant chacun une constante d'association propre de valeur précise. Ce modèle est exprimé comme étant la somme de deux termes de type Langmuir (équation 17) :

$$Q = \frac{N_1 * K_1 * F}{1 + K_1 * F} + \frac{N_2 * K_2 * F}{1 + K_2 * F} \quad \text{Eq. 17}$$

Conventionnellement, le premier terme de l'équation (en rouge) représente les sites de reconnaissance de forte affinité tandis que la seconde partie de l'équation (en bleu) représente les sites de faible affinité. Généralement K_1 est donc plus grand que K_2 et N_1 plus petit que N_2 . Ce modèle peut être appliqué également à 3 ou 4 populations de sites distincts.²²⁵ Ces modèles seront appelés tri- et tétra-Langmuir, correspondant à l'addition de 3 et 4 termes de type « Langmuir ». Le modèle Bi-Langmuir a été largement appliqué pour décrire les interactions entre deux énantiomères et des phases chromatographiques chirales.

En raison de la création d'un complexe de pré-polymérisation non stœchiométrique lors de synthèse de MIPs par la méthode non covalente (excès de monomères pour favoriser l'adsorption), les matériaux imprimés contiennent de multiples sites d'interaction avec la molécule d'intérêt montrant des énergies d'adsorption différentes. De ce fait, pour décrire cette hétérogénéité de surface, plusieurs modèles ont été proposés ; le plus commun étant celui de **Freundlich**^{222,224,226} (F). Ce modèle est exprimé par l'équation 18 et décrit principalement la région de sous saturation (domaine où la capacité du matériau n'a pas été atteinte) (Figure 132) contrairement aux deux modèles précédents.

$$Q = a * F^m \quad \text{Eq. 18}$$

Dans cette équation, les paramètres **a** et **m** sont propres au modèle. Le facteur **a** est un paramètre lié à la capacité d'adsorption ($N_{Kmin-Kmax}$) et à la constante d'association moyenne (\bar{K}). Ces deux paramètres

²²⁵ Kim, H.; Guiochon, G. Adsorption on Molecularly Imprinted Polymers of Structural Analogues of a Template. Single-Component Adsorption Isotherm Data. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6415–6425.

²²⁶ Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Bode, M.; Berch, J. K.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D. Application of the Freundlich Adsorption Isotherm in the Characterization of Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *435*, 35–42.

peuvent être calculés en utilisant les équations d'approximation 19, 20, 21, en tenant compte de l'intervalle de concentration utilisé pour établir les isothermes d'adsorption.

$$K_{max} = \frac{1}{c_{min}}; \quad K_{min} = \frac{1}{c_{max}} \quad \text{Eq. 19}$$

$$N_{K_{min}-K_{max}} = a * (1 - m^2) * (K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}) \quad \text{Eq. 20}$$

$$\bar{K} = \left(\frac{m}{m-1} \right) * \left(\frac{K_{min}^{(1-m)} - K_{max}^{(1-m)}}{K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}} \right) \quad \text{Eq. 21}$$

Le facteur m est appelé le facteur d'hétérogénéité et est compris entre 0 et 1. Plus ce paramètre est proche de 1 plus la distribution des sites est homogène. A l'inverse si m est proche de zéro, la distribution des sites est dans ce cas-là hétérogène.

Cependant ce modèle ne permet pas de modéliser le comportement de saturation et limite donc les paramètres pouvant être déterminés. En effet, le modèle de Freundlich ne peut pas fournir les paramètres globaux tels que le nombre total de sites de liaison ou la constante d'affinité moyenne globale. C'est pourquoi, un modèle hybride (à la fois homogène et hétérogène), appelé **Freundlich-Langmuir** (L-F) a été utilisé et introduit pour la compréhension des MIPs par Umpleby.¹⁶⁴ Ce modèle, capable de décrire à la fois la totalité des sites se trouvant dans les régions de saturation et de sous-saturation (Figure 132) est décrit par l'équation 22 :

$$Q = \frac{N * K^m * F^m}{1 + K^m * F^m} \quad \text{Eq. 22}$$

Ici, N est le nombre total de site de reconnaissance, K est la constante d'association moyenne et m est l'indice d'hétérogénéité comme décrit pour le modèle de Freundlich.

Afin de choisir le bon modèle d'isotherme d'adsorption, il faut regarder de près l'approche utilisée pour la synthèse de MIPs (type d'interaction, monomère, stœchiométrie...) ainsi que la gamme de concentration choisie pour cette étude.

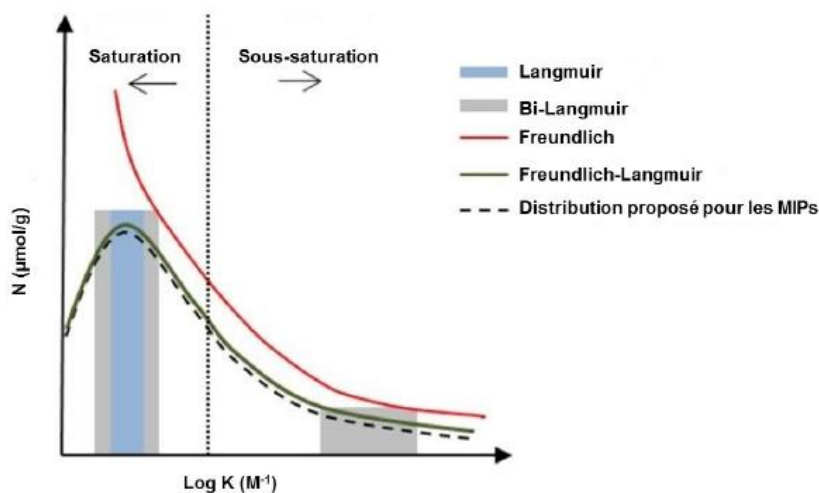


Figure 132 : Distribution des sites actifs proposés pour chaque modèle d'isotherme d'adsorption (adapté de Umpleby et al.²²⁴)

Un complément de la Figure 132 résumant les informations importantes de ces différents modèles est présenté dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Modèles utilisés pour caractériser les MIPS²²³

Modèle	Equation	Nombre et classe de sites	Linéarité	Saturation
Langmuir	$Q = \frac{N * K * F}{1 + K * F}$	1, Homogène	Oui	Oui
Bi-Langmuir	$Q = \sum_{i=1}^m \frac{N_i * K_i * F}{1 + K_i * F}$	i, homogène	Non	Oui
Freundlich	$Q = a * F^m$	Distribution continue avec un grand nombre de sites faibles et quelques sites forts	Oui	Non
Freundlich-Langmuir	$Q = \frac{N * K^m * F^m}{1 + K^m * F^m}$	Distribution gaussienne avec un maximum défini	Oui (avec estimation de Q_{max})	Non

Dans le chapitre suivant, nous allons présenter la synthèse de particules imprimées moléculairement par approche semi-covalente ayant une taille moyenne comprise entre 200 et 400 nm, dans le but de libérer de façon contrôlée un acyclonucléoside phosphonate.

Ces nanoparticules ont été polymérisées par précipitation dans l'acétonitrile pur, ou en mélange avec l'eau, où étaient solubilisés les monomères fonctionnels, acide méthacrylique en première intention, à une concentration inférieure à 2% en volume. Des réticulants de polarités différentes (cf. paragraphe 3.2.3) ont aussi été utilisés dans nos formulations. Parallèlement à ces synthèses de nanosphères polymériques, des particules de type core-shell, avec coquille imprimée moléculairement et cœur biocompatible, ont été créées.

La caractérisation de toutes ces poudres, de leur capacité et de leur nombre de sites de reconnaissance, a été effectuée par la mesure des recaptures moléculaires (en utilisant une méthode HPLC-UV validée) et par le tracé des isothermes d'absorption (cf. paragraphe 4).

Chapitre 4 : Développement de polymères à empreintes moléculaires pour la délivrance du Ténofovir

1. Données préliminaires

1.1. Synthèse du LAVR-289 sous sa forme phosphonate

Le deuxième objectif de cette thèse est le développement d'un polymère pour la délivrance contrôlée de la forme phosphonate libre du LAVR-289, **17**. Pour développer un polymère à empreintes moléculaires capable de posséder des cavités reconnaissant les fonctionnalités chimiques, la taille et la forme du LAVR-289 sans ses groupements biolabiles, il est nécessaire d'avoir accès à cette molécule, chimiquement pure et en grande quantité. Ce composé sert de « molécule empreinte » ou « template » dans la synthèse du polymère imprimé moléculairement.

La stratégie de synthèse du LAVR-289 **12** est basée sur une métathèse croisée d'oléfines portant déjà, sur chaque partenaire, les groupements biolabiles. Ainsi à partir du LAVR-289, plusieurs approches ont été tentées, en vain, pour convertir le LAVR-289 en sa forme totalement déprotégée **17**. Le groupement acétate peut être clivé par la lipase B de *Candida antarctica* ou CAL-B,²²⁷ le groupement POC par une estérase de foie de porc ou PLE⁸ (pig liver esterase), tandis que la phospholipase C, qui fait partie de la catégorie des phosphodiesterases, catalyse l'hydrolyse de la liaison unissant l'acide phosphonique à la partie glycéridique de la chaîne HDP (cf. Chapitre 1, paragraphe 2.3) (Schéma 14).

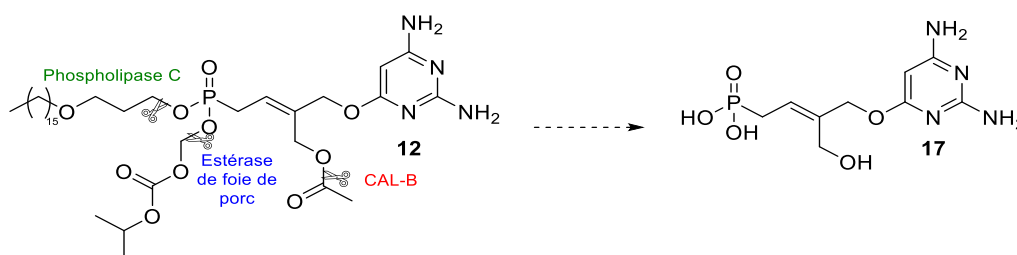


Schéma 14 : Enzymes pouvant cliver les groupements biolabiles du LAVR-289 et conduire à la formation du composé **17**

Ces essais de dégradations enzymatiques, ont été suivis par analyses HPLC-UV, effectuées sur une colonne Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μ m) (cf. chapitre 2, paragraphe 2.1) en mode d'élution en gradient (de 5% à 95% d'acétonitrile en 10 min suivi d'un plateau à 95% d'ACN pendant 15 min) de manière à pouvoir observer des composés moins polaires que le LAVR-289. Le débit est fixé à 0,3 mL/min, la température du four colonne est de 40 °C et la détection dans l'ultra-violet se fait aux longueurs d'onde 210, 267 et 230 nm. Les essais menés avec la CAL-B n'ont pas abouti aux résultats escomptés. En effet après 20 h d'incubation, nous n'avons pas observé l'apparition de nouveaux pics sur le chromatogramme.

²²⁷ Zaïdi, A.; Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouiouche, L. CAL-B-Catalyzed Enantioselective Deacetylation of Some Benzylic Acetate Derivatives Via Alcoholysis in Non-Aqueous Media. *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 1054–1061.

Concernant la dégradation du groupement POC, nous nous sommes inspirés des travaux de Naesens *et al.*⁸ qui ont montré que le ténofovir, pouvait être obtenu par voie enzymatique à partir de sa forme prodrogue, le *bis*(POC)-ténofovir en passant par l'intermédiaire *mono*(POC)-ténofovir (Schéma 15).

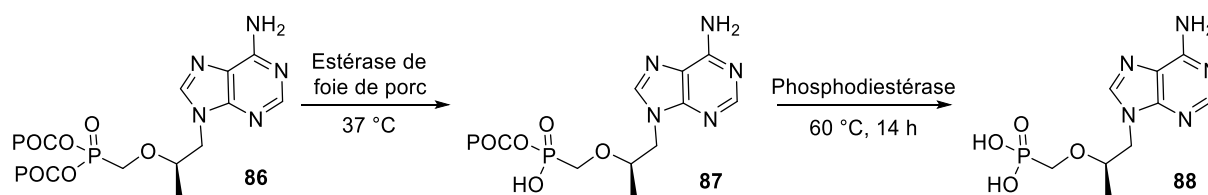


Schéma 15 : Dégradation enzymatique du *bis*(POC)-ténofovir⁸

Avant d'engager le LAVR-289 dans les conditions de clivage enzymatique publiées, la méthodologie a été essayée sur le *bis*(POC)-ténofovir. Celui-ci a été incubé avec l'estérase de foie de porc (PLE) et les produits formés ont été analysés par HPLC-UV sur une colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 µm) (Figure 133). La méthode mise au point consiste en une phase mobile composée d'une solution de dihydrogénophosphate d'ammonium (mélange à 0,1% de NH₄OH à 28% et 0,1% de H₃PO₄ à 99%) à pH 5 et de méthanol (MeOH) en mode d'élution gradient (8% MeOH sur 3 min, puis un gradient pendant 10 min jusqu'à 90% de MeOH et un plateau de 7 min à cette composition). Le débit est de 0,8 mL.min⁻¹, la température du four colonne est de 35 °C et la détection dans l'ultra-violet se fait aux longueurs d'onde 210 et 260 nm. Cette dernière a été choisie car le ténofovir possède une nucléobase adénine dont la longueur d'onde du maximum d'absorbance est 260 nm.²²⁸ L'adénine étant le groupement chromophore du ténofovir, la longueur d'onde maximale des analogues *bis*(POC) et *mono*(POC) est également à 260 nm. Les choix plus détaillées de la longueur d'onde, de la colonne ainsi que de la phase mobile seront discutés dans le paragraphe 2.1.

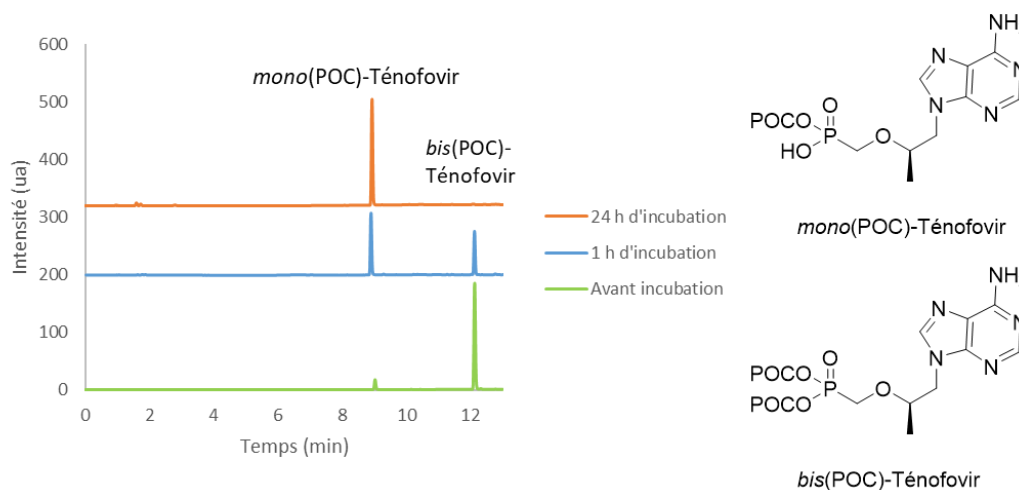


Figure 133 : Suivi HPLC-UV de la dégradation enzymatique du *bis*(POC)-ténofovir en fonction du temps d'incubation

²²⁸ Mason, S. F. Purine Studies. Part II. The Ultra-Violet Absorption Spectra of Some Mono- and Poly-Substituted Purines. *J. Chem. Soc. Resumed.* **1954**, 2071.

Dans ces conditions d'analyse, le *bis*(POC)-ténofovir présente un temps d'élution de 12 min. Au bout d'une heure d'incubation, un nouveau composé plus polaire, ayant un temps de rétention de 8 min se forme et devient majoritaire au bout de 24 h. Ce composé correspond au *mono*(POC)-ténofovir, (confirmé par analyse LC/MS) et confirme que l'enzyme à notre disposition permet de cliver un groupement POC greffé à un phosphonate quand celui-ci comporte deux fonctions esters.

Fort de ce constat, nous avons donc appliqué ces conditions au LAVR-289 afin d'obtenir dans un premier temps le HDP-LAVR (Schéma 16). En parallèle, le LAVR-289 est mis dans les mêmes conditions sans présence d'enzyme, pour contrôle. Cependant, les premiers essais réalisés n'ont pas permis d'obtenir le composé désiré.

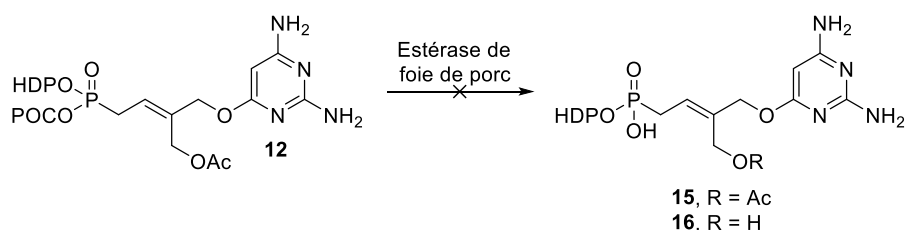


Schéma 16 : Dégradation enzymatique du LAVR-289

Sur la Figure 134 sont représentés les chromatogrammes après 16 h d'incubation du LAVR-289 avec et sans enzyme. L'apparition d'aucun nouveau pic n'est observé. Seuls les deux diènes **21** et **34**, ayant un temps de rétention de 17,8 min et de 18,5 min, respectivement se sont formés. Ainsi, l'utilisation de la PLE ne semble pas fonctionner pour cliver le groupement POC du LAVR-289, le groupement HDP pouvant être responsable d'un encombrement stérique.

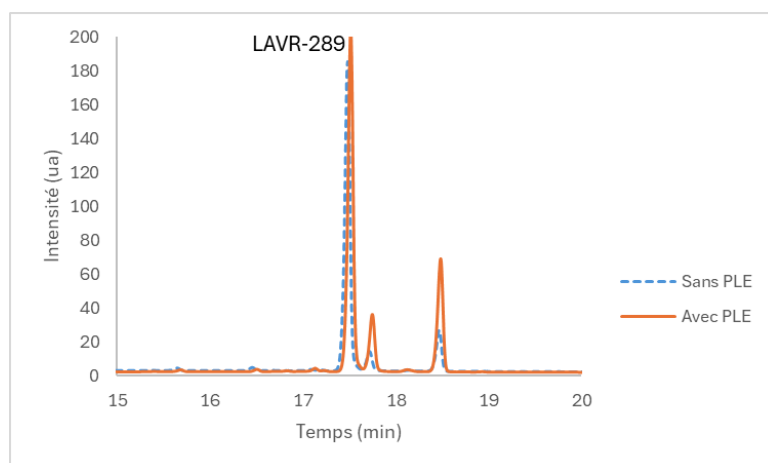


Figure 134 : Chromatogrammes du LAVR-289 après 16 h d'incubation avec et sans la PLE

Pour contourner les problèmes de dégradation du LAVR-289 au cours d'une incubation enzymatique visant à enlever les groupements POC et acétate, une *O*-déalkylation et une déacétylation aurait pu être envisagées. Cependant, ces réactions étant généralement réalisées en milieu basique, elles n'ont pas pu être réalisées. En effet, comme mentionné dans le paragraphe 4 du chapitre 2, le produit majoritairement formé en solution alcaline est le composé **34**, « diène avec base ».

Une troisième voie a alors été explorée à partir, non plus du LAVR-289 mais d'autres analogues dialkyles phosphonates. Tout d'abord, les analogues *(bis)*méthyle **91** et *(bis)*éthyle **92** du LAVR-289 ont été synthétisés à partir d'une réaction de métathèse croisée entre les dérivés allyles phosphonates **4** et **93** correspondant et le composé **10**. La déprotection des amines des composés **89** et **90** par du TFA permet d'isoler les composés **91** et **92** recherchés (Schéma 17). Une analyse sur la colonne Poroshell Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 µm) utilisée dans le chapitre 2 a été mise au point pour séparer les isomères *Z* et *E* de ces deux analogues (Annexe 4 et Annexe 5).

Ces dialkyles phosphonates ont ensuite été engagés dans une réaction d'hydrolyse dans les conditions classiques développées par McKenna^{229,230} en présence de bromotriméthylsilane et de 2,6-lutidine. Cette dernière a été ajoutée pour éviter la substitution du groupement acétate par un atome de brome, réaction déjà été observée dans notre équipe.²³¹ Cependant, ces conditions réactionnelles n'ont conduit qu'à une dégradation des analogues alkylés et non en la formation du phosphonate **46** (Schéma 17).

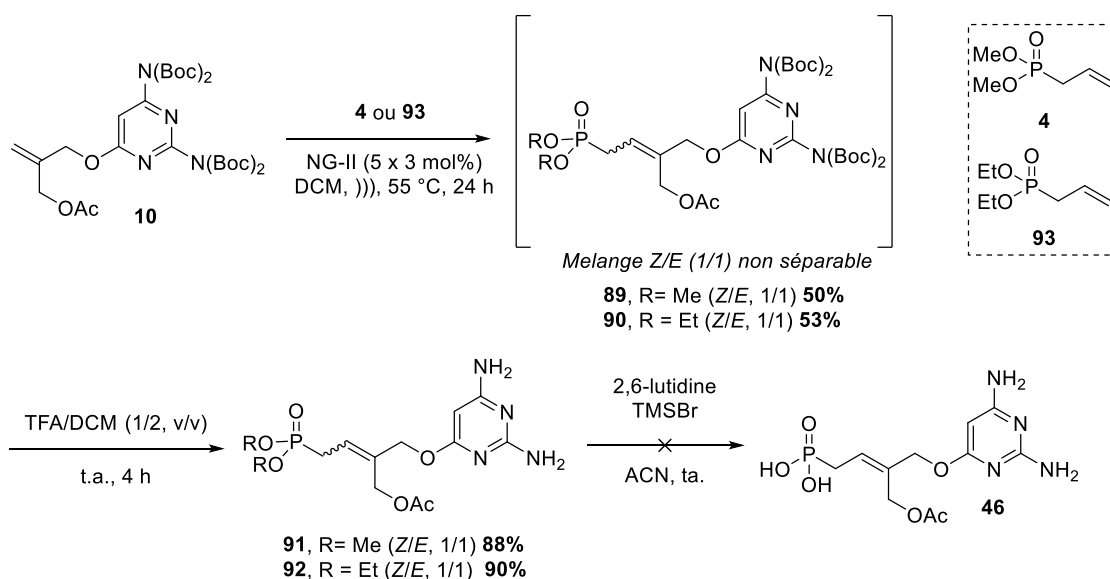


Schéma 17 : Synthèse des analogues *(bis)*méthyle et *(bis)*éthyle du LAVR-289 et hydrolyse du phosphonate

En suivant le même raisonnement que celui qui a amené à synthétiser le *(bis)*POC, le *(bis)*méthyle et le *(bis)*éthyle, d'autres analogues possédant des groupements *(bis)*isopropyle, *(bis)*phényle et *(bis)*benzyle ont été également synthétisés dans notre équipe. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir le produit de déalkylation.

²²⁹ McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; McKenna, M.-C. The Facile Dealkylation of Phosphonic Acid Dialkyl Esters by Bromotrimethylsilane. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 155–158.

²³⁰ Błażewska, K. M. McKenna Reaction—Which Oxygen Attacks Bromotrimethylsilane? *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 408–412.

²³¹ O. Sari. Synthèse métallo-catalysée d'acyclonucléosides phosphonates, de nucléosides et d'hétérocycles à visée antivirale. Thèse de doctorat. Université d'Orléans, 2013.

Nous avons alors orienté nos travaux sur le ténofovir, un acyclonucléoside phosphonate disponible commercialement, pris comme modèle. Le choix de cette molécule template est double :

- ✓ Celui-ci pourra être considéré comme un « dummy-template » du LAVR-289 phosphonate libre. En effet, les deux structures sont composées d'un motif phosphonate et la base DAPy du LAVR-289 mime une base purique⁵⁴ (Figure 135). Ces essais sur le ténofovir permettront de développer une formulation de MIPs qui sera alors transposable à la forme phosphonate **17** du LAVR-289, une fois les problèmes d'obtention contournés.
- ✓ Les polymères reconnaissant moléculairement le ténofovir pourront être utilisés pour sa libération contrôlée dans le traitement du VIH ou VHB, en comparaison avec ses formes prodrogues tout en diminuant la toxicité du ténofovir seul.

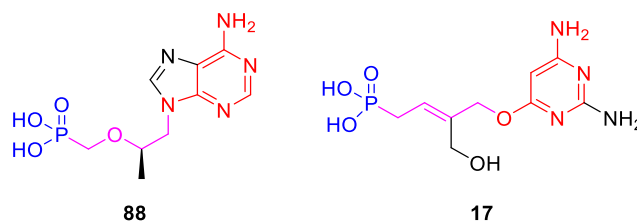


Figure 135 : Ressemblance structurale entre le ténofovir et le LAVR-289 phosphonate libre

1.2. Choix du template

Comme mentionné dans le chapitre 1, le ténofovir est un antiviral à large spectre utilisé dans le traitement des infections liées aux virus VIH et VHB. Sa faible biodisponibilité a conduit à la synthèse de plusieurs prodrogues dont deux sont aujourd'hui disponibles en pharmacie : le fumarate de ténofovir disoproxil (TDF ou tenofovir disoproxil fumarate) et le ténofovir alafénamide (TAF ou tenofovir alafenamide) (Figure 136). Cependant, bien que ces prodrogues aient permis d'augmenter l'activité antivirale et la biodisponibilité du ténofovir, ces modifications présentent quelques inconvénients.⁴⁶ Par exemple, après administration par voie orale, le TDF est rapidement converti en ténofovir dans le plasma ($t_{1/2}$ plasmatique = 0,4 min). Cette accumulation du ténofovir dans le plasma est responsable des toxicités rénale et osseuse du TDF. Contrairement au TDF, le TAF est stable dans le plasma ($t_{1/2}$ plasmatique = 90 min) et n'est converti en ténofovir qu'uniquement au sein de la cellule.

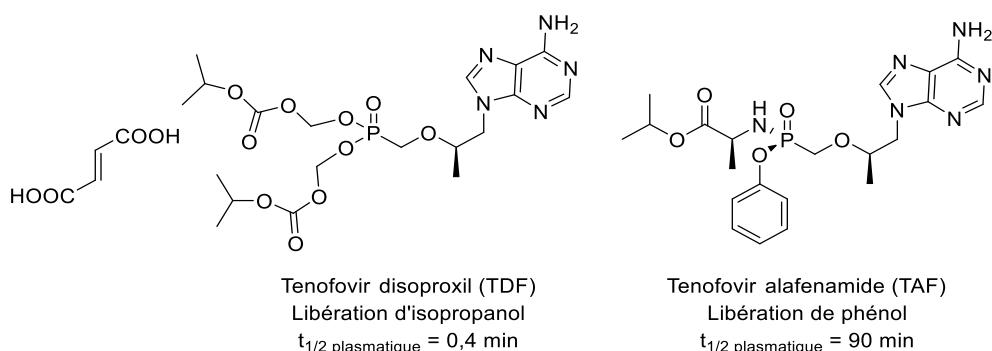


Figure 136 : Structures du TDF et du TAF

Pour éviter ces inconvénients, une autre approche consisterait à développer des systèmes de délivrance de la forme phosphonate libre ayant pour but de :

- ✓ Maximiser l'efficacité thérapeutique en transportant et en libérant le médicament au site ciblé,
- ✓ Réduire sa toxicité par la minimisation de son accumulation dans le corps,
- ✓ Contrôler sa libération afin d'optimiser son profil pharmacocinétique, en protégeant le principe actif de la dégradation liée au milieu physiologique et en améliorant l'acceptation et l'observance des patients.

Plusieurs « drug delivery systems » permettant de transporter et libérer de façon contrôlée le ténofovir ont récemment été publiés. Parmi les formulations rapportées nous pouvons citer les plus abouties qui sont issues des travaux de Spinks *et al.*²³², qui, en 2017 ont encapsulé le ténofovir au sein de liposomes, ou du développement de nanodisques en 2022 par l'équipe de Garcia *et al.*²³³ pour la délivrance du ténofovir au niveau cérébral, en franchissant ainsi la barrière hémato-encéphalique. Enfin, plus récemment, en 2023, l'équipe de Fotooh Abadi *et al.*²³⁴ a inventé un système de délivrance du ténofovir basé sur des nanomatériaux, ici des nanoparticules d'or, pour éliminer les réservoirs de VIH, se trouvant dans le cerveau. Parmi la variété des formulations publiées, aucune n'a eu recours à l'utilisation de systèmes polymériques. A partir de ce constat et en s'appuyant sur le domaine d'expertise du laboratoire, nous avons souhaité développer un système de délivrance du ténofovir de type nanoparticules polymériques basé sur la technologie de l'impression moléculaire.

Ce polymère à empreintes moléculaires devra être biocompatible et aura pour but d'augmenter la biodisponibilité du ténofovir, après une injection par voie intraveineuse ou *per os*, d'aider à sa

²³² Spinks, C.; Zidan, A.; Khan, M.; Habib, M.; Faustino, P. Pharmaceutical Characterization of Novel Tenofovir Liposomal Formulations for Enhanced Oral Drug Delivery: In Vitro Pharmaceutics and Caco-2 Permeability Investigations. *CPLA*. **2017**, *9*, 29–38.

²³³ Garcia, C. R.; Rad, A. T.; Saeedinejad, F.; Manojkumar, A.; Roy, D.; Rodrigo, H.; *et al.* Effect of Drug-to-Lipid Ratio on Nanodisc-Based Tenofovir Drug Delivery to the Brain for HIV-1 Infection. *Nanomedicine*. **2022**, *17*, 959–978.

²³⁴ Fotooh Abadi, L.; Kumar, P.; Paknikar, K.; Gajbhiye, V.; Kulkarni, S. Tenofovir-Tethered Gold Nanoparticles as a Novel Multifunctional Long-Acting Anti-HIV Therapy to Overcome Deficient Drug Delivery: An in Vivo Proof of Concept. *J. Nanobiotechnol.* **2023**, *21*, 19.

perméabilité cellulaire et d'éviter sa surexposition plasmatique et donc sa néphrotoxicité. Une fois le template défini, les monomères fonctionnels doivent être choisis.

1.3. Choix des monomères

Concernant les monomères fonctionnels, composants cruciaux de la formulation du polymère, la nécessité d'utiliser des molécules biocompatibles restreint leur choix. Une étude a montré que des dérivés de l'acide méthacrylique sont biocompatibles et peuvent être utilisés pour l'encapsulation et la libération contrôlée de principes actifs.²³⁵ Certains monomères comme l'acrylamide, qui est reconnu comme étant CMR (cancérigène, mutagène, reprotoxique), peuvent présenter une toxicité élevée mais deviennent totalement inoffensifs et biocompatibles une fois polymérisés. Les monomères doivent également posséder des groupements complémentaires au template, pouvant ainsi créer des interactions intermoléculaires avec ce dernier afin de former un complexe de pré-polymérisation le plus stable possible.

En observant la structure du ténofovir, il apparaît deux sites potentiels pouvant créer des interactions énergétiques avec des monomères fonctionnels *ad hoc* : la base purique (qui possède des sites accepteur et donneur de liaisons hydrogène) et le motif phosphonate (site échangeur de cation) (Figure 137).

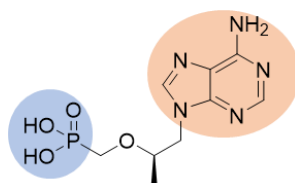


Figure 137 : Sites d'interactions potentiels avec les monomères fonctionnels sur le ténofovir

Concernant la reconnaissance de la nucléobase, il a été montré dans la littérature et par les travaux de notre équipe que les petits monomères de type acrylamide et dérivés, comme le *N*-isopropylacrylamide, ou l'acide méthacrylique peuvent être utilisés pour complexer des nucléobases.^{146,162, 236} De même, pour la synthèse d'un MIP reconnaissant spécifiquement l'adéfovir, molécule ayant une adénine comme nucléobase, l'acide méthacrylique a montré tout son intérêt.²³⁷ Une méthode alternative, pour créer des interactions avec l'adénine, repose sur l'utilisation de monomères fonctionnels dérivés de l'uracile. En effet, l'appariement des bases nucléiques

²³⁵ Luliński, P. Molecularly Imprinted Polymers as the Future Drug Delivery Devices. *Acta Pol. Pharm.* **2013**, *70*, 601–609.

²³⁶ Shea, K. J.; Spivak, D. A.; Sellergren, B. Polymer Complements to Nucleotide Bases. Selective Binding of Adenine Derivatives to Imprinted Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368–3369.

²³⁷ Pourfarzib, M.; Dinarvand, R.; Akbari-adergani, B.; Mehramizi, A.; Rastegar, H.; Shekarchi, M. Water-compatible Molecularly Imprinted Polymer as a Sorbent for the Selective Extraction and Purification of Adefovir from Human Serum and Urine. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 1755–1762.

complémentaires par des interactions de type Watson-Crick est bien connu²³⁸ et est nécessaire à l'activité antivirale des ANPs.^{239,240} (Figure 138).

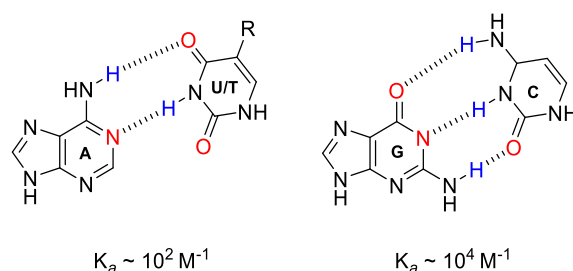


Figure 138 : Appariements des bases nucléiques (les atomes donneurs et accepteurs de LH sont représentés en bleu et rouge, respectivement)

L'appariement des nucléobases a déjà été utilisé dans la synthèse de polymères.²⁴⁰ Dans le secteur des polymères à empreintes moléculaires, Mourão *et al.*²⁴¹ ont synthétisé des nanoparticules en utilisant la *N1*-vinylbenzyl-thymine comme monomère. De même, notre équipe a développé des polymères rigides imprimés pour la libération contrôlée de la ribavirine (un analogue de la guanosine, à large spectre antiviral) en utilisant des monomères fonctionnels présentant des motifs thymine et uracile.¹⁷⁷ En ce qui concerne le motif phosphonate, il peut facilement créer des interactions intermoléculaires de type ionique. En effet, la Figure 139, obtenue par le logiciel Marvin Sketch® représentant le pourcentage des différentes formes du ténofovir en fonction du pH, montrent que le ténofovir est majoritairement monochargé (anionique) entre pH 3 et pH 7. Au pH sanguin ou cytosolique, le ténofovir est ainsi présent à 75% sous sa forme monochargée et à 25% sous sa forme dichargée.

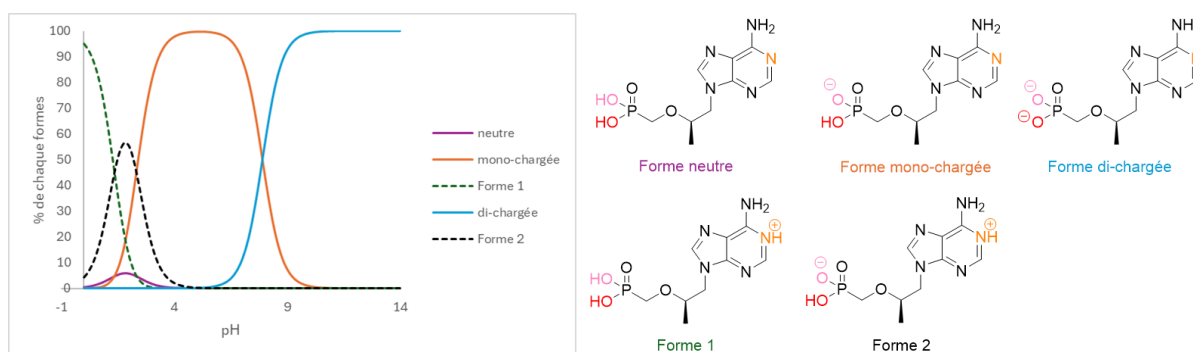


Figure 139 : Pourcentage des formes du Ténofovir en fonction du pH

²³⁸ Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. **1953**, *171*, 737–738.

²³⁹ De Clercq, E. Hydrogen Bonding (Base Pairing) in Antiviral Activity. *Viruses*. **2023**, *15*, 1145.

²⁴⁰ Del Prado, A.; González-Rodríguez, D.; Wu, Y. Functional Systems Derived from Nucleobase Self-assembly. *ChemistryOpen*. **2020**, *9*, 409–430.

²⁴¹ Mourão, C. A.; Bokeloh, F.; Xu, J.; Prost, E.; Duma, L.; Merlier, F.; *et al.* Dual-Oriented Solid-Phase Molecular Imprinting: Toward Selective Artificial Receptors for Recognition of Nucleotides in Water. *Macromolecules*. **2017**, *50*, 7484–7490.

Les pKa des deux fonctions acides du groupement phosphonate estimés par le logiciel ($pK_{a1} = 1,31$; $pK_{a2} = 7,90$) corrélerent avec les valeurs de la littérature pour les acides alkylphosphoniques.²⁴²

Ainsi, pour créer des interactions ioniques, des monomères de type amine primaire secondaire, ou tertiaire, de l'urée ou de l'imidazole pourraient être utilisés.

A partir de cette grande variété d'interactions, diverses formulations vont être décrites : la synthèse de polymères par précipitation sera présentée dans la première partie de ce chapitre tandis que le développement d'un core-shell à base de polydopamine sera discuté dans un second temps. Mais avant de présenter les synthèses et les caractérisations de ces polymères, il a été nécessaire de développer une méthode analytique HPLC-UV pour analyser le ténofovir et le suivre tout au long des étapes du développement d'un MIP.

2. Méthode analytique

2.1. Mise en place de la séparation

Afin de quantifier le ténofovir au cours des différentes étapes de conception d'un polymère à empreintes moléculaires (lavage, isotherme d'absorption et cinétique de relargage), une méthode HPLC-UV a été développée. Les bases nucléiques montrant un coefficient d'absorbance molaire élevé dans le domaine de l'UV,²⁴³ ce type de détecteur a été privilégié. Il est à noter que leur profil UV et leur longueur d'onde maximale diffèrent en fonction de la nature pyrimidique ou purique de leur base (Figure 140). Ainsi, la guanosine présente un maximum d'absorption à 254 nm, l'adénosine à 260 nm, l'uridine a une longueur d'onde maximale d'absorbance à 262 nm, tandis que le spectre UV de la cytosine présente un maximum à 271 nm.

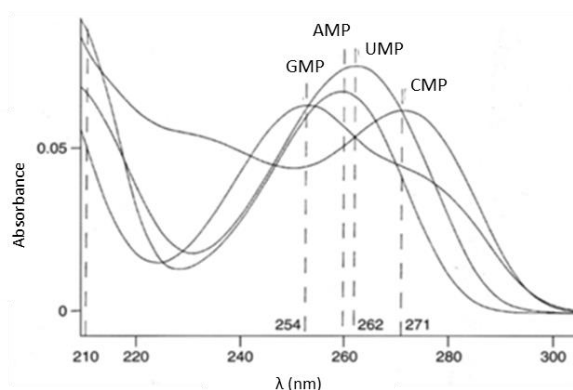


Figure 140 : Spectres UV des bases nucléiques²⁴⁴ (GMP = guanosine monophosphate, AMP = adénosine monophosphate, UMP = uridine monophosphate et CMP = cytosine monophosphate)

²⁴² Martin, D. J.; Griffin, C. E. Phosphonic Acids and Esters. *J. Organomet. Chem.* **1964**, *1*, 292–296.

²⁴³ Voet, D.; Gratzer, W. B.; Cox, R. A.; Doty, P. Absorption Spectra of Nucleotides, Polynucleotides, and Nucleic Acids in the Far Ultraviolet. *Biopolymers.* **1963**, *1*, 193–208.

²⁴⁴ Fischer, J. Specific detection of nucleotides, creatine phosphate, and their derivatives from tissue samples in a simple, isocratic, recycling, low-volume system. *LC-GC Int.* **1995**, *8*, 254–264.

Le ténofovir étant un dérivé de l'adénine celui-ci aura donc un maximum d'absorption à 260 nm, ce qui a été confirmé lors de la réalisation du spectre UV du ténofovir dans l'eau (Annexe 3). En se plaçant à cette longueur d'onde de détection, la rétention du ténofovir a été étudiée.

Afin d'obtenir une rétention optimale du ténofovir de nombreux essais ont été réalisés sur différentes colonnes chromatographiques, en faisant varier les conditions d'élution.

Une phase mobile binaire, mélangeant de l'eau avec de l'acétonitrile ou avec du méthanol comme modificateur organique, a montré un facteur d'asymétrie sur le pic chromatographique du ténofovir largement supérieur à 1. Pour ramener ce facteur vers la valeur de 1, il a été nécessaire d'utiliser une solution aqueuse tamponnée à pH~5 à la place de l'eau pure. Selon le logiciel Marvin sketch, la molécule de ténofovir possède 3 sites de protonation, dont les pKa sont compris entre 2,37 et 7,90. C'est une molécule très polaire ayant Log D à pH physiologique (pH = 7,4) de -1,12 (Figure 141).

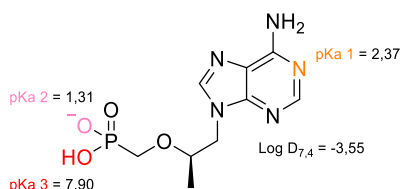


Figure 141 : Estimation par le logiciel Marvin Sketch® des pKa et du Log D_{7,4} du ténofovir

La colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 µm), possédant une phase stationnaire de type silice greffée octadécyle, un débit de 0,8 mL/min, une température de colonne de 35 °C et une phase mobile solution aqueuse tamponnée (phosphate d'ammonium pH 5)/MeOH (95/5, v/v) sont utilisés pour éluer le ténofovir en 2,5 min sous la forme d'un pic gaussien (Figure 142). Cette colonne possédant un diamètre de particules de 1,8 µm permet de garder une efficacité proche de l'optimale à un débit élevé et donc réduire le temps d'analyse. Par ailleurs, cette colonne supporte des pH compris entre 2 et 9 et possède un taux de carbone suffisant pour retenir des composés assez polaires en gardant un certain pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile.

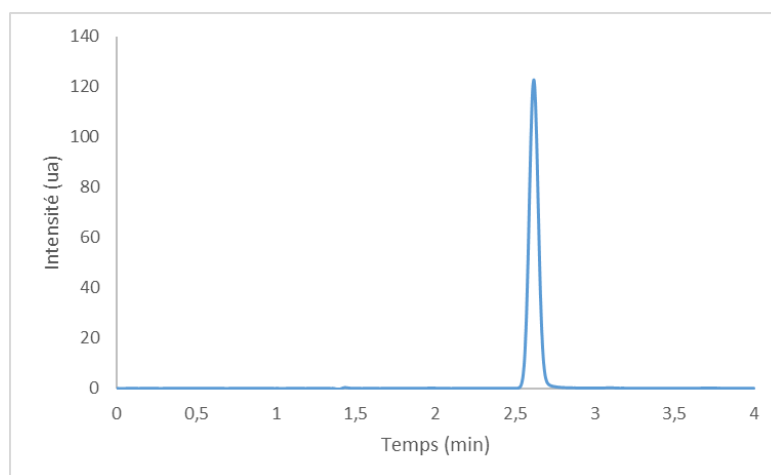


Figure 142 : Chromatogramme du ténofovir à 260 nm

2.2. Gamme d'étalonnage

Une fois les polymères obtenus, des études de recapture du ténofovir par les matériaux imprimés et non imprimés synthétisés sont obligatoirement menés. Bien que la synthèse de nos polymères soit réalisée dans un solvant unique (par exemple l'acétonitrile) ou dans un mélange de deux solvants par exemple, eau + acétonitrile) (cf. chapitre 3, paragraphe 3.2.4), et qu'il a été montré que la reconnaissance est optimale dans le solvant ayant servi à la synthèse,¹⁹⁷ les solutions de ténofovir sont préparées dans un mélange binaire ACN/H₂O (1/1, v/v) pour une question de solubilité. Nous avons décidé d'utiliser un mélange ACN/H₂O comportant une proportion la plus élevée d'acétonitrile afin de s'approcher le plus possible de la composition du porogène tout en permettant la solubilisation du ténofovir jusqu'à une concentration de 2 mM. Ainsi, le mélange binaire ACN/H₂O (1/1, v/v) a été choisi comme solvant de dilution pour préparer les solutions à différents niveaux de concentration et tracer la courbe de réponse.

La solubilité maximale de notre analyte, dans un mélange 1/1 (v/v) d'ACN/H₂O étant de 2 mM et celui-ci n'étant pas détectable à 1 µM, en utilisant un volume d'injection de 0,5 µL, les gammes ont été réalisées dans des concentrations comprises entre 4µM et 2 mM. Le volume d'injection a été limité à 0,5 µL car le solvant d'injection (ACN/H₂O, 1/1, v/v) a un pouvoir éluant plus élevé que la phase mobile composée de 95% d'eau et 5% en volume du modificateur organique, le méthanol. Un plus grand volume d'injection aurait un impact sur la symétrie du pic d'élution et rendrait son intégration non exacte.

Trois gammes ont été réalisées afin de pouvoir mener les études de linéarité des différentes courbes de réponse à différentes demi-journées de la semaine. Pour chacune de ces 3 gammes, l'aire sous le pic chromatographique est tracée en fonction de la concentration de ténofovir. La linéarité est mesurée sur 9 niveaux de concentration (mM), chacun de ces niveaux est issu d'une série de 3 valeurs. Les résultats des analyses des différents niveaux de concentration en ténofovir sont regroupés en Annexe 6.

Nous pouvons remarquer que les trois gammes sont linéaires sur la fenêtre de concentrations étudiée et leurs les équations sont :

$$y_{J1-matin} = 364,36 - 0,1806 (R^2 = 0.9999965) \quad (\text{Eq. 23})$$

$$y_{J1-après midi} = 364,62 - 0,1794 (R^2 = 0.9999967) \quad (\text{Eq. 24})$$

$$y_{J2} = 365,06 - 0,1712 (R^2 = 0.9999963) \quad (\text{Eq. 25})$$

Les coefficients de corrélation obtenus (R^2) sont supérieurs à 0,999.

Il faut aussi démontrer par des tests statistiques que l'ordonnée à l'origine de chaque droite n'est pas significativement différente de 0 et que la pente de chaque droite est significativement différente de 1. Pour chacune des droites d'équation $y = ax + b$, un test statistique de Student, avec une probabilité α égale à 0,05 et un degré de liberté égal à N-2 est réalisé sur l'ordonnée à l'origine (b) et sur le coefficient directeur (a). Les résultats de ces tests sont répertoriés dans le Tableau 35. Dans celui-ci, S_b et S_a correspondent à l'écart type sur l'ordonnée à l'origine et sur le coefficient directeur, respectivement.²⁴⁵ t_t correspond à la valeur tabulée dans la table de Student (avec $\alpha = 0,05$ et $N = 25$) tandis que t_c correspond à la valeur du test calculé par la formule suivante :

$$t_c = \frac{|x|}{S_x} \text{ (Eq. 26)}$$

avec x égal b (ordonnée à l'origine) ou a (coefficient directeur) et S_x est égal à l'écart type sur a (S_a) ou l'écart type sur b (S_b).

Concernant l'ordonnée à l'origine celle-ci doit être la plus proche de 0. Pour valider le test statistique de Student, la valeur calculée (t_c) doit être inférieure à la valeur trouvée dans la table de Student (t_t). Nous pouvons remarquer que le test de Student, sur l'ordonnée à l'origine, est validé pour nos trois gammes. Concernant le coefficient directeur de la droite, celui-ci doit être différent de 1. Pour valider le test statistique de Student, la valeur calculée doit être supérieure à la valeur trouvée dans la table de Student (t_t). Dans le Tableau 35, nous pouvons remarquer que le test de Student, sur le coefficient directeur, est validé pour nos 3 gammes.

²⁴⁵ Feinberg, M.; Rudaz, S. *Quantification, Validation and Uncertainty in Analytical Sciences: An Analyst's Companion*, 1st ed.; Wiley, 2024.

Tableau 35 : Résultats des tests de Student sur le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine

Gammes	b = 0 [Student (0,05 ; 25)]		a ≠ 1 [Student (0,05 ; 25)]	
	$t_t > t_c \rightarrow b = 0$ $t_t < t_c \rightarrow b \neq 0$		$t_t > t_c \rightarrow a = 1$ $t_t < t_c \rightarrow a \neq 1$	
J1 matin	b	0,1806	a	364,3577
	S _b	0,1045	S _a	0,1366
	t _c	1,7281	t _c	2667,0461
	t _t	2,0595	t _a	2,0595
	Résultats	b = 0	Résultats	a ≠ 1
J1 après midi	b	0,1794	a	364,6171
	S _b	0,1016	S _a	0,1328
	t _c	1,7649	t _c	2744,6693
	t _t	2,0595	t _t	2,0595
	Résultats	b = 0	Résultats	a ≠ 1
J2	b	0,1712	a	365,0649
	S _b	0,1072	S _a	0,1402
	t _c	1,6000	t _c	2603,9552
	t _t	2,0595	t _t	2,0595
	Résultats	b = 0	Résultats	a ≠ 1

Il faut aussi effectuer le test d'homogénéité des variances (homoscédasticité) avec le test de Cochran où la valeur de C calculée doit être inférieure à la valeur tabulée pour (0,05, 8, 2). De même, un test d'existence d'une pente significative (test de Fisher ou test F1) est effectué et la valeur F calculée doit être supérieure à celle rapportée par la table de Fisher-Snedecor pour (0,05, 1, 25). Enfin, un dernier test statistique, dit F2, doit être appliqué pour valider la linéarité du modèle avec un test de Fisher. La valeur calculée devra être inférieure à celle tabulée pour (0,05, 7, 18). Les résultats de ces tests sont rapportés dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Résultats des tests de Cochran et de Fisher

Gammes	Test Cochran C _{tabulé} = 0,6798 C _{tabulé} > C _{calculé}	Test F1 F _{tabulé} = 4,242 F _{tabulé} < F _{calculé}	Test F2 F _{tabulé} = 3,4669 F _{tabulé} > F _{calculé}
J1 matin	C _{calculé} = 0,4450	F _{calculé} = 7,11.10 ⁶	F _{calculé} = 0,5751
J1 après midi	C _{calculé} = 0,4793	F _{calculé} = 7,53.10 ⁶	F _{calculé} = 1,4950
J2	C _{calculé} = 0,5109	F _{calculé} = 6,78.10 ⁶	F _{calculé} = 0,5336

Nous pouvons donc conclure que nos trois gammes d'étalonnage du ténofovir effectuées à des moments différents de la semaine passent toutes les tests statistiques d'homogénéité des variances (homoscédasticité), de l'existence d'une pente significative (test F1) et de linéarité des modèles (test F2). Par conséquent, nos 3 courbes de réponse sont linéaires.

En utilisant le logiciel ValidR-Assay,²⁴⁶ la Figure 143 a été obtenue. Sur celle-ci, la ligne noire, qui est la droite obtenue à partir des points issus des trois gammes, est bien comprise entre les deux lignes bleues représentant les intervalles de tolérances. Ces droites sont donc considérées comme identiques.

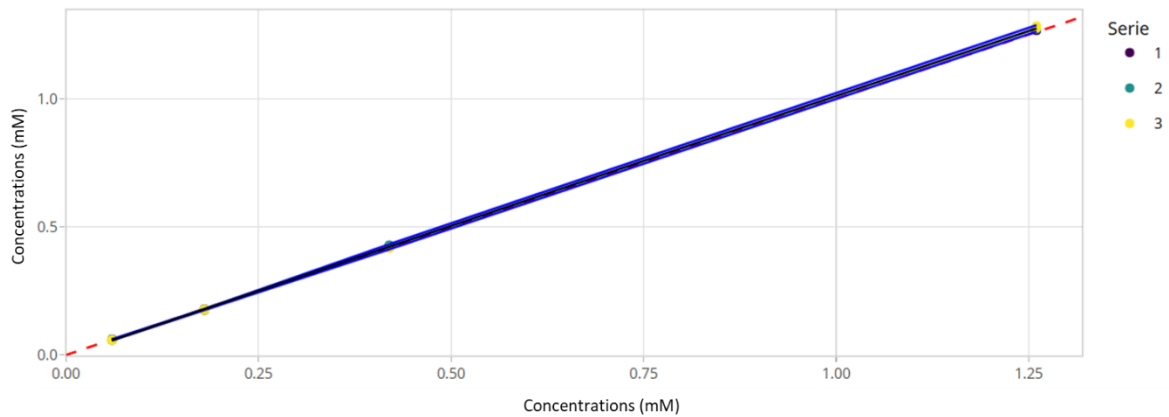


Figure 143 : Profils de linéarité (ligne pointillée rouge : ligne d'identité ; lignes noires : lignes de régression linéaire, lignes bleues : intervalles de tolérance)

D'ailleurs le test statistique de Cochran (0,05, 9, 2) rapporté à la droite comprenant les points issus des 3 gammes d'étalonnage effectuées à 3 moments différents donne $C_{\text{calculé}} = 0,6195 < C_{\text{tabulée}} = 0,8159$. Ce qui signifie que les variances sont homogènes pour l'ensemble des points des 3 droites. De même, le test F2 appliqué à l'ensemble des valeurs des 3 droites permet de valider la droite de régression globale montrant que ces droites sont significativement identiques du point de vue statistique, pour un tryptique (0,05, 7, 72).

La Figure 144 représente la répartition des résidus en fonction de la concentration pour les 3 gammes. Nous pouvons remarquer que cette répartition est bien aléatoire.

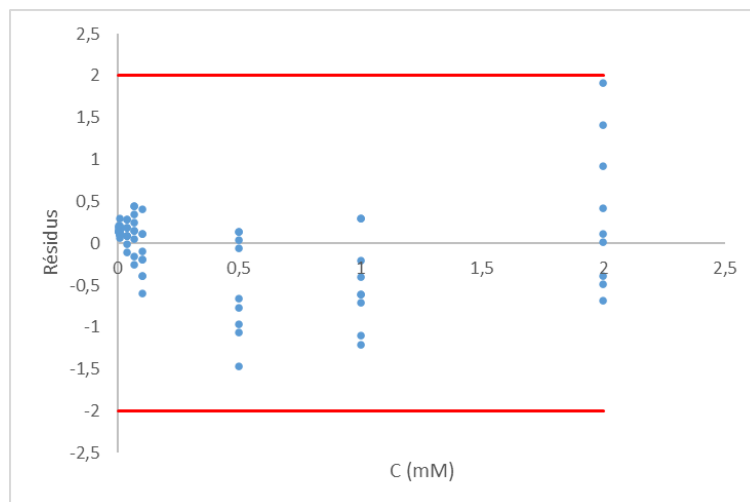


Figure 144 : Répartition des résidus en fonction de la concentration pour les 3 gammes.

²⁴⁶ Frédéric Marçon. (2023). marconfr/R_VALIDR: v1.0 (v1.0). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7706081>

Afin de valider notre méthode analytique, quatre solutions de ténofovir à des concentrations comprises dans la gamme sont utilisées comme standard. Les quatre concentrations qui ont servi à valider la gamme d'étalonnage sont 0,06, 0,18, 0,42 et 1,26 mM et les résultats des analyses HPLC-UV sont répertoriés en Annexe 7.

Dans le Tableau 37 sont répertoriés les résultats, obtenus avec le logiciel ValidR-Assay,²⁴⁶ d'exactitudes et de précisions calculés pour les 4 points de validations.

Tableau 37 : Estimation de la justesse, de la fidélité intermédiaire et du recouvrement de la méthode d'analyse

C (mM)	C _{moyenne-recalculée} (mM)	Erreur (%)	Recouvrement (%)	CV répétabilité (%)	CV précision intermédiaire (%)	Basse limite de tolérance (%)	Haute limite de tolérance (%)
0,06	0,0594	-0,93	99,07	1,88	2,47	-4,98	3,12
0,18	0,1770	-1,64	98,36	0,97	0,97	-3,08	-0,20
0,42	0,4226	0,62	100,62	0,51	1,22	-1,76	3,00
1,26	1,2744	1,14	101,14	0,28	0,53	0,16	2,12

Nous pouvons remarquer que les valeurs recalculées des concentrations sont proches des valeurs des solutions préparées et que le taux de recouvrement est proche de 100%. Sur la Figure 145 est illustré le profil de précision obtenu par le logiciel.²⁴⁶ L'intervalle de tolérance β (courbes en bleus), tracé à partir des limites de tolérances basses et hautes, est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$.

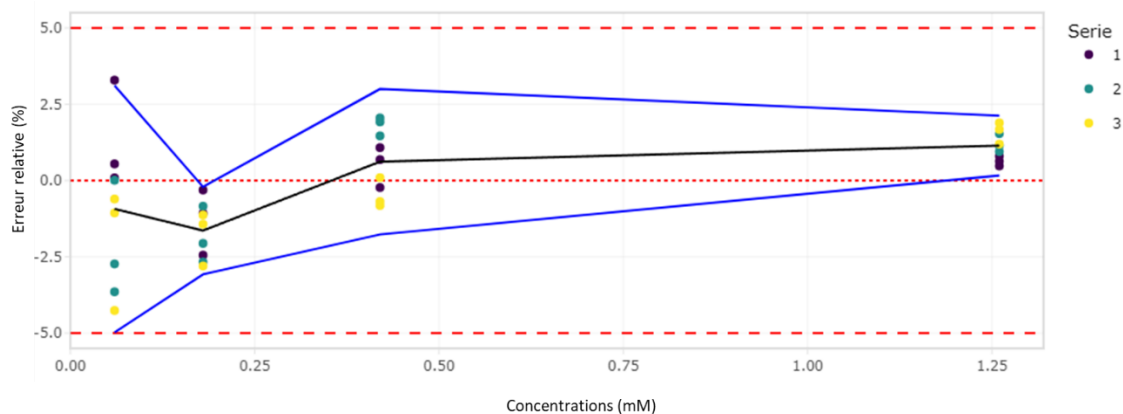


Figure 145 : Profil d'exactitude (en rouge : limites d'acceptations ; en bleu : intervalles de tolérance)

Ainsi, la **méthode analytique** que nous avons développée est **validée** en termes de linéarité des courbes de réponse, de fidélité intermédiaire et de justesse ce qui nous a permis de **doser le ténofovir**, de façon exacte durant les différentes étapes de la conception d'un MIP.

Partie A : Synthèse de divers MIPs par polymérisation par précipitation

Dans un premier temps, nous avons décidé de développer un polymère à empreintes moléculaires par polymérisation par précipitation (cf. Chapitre 3). Il nous a fallu en amont déterminer le solvant de polymérisation, ou porogène, et les monomères.

1. Choix du solvant

Dans la polymérisation par précipitation, le choix du solvant ou d'un mélange de solvant est crucial. En effet, le solvant doit permettre de solubiliser les monomères fonctionnels, le réticulant ainsi que la molécule empreinte. De plus, en vue d'une utilisation thérapeutique du polymère à empreintes moléculaires formé, ce ou ces solvants doivent être les moins toxiques possibles. Cependant, en utilisant la méthode par précipitation et dans l'objectif d'obtenir des nanoparticules monodispersées, le choix du solvant devient restreint. L'acétonitrile pur ou en mélange, généralement avec le toluène, est le porogène le plus couramment utilisé dans le cadre de la synthèse de nanoparticules sphériques par polymérisation par précipitation.¹⁹³ Son emploi dans l'impression moléculaire par approche non covalente est intéressant car il s'agit d'un solvant polaire aprotique qui va donc favoriser les liaisons de type « liaison hydrogène » entre la molécule empreinte et les monomères fonctionnels. Malheureusement, du fait de ces caractéristiques physico-chimiques et en particulier son coefficient de partage octanol-eau ou Log P de -1,6,²⁴⁷ le ténofovir, composé utilisé comme molécule empreinte, n'est pas soluble dans ce solvant.

Pour contourner le problème de solubilisation du template trois possibilité s'offrent à nous :

- ✓ L'utilisation d'eau comme solvant porogène permettant de solubiliser le ténofovir mais défavorisant grandement les interactions de type « liaison hydrogène »
- ✓ L'utilisation d'un « dummy-template » soluble dans 100% d'acétonitrile
- ✓ L'utilisation d'un mélange binaire ACN/H₂O

²⁴⁷ De Lastours, V.; Fonsart, J.; Burlacu, R.; Gourmel, B.; Molina, J.-M. Concentrations of Tenofovir and Emtricitabine in Saliva: Implications for Preexposure Prophylaxis of Oral HIV Acquisition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4905–4907.

Des tests de solubilité ont montré que dans un mélange ACN/H₂O (1/1, v/v) notre template montrait une solubilité de 2 mM. Au-delà de 50% en volume d'acétonitrile dans le mélange binaire, la solubilité du ténofovir devient extrêmement faible. Or, la synthèse de particules imprimées par polymérisation par précipitation dans un mélange solubilisant seulement 2 mM de template ne permet pas d'obtenir une masse de MIP suffisante par lot pour réaliser toutes les caractérisations du polymère. De plus, un mélange binaire de solvants porogènes contenant 50% d'eau en volume, et même moins, en volume amène à la synthèse de particules irrégulières, peu poreuses et agrégées. Cela est en accord avec les travaux de Kong *et al.*²⁴⁸ qui ont montré qu'un mélange éthanol/eau permet d'obtenir, par polymérisation par précipitation, des nanoparticules sphériques pour une teneur en eau inférieure à 12%. Le pourcentage en eau (solvant polaire protique) permet aussi d'augmenter la solubilité du ténofovir dans le mélange initial avant polymérisation mais défavorise les interactions intermoléculaires non covalentes recherchées de type liaisons hydrogène principalement. En effet, c'est la composante δ_H des paramètres de solubilité d'Hansen, représentant le poids de la liaison hydrogène dans le phénomène de solubilisation décrit par Hansen, qui évolue fortement dans le mélange acétonitrile/eau avec l'augmentation du pourcentage d'eau (Figure 146).

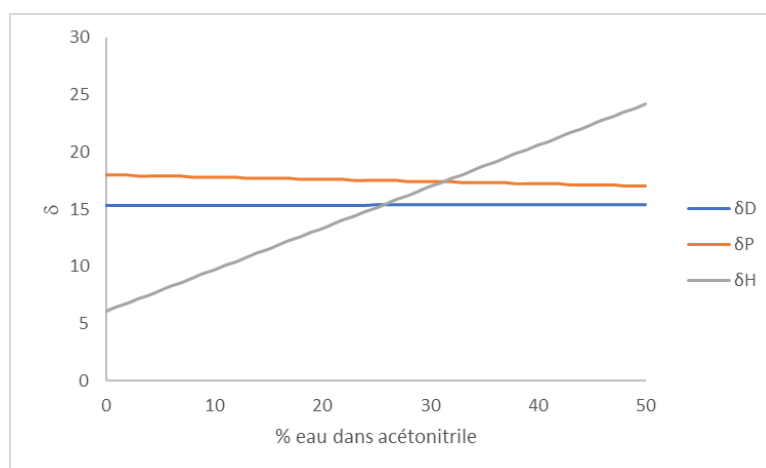


Figure 146 : Evolution des paramètres de solubilité de Hansen en fonction du pourcentage d'eau dans un mélange acétonitrile/eau¹⁹⁶

La seconde possibilité pour augmenter la solubilisation du ténofovir dans un solvant polaire aprotique est d'augmenter l'apolarité de ce template par la création d'une paire d'ions. La fonction phosphonate qui porte, sur une très grande partie du spectre des valeurs de pH, une voire deux charges négatives, peut former une paire d'ions avec une molécule présentant une fonction basique. La solubilité de cet « ensemble de molécules associées » par interaction intermoléculaire de type électrostatique augmente drastiquement dans un mélange de solvants porogènes dont la quantité d'eau est très limitée. Concrètement, l'utilisation d'un équivalent d'un monomère possédant une fonction amine

²⁴⁸Kong, X. Z.; Gu, X. L.; Zhu, X.; Zhang, L. Precipitation Polymerization in Ethanol and Ethanol/Water to Prepare Uniform Microspheres of Poly(TMPTA-styrene). *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 909–914.

primaire ou secondaire a permis de solubiliser le ténofovir dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) (Figure 147), mélange où le solvant polaire protique est apporté à la portion minimale permettant la solubilité de la paire d'ions formée.

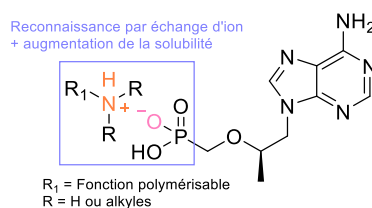


Figure 147 : Interactions de type échange d'ion entre le ténofovir et un monomère possédant une fonction amine

Parmi les différents monomères commerciaux à notre disposition (Figure 148), seules les molécules méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle (DMAEM) **97** et l'allylamine **96** (encadrés en rouge) ont été retenues, en raison de leur capacité à solubiliser efficacement notre template dans le mélange binaire choisi.

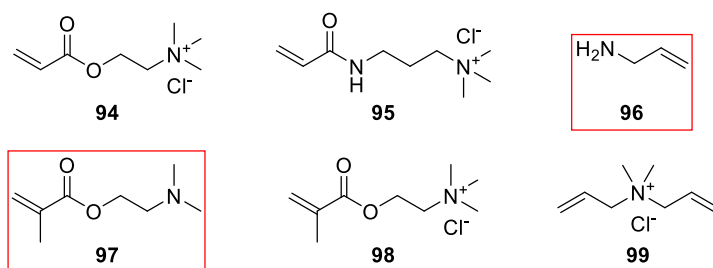


Figure 148 : Monomères commerciaux envisageables possédant une fonction amine : 2-(acryloyloxy)éthyl triméthylammonium chloride (**94**) ; 3-(acrylamidopropyl) triméthylammonium chloride (**95**) ; allylamine (**96**) ; 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate (**97**) ; 2-(méthacryloyloxy)éthyl triméthylammonium chloride (**98**) ; diallyldiméthylammonium chloride (**99**)

Avec les monomères présents sous forme de sels de chlorure, la solubilisation du ténofovir a été envisagée mais un trouble de la solution a systématiquement été observé. Afin de déterminer l'influence du contre-ion du composé ammonium, des essais de solubilité du ténofovir dans l'acétonitrile avec différents sels de tétrabutylammonium ont été effectués (Tableau 38).

Tableau 38 : Impact des contre-ions de différents agents de paire d'ions sur la solubilité du ténofovir dans l'acétonitrile

Solvants	Sels	Solubilité du Ténofovir
DCM	[NBu ₄] ⁺ Ac ⁻	Soluble
ACN	[NBu ₄] ⁺ Ac ⁻	Soluble
ACN	[NBu ₄] ⁺ OH ⁻	Soluble
ACN	[NBu ₄] ⁺ Cl ⁻	Insoluble

L'analyse de ces résultats montre que le type de contre-ion associé à nos monomères ammonium pouvait être responsable de l'insolubilité de la paire d'ions monomère - ténofovir dans l'acétonitrile. Nous avons alors décidé d'utiliser les deux monomères neutres commercialement disponibles tout en

utilisant un mélange porogène constitué d'acétonitrile avec un faible pourcentage d'eau afin de favoriser l'échange de proton entre la fonction phosphonate du ténofovir et le monomère basique. L'utilisation d'une résine échangeuse d'ions hydroxyles contre les ions chlorure d'un monomère de type ammonium aurait pu être envisagée mais rajoutait une étape supplémentaire de traitement du monomère commercial.

Après avoir trouvé ce premier complexe de pré-polymérisation, soluble dans notre mélange binaire, nous avons cherché un second monomère permettant, par des interactions intermoléculaires de type liaisons hydrogène avec le template, de reconnaître de façon sélective la base purique du ténofovir. Pour cela des monomères commerciaux ou synthétisés au laboratoire ont été étudiés.

2. Choix des monomères reconnaissant l'adénine du ténofovir

2.1. Monomères commerciaux

Afin de reconnaître la nucléobase du ténofovir, nous nous sommes tout d'abord orientés sur des monomères disponibles commercialement et ayant déjà montré leur capacité de reconnaissance de l'adénine, qui sont l'acrylamide et l'acide méthacrylique. Ces deux monomères ont déjà été utilisés, par notre équipe, pour la conception de MIPs sélectifs de (ribo)nucléosides.^{146,162}

Nous avons également sélectionné le diallyle *isocyanurate* **100** au vu de sa ressemblance structurale avec les bases thymine et uracile. En effet, le composé **100** possède les mêmes fonctionnalités accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène que les bases pyrimidiques (représentées en rouge sur la Figure 149), pouvant créer des interactions avec l'adénine.

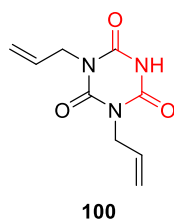


Figure 149 : Structure du diallyle *isocyanurate*

Pour mimer le plus fidèlement possible les interactions de type Watson-Crick, nous avons également décidé de nous diriger vers la synthèse d'analogues d'uracile *N1*-acylé avec une fonction acrylate.

2.2. Synthèse des analogues *N1*-(méth)acrylamide uracile

L'un des problèmes majeurs dans la synthèse d'analogues de bases nucléiques concerne leur insolubilité dans les solvants organiques. L'ajout de groupements silylés sur les oxygènes des bases pyrimidiques permet de les rendre solubles dans les solvants organiques, en particulier dans

l'acétonitrile ou le 1,2-dichloroéthane, et d'augmenter leur nucléophilie.²⁴⁹ Historiquement, la silylation des bases nucléiques est réalisée à partir de l'hexaméthylidisilazane (HMDS) et nécessite une co-distillation pour obtenir le dérivé silylé. L'utilisation du *N,O*-Bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) permet de préparer des composés silylés *in situ* et de s'affranchir des étapes d'évaporation et de redissolution.²⁵⁰

Ainsi, les intermédiaires **103** et **104** ont été obtenus à partir de l'uracile **101** et de la thymine **102** respectivement, par réaction avec le BSA dans l'acétonitrile à température ambiante pendant une dizaine de minute, permettant leur solubilisation totale. Ces intermédiaires silylés ont ensuite été engagés dans une réaction de *N*-acylation dans l'acétonitrile avec le chlorure d'acryloyle **105** ou le chlorure de méthacryloyle **106** à -40 °C pendant 16 h formant les composés *N1*-acylé **107**, **108** et **109** avec des rendements d'environ 50%(Schéma 18). La réaction à basse température permet de favoriser l'obtention du produit monosubstitué vis-à-vis du di-substitué qui a été observé majoritairement à température ambiante et à reflux dans le DMF ou l'acétonitrile.

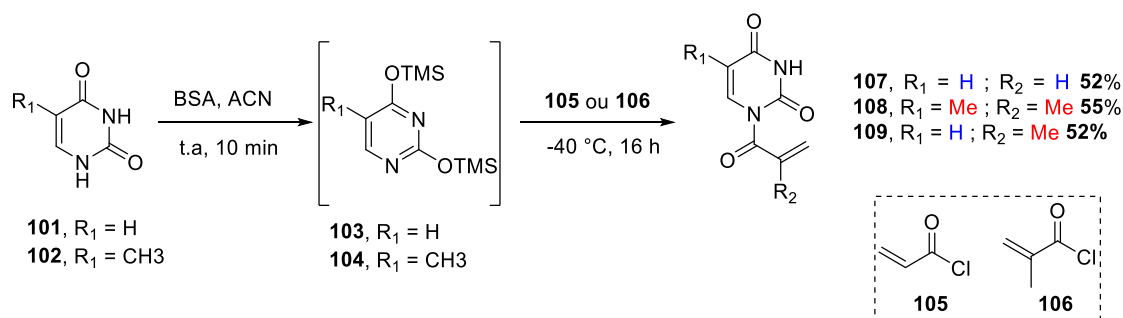


Schéma 18 : Synthèse des dérivés uraciles *N1*-acylés

Une analyse RMN HMBC (couplage ¹H - ¹³C) permet de confirmer la mono-acylation en position *N1* de nos dérivés de l'uracile. Pour exemple, le spectre HMBC du *N1*-méthacrylamide thymine **108** (Figure 150) permet d'observer une corrélation entre le proton H6 de la thymine et le carbonyle de la fonction acrylate, traduisant l'introduction du groupement méthacrylate en position *N1*. Une analyse identique a été effectuée pour les composés **107** et **109**.

²⁴⁹ Niedballa, U.; Vorbrueggen, H. Synthesis of Nucleosides. 9. General Synthesis of N-Glycosides. I. Synthesis of Pyrimidine Nucleosides. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3654–3660.

²⁵⁰ Vorbrüggen, H.; Lagoja, I. M.; Herdewijn, P. Synthesis of Ribonucleosides by Condensation Using Trimethylsilyl Triflate. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2006**, *27*.

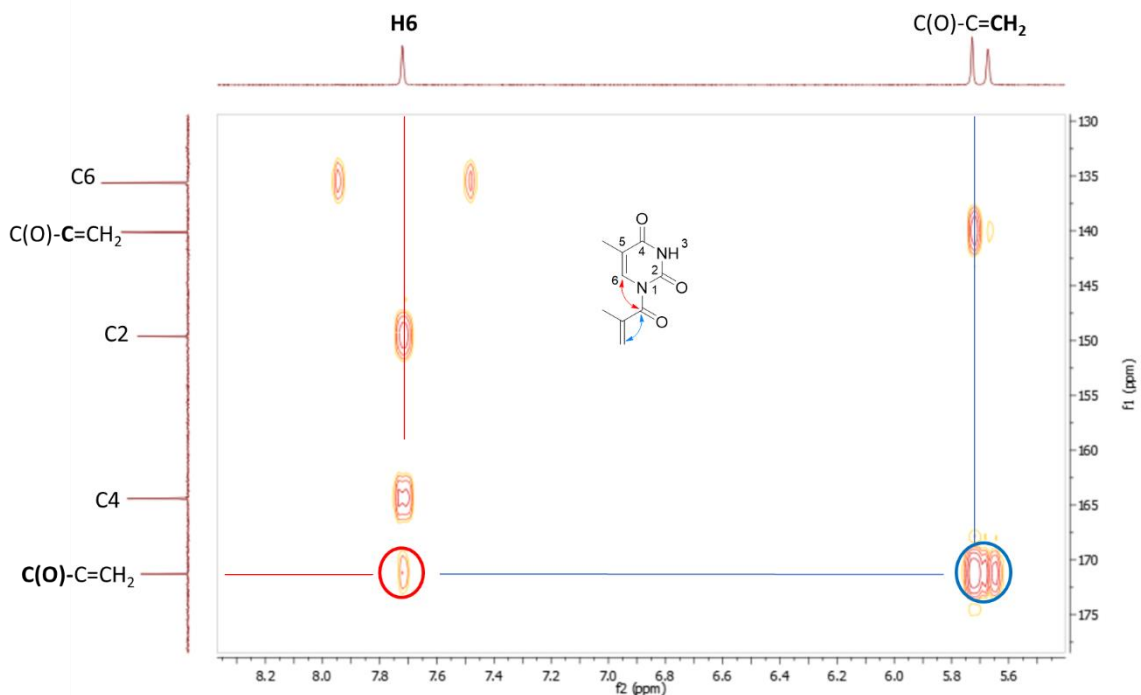


Figure 150 : Corrélation HMBC du composé 108 dans le DMSO-d6

Ces composés ont été synthétisés avec l'objectif de les utiliser comme monomères pour la reconnaissance de la partie adénine du ténofovir selon les interactions montrées sur la Figure 151. Comme mentionné au début de ce chapitre, cet assemblage naturellement stœchiométrique donnera un complexe template : monomère de type 1 : 1 qui a déjà montré son efficacité dans la reconnaissance de dérivés nucléosidiques. En effet, dans notre équipe, ce ratio a été mis en évidence par une titration ^1H -RMN ainsi que par modélisation moléculaire entre la base de la ribavirine qui peut s'apparenter à un mime de l'adénine, et les monomères fonctionnels.¹⁷⁷ De plus, comme décrit dans la littérature, cette complémentarité de base, *via* la *N1*-(vinylbenzyl)thymine, a été utilisée récemment dans la conception de deux polymères à empreintes moléculaires par B. Tse Sum Bui *et al.*²⁴¹ en 2017, pour l'adénosine-monophosphate, et J. Pan en 2022 *et al.*²⁵¹ pour la 2'-déoxyadénosine.

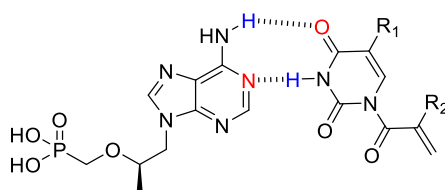


Figure 151 : Représentation de la complémentarité entre l'adénine du ténofovir et les monomères fonctionnels dérivés d'uracile en utilisant une complexation 1 : 1 (T : M).

²⁵¹ Wei, Z.; Wang, P.; Tian, X.; Sun, W.; Pan, J. Imprinted Polymer Beads Featuring Both Predefined Multiple-Point Interaction and Accessible Binding Sites for Precise Recognition of 2'-Deoxyadenosine. *Sep. Purif. Technol.* **2022**, *302*, 122048.

Une fois les monomères choisis, une étude préliminaire a été réalisée afin de s'assurer de l'influence de la nature du solvant sur la formation de particules sphériques.

3. Comparaison des solvants de synthèse ou porogènes

Afin de vérifier l'influence du solvant sur les polymérisations par précipitation, et avant d'envisager le développement de MIP reconnaissant le ténofovir, nous avons synthétisé trois polymères différents. Tout d'abord, nous avons sélectionné l'eau, qui est un solvant biocompatible permettant de solubiliser le ténofovir. Nous avons également choisi l'ACN qui est le solvant de prédilection pour la polymérisation par précipitation, qui sera utilisé pour la synthèse avec « dummy-template » (cf. paragraphe 0). Enfin, nous avons voulu vérifier la morphologie des particules obtenues par notre mélange ACN/H₂O (9/1, v/v), permettant de solubiliser le ténofovir. Cette étude étant basée sur la morphologie des particules obtenues, nous avons seulement synthétisé uniquement les matériaux non imprimés, en utilisant des monomères et réticulant pouvant être, par la suite, utilisés dans la synthèse d'un MIP reconnaissant le ténofovir.

➤ 100% d'eau

De fait, le choix des monomères s'est porté sur l'acrylamide **110** car ce petit monomère est très soluble dans l'eau (>100 mg/mL à 22 °C).²⁵² Le réticulant associé est la *N,N'*-méthylènebis(acrylamide) **111** possédant la faculté d'être assez soluble dans l'eau (7 mg/mL à 25 °C)²⁵³ et appartenant à la même famille chimique que l'acrylamide.

➤ 100% d'acétonitrile

Dans ces conditions, nous avons choisi le composé **108**, *N1*-méthacryloyle thymine, comme monomère et le 1-(acryloyloxy)-3-(méthacryloyloxy)-2-propanol (AMAP) **112** comme réticulant, car il comporte une fonctionnalité alcool qui apporterait une certaine l'hydrophilie au polymère final.

➤ Mélange binaire ACN/H₂O (9/1, v/v)

Pour le mélange binaire ACN/H₂O (9/1, v/v), nous avons utilisé la *N1*-méthacryloyle uracile **109** et le DMAEM **97**. Le choix du réticulant s'est porté sur l'EGDMA **113**, composé apolaire et soluble dans le mélange binaire porogène, afin d'apporter une rigidité très marquée à notre polymère.

Les structures des différents monomères et réticulants utilisés sont représentées ci-après (Figure 152), et les conditions de synthèse de ces trois polymères sont répertoriées dans le Tableau 39. Le volume de solvant est calculé pour obtenir une concentration des monomères et réticulants de 2% en masse par rapport au volume total.

²⁵² Keith, L. H.; Walters, D. B. *National Toxicology Program's Chemical Solubility Compendium*, 1st edition; CRC Press, 2019.

²⁵³ ChemSpider. https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7750.html?rid=aed77dd2-cd3e-4ea2-8693-eb51b5a27174&page_num=0 (accessed 2024-01-31)

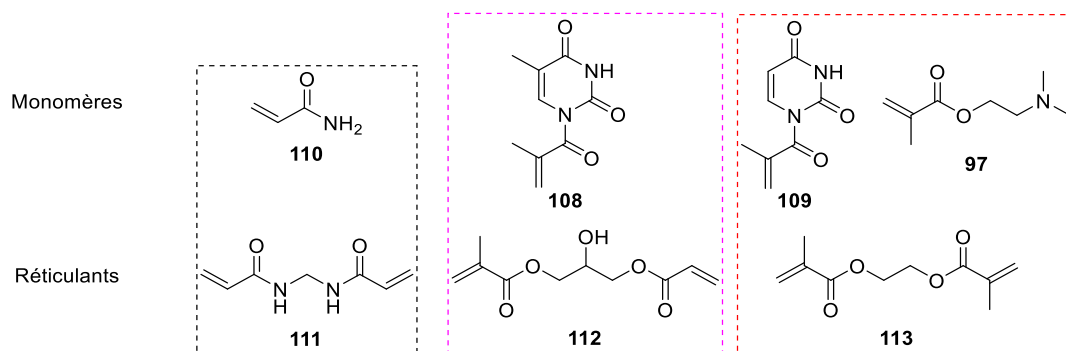


Figure 152 : Monomères et réticulants utilisés pour la synthèse des polymères dans 100% H₂O (encadré noirs), dans 100% ACN (encadré roses), dans ACN/H₂O (encadré rouges)

Tableau 39 : Récapitulatif des formulations des polymères et résultats morphologiques en fonction du porogène utilisé

Polymères	Monomères	Réticulants	Initiateurs	Solvants	Morphologie
Polym-1	110 27 mg (4 éq.)	111 297 mg (20 éq.)	APS 6 mg	100% H₂O (32 mL)	Agglomérats
Polym-2	108 19 mg (1 éq.)	112 331 µL (12 éq.)	AIBN 5 mg	100% ACN (35 mL)	Sphériques monodispersées
Polym-3	109 31 mg (1 éq.) 97 29 µL (1 éq.)	113 690 µL 20 (éq.)	AIBN 5 mg	ACN (90%) (67mL) H₂O (10%) (7 mL)	Sphériques polydispersées

Une fois les polymérisations réalisées (cf. partie expérimentale 3) les matériaux obtenus ont été analysés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) par la plateforme MACLE-CLV (Campus CRNS- Université d'Orléans) (Figure 153).

Contrairement aux autres conditions, la synthèse effectuée dans 100% d'eau a conduit à l'obtention d'agglomérats. Cela permet de mettre en évidence que l'eau seule n'est pas un porogène amenant à la formation de nanoparticules sphériques, ce qui est cohérent avec la littérature. En effet, il a déjà été rapporté que la polymérisation par précipitation dans des solvants polaires protiques, comme l'éthanol ou le méthanol, ne conduit pas, en comparaison à l'acétonitrile, à des particules sphériques.²⁰³

Comme anticipé, la synthèse dans l'acétonitrile conduit à la formation de nanoparticules sphériques monodispersées. Notre mélange porogène binaire composé majoritairement d'acétonitrile permet, quant à lui, d'obtenir des nanoparticules sphériques de tailles variables. Ce mélange permet d'envisager la synthèse d'un polymère imprimé dans ces conditions, bien que l'acétonitrile pur reste

le meilleur solvant. Cependant, l'utilisation de ce dernier est limitée du fait de la très faible solubilité du ténofovir, utilisé comme template au cours de la synthèse des MIPs.

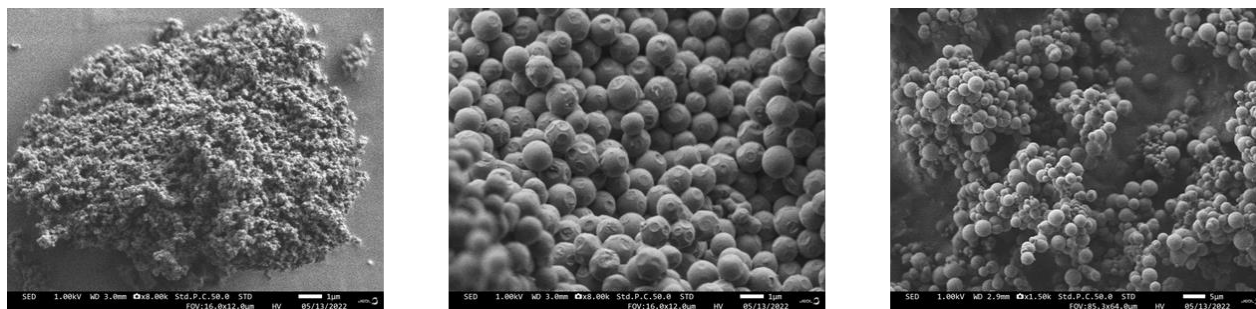


Figure 153 : Analyse microscopique des polymères synthétisés dans différents solvants (A gauche : 100% H₂O, au milieu : 100% ACN et à droite : mélange binaire ACN/H₂O)

Lors de l'analyse par HPLC-UV du surnageant de synthèse du Polym-3, un composé très polaire (temps de rétention < 1,5 min) est apparu sur le chromatogramme présentant une longueur d'onde maximale d'absorbance à 260 nm. Ce composé ne peut provenir que de notre monomère, le *N1*-méthacryloyle uracile **109**, car, ce composé polaire montre un spectre UV identique à une nucléobase de type pyrimidique. L'injection d'uracile **101** pur en solution aqueuse a montré un temps de rétention et un spectre UV identiques au composé inconnu. Afin de confirmer l'hypothèse de l'hydrolyse du composé **109**, celui-ci est mis en présence d'eau. Le chromatogramme de cette solution (Figure 154), réalisé une minute après la solubilisation, montre la présence de l'uracile **101** et de l'acide méthacrylique **114** et confirme l'hydrolyse du composé **109**.

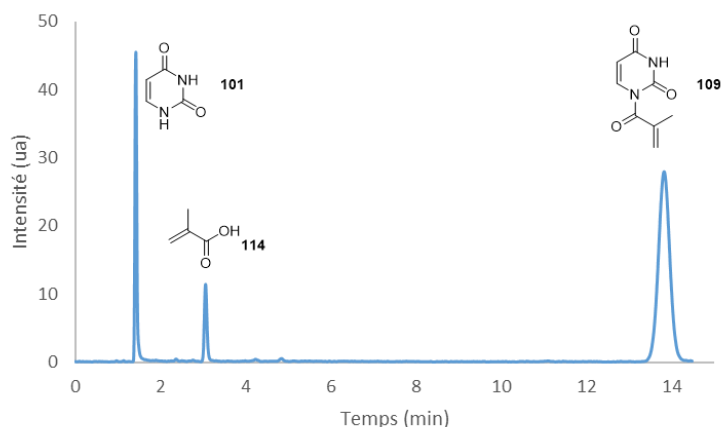


Figure 154 : Chromatogramme d'une solution d'uracile méthacrylate dans 100% d'eau à t = 1 min (210 nm)

L'utilisation de ce type de monomères n'est donc pas compatible avec un solvant porogène contenant de l'eau. En effet, la synthèse d'un MIP passe par la formation plus ou moins lente d'un complexe de pré-polymérisation, qui est d'environ 4 h. Au bout de ce temps l'uracile acrylate serait donc hydrolysée et la reconnaissance ne s'effectuerait plus que selon un point d'ancrage *via* la fonction phosphonate.

Ainsi, **les analyses microscopiques** ont permis de confirmer que notre mélange composé à 90% d'acétonitrile et à 10% d'eau, conduisant à des particules sphériques, était **compatible avec la**

polymérisation par précipitation. De cette manière, en conservant ce mélange, d'autres monomères et conditions de polymérisation ont été étudiés pour la reconnaissance du ténofovir. Nous avons décidé par la suite de synthétiser des dérivés de l'uracile présentant une fonction acrylate en insérant un espaceur éthyle, non hydrolysable, entre la base pyrimidique et la fonction polymérisable.

4. Synthèse du dérivés *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine

Dans le but de rendre les purifications aisées et d'éviter la di-substitution des positions *N1* et *N3*, cette dernière est sélectivement protégée par un groupement benzoyle.²⁵⁴

Pour obtenir le dérivé *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine **119**, la thymine **102** est tout d'abord dibenzoylé en *N1* et *N3* par l'utilisation d'un excès de chlorure de benzoyle dans un mélange ACN/pyridine pour former l'intermédiaire **115**. Un traitement basique, par une solution de carbonate de potassium dans le 1,4-dioxane à 70 °C pendant 2 h, permet de déprotéger sélectivement la position *N1* et d'obtenir le composé *N3*-benzoylé **116** (Schéma 19).

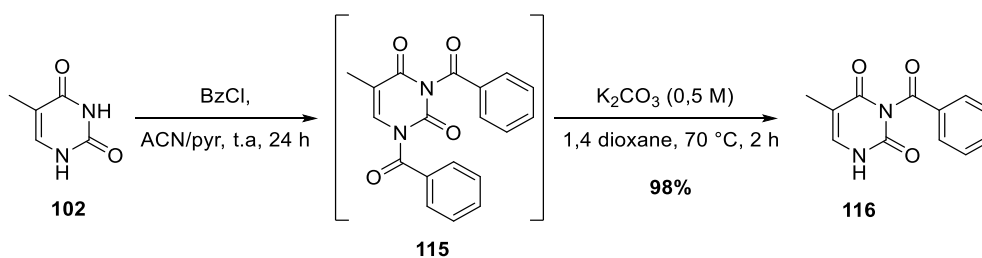


Schéma 19 : *N3*-Benzoylation de la thymine

L'analyse HMBC ne présente aucune corrélation entre l'hydrogène H6 et le carbonyle du groupement benzoyle (Figure 155) permettant de vérifier que le groupement benzoyle a bien été introduit en position *N3*.

²⁵⁴ Frieden, M.; Giraud, M.; Reese, C. B.; Song, Q. Synthesis of 1-[Cis-3-(Hydroxymethyl)Cyclobutyl]-Uracil, -Thymine and -Cytosine. *J. Chem. Soc.* **1998**, 1, 2827–2832.

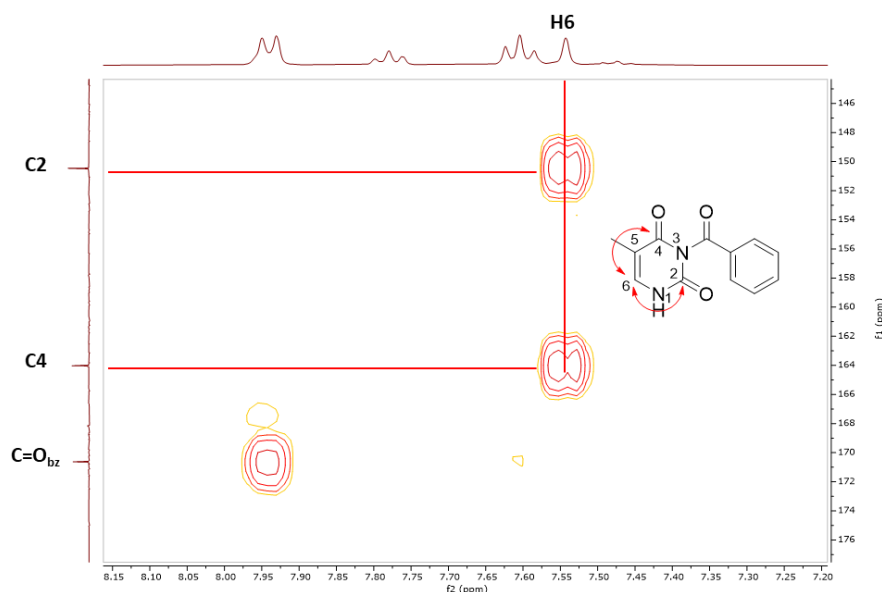


Figure 155 : Corrélation Cosy dans le DMSO-d₆ du composé **116**

En se basant sur les conditions développées par Kitamura *et al.*²⁵⁵, la *N3*-benzoyl thymine est engagée dans une réaction de *N*-alkylation en présence de 2-bromoéthanol et de bicarbonate de potassium dans le DMF à température ambiante pendant 2 jours. L'intermédiaire **117** est obtenu avec un rendement de 65%. La déprotection du groupement benzoyl en position *N3* par traitement au méthanolate d'ammonium a permis l'obtention du composé **118**, *N1*-(2-hydroxyéthyl)thymine, avec un rendement de 88%. L'analyse HMBC (Annexe 8) nous confirme que le groupement hydroxyéthyle est bien en position *N1*. Ce composé est ensuite engagé dans une réaction d'estérification, avec le chlorure de méthacryloyle **106** en présence de triéthylamine dans le THF à température ambiante pendant 18 h,²⁵⁶ permettant d'obtenir le composé **119**, *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine.

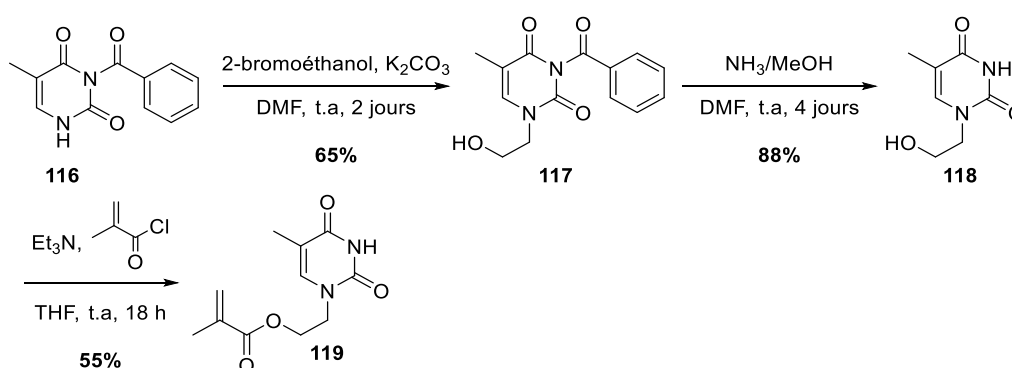


Figure 156 : Synthèse du composé *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine **119**

²⁵⁵ Kitamura, Y.; Nagaya, Y.; Ohshima, Y.; Kato, D.; Ohguchi, A.; Katagiri, H.; Ikeda, M.; Kitade, Y. Novel Ring Transformation of Uracils to 2-Oxazolidinones. *Heterocycles*. **2020**, *100*, 622.

²⁵⁶ Moore, D.; Dobelmann-Mara, L.; Hahnebach, S.; Hofmann, P.; Schraub, M. Ophthalmic device comprising polymerizable compounds containing photoactive chromophore, preparation process and process of changing optical properties of ophthalmic device. WO2022012798 A1, 2022.

Ce monomère répond donc idéalement à toutes nos attentes en possédant une fonction acrylate non hydrolysable, polymérisable et une nucléobase pouvant s'associer à l'adénine du ténofovir selon les mêmes interactions que sur la Figure 151.

5. Synthèses des polymères à empreintes moléculaires dans le mélange ACN/H₂O

5.1. Choix du ratio monomère : template pour l'interaction échange d'ions

Comme mentionné dans le paragraphe 1 de la partie A, une formation de paire d'ions est nécessaire pour solubiliser le ténofovir dans un mélange binaire ACN/H₂O (Figure 157).

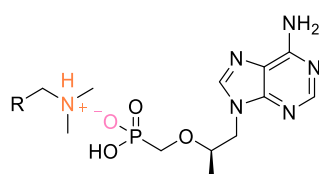


Figure 157 : Interaction de type électrostatique

Concernant l'interaction électrostatique mise en jeu, le ratio template : monomère (T : M) sera de 1 : 1. En effet, selon le logiciel Marvin Sketch® (cf. Figure 139), le ténofovir est présent à 97% sous la forme mono-chargée au pH 6,4 (eau ultra pure), et nécessite donc un équivalent du monomère amine pour créer la paire d'ions souhaitée. Les monomères DMAEM **97** et allyle amine **96** possédant un pKa de 8,42 et de 9,66, respectivement, sont présents à plus de 99% sous leur forme protonée à pH 6,4.

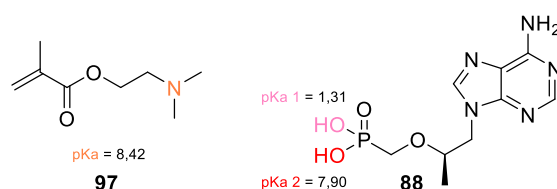


Figure 158 : Rappels des pKa du ténofovir et des monomères **94** et **95** estimé par le logiciel Marvin Sketch®

Ceci a été observé expérimentalement par différents essais de solubilisation :

- ✓ Dans 100% d'ACN, le ténofovir n'est pas soluble même après un ajout d'un équivalent de monomère amine
- ✓ Dans le mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) le ténofovir n'est pas soluble même avec un équivalent de monomère amine.
- ✓ La solubilisation du ténofovir est initialement effectuée dans de l'eau en ajoutant 1 équivalent d'amine, puis l'acétonitrile est ajouté jusqu'à obtenir le mélange volumique à 90/10 ACN/H₂O. La paire d'ion formée reste soluble après ajout de l'acétonitrile. L'ajout d'un nombre

d'équivalent du monomère inférieur à 1 ne permet pas la solubilisation complète du Ténofovir dans le mélange ACN/H₂O (9/1, v/v).

D'après Deleebeeck *et al.*²⁵⁷ le pH d'une solution aqueuse semble augmenter proportionnellement au pourcentage d'acétonitrile ajouté (Figure 159). D'après la figure ci-dessous, le pH de notre mélange utilisé pour la polymérisation est situé entre 8 et 9, valeur supérieure à celle du pH de l'eau pure qui est de 6,4.

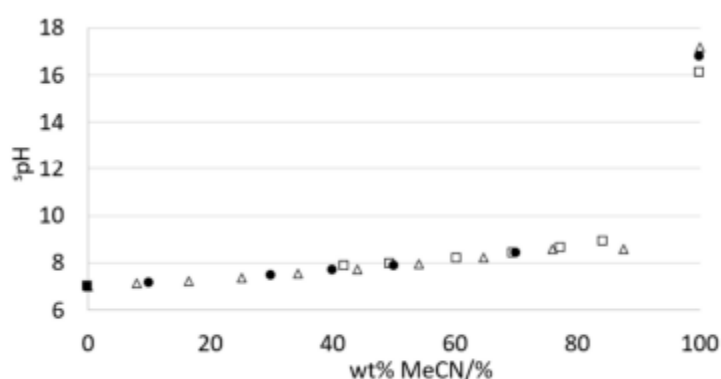


Figure 159 : Valeur théorique du pH d'un mélange binaire eau/acétonitrile en fonction du pourcentage d'acétonitrile (adapté de Deleebeeck *et al.*²⁵⁷)

Il a été montré que le pKa d'un acide augmente proportionnellement à la proportion d'acétonitrile, atteignant une différence de trois unités à 70% d'acétonitrile.²⁵⁸ Ainsi en considérant le phosphonate libre comme un acide, nous pouvons admettre que le pKa 1 du ténofovir passerait de 1,31 à environ 4 et que le pKa 2 augmenterait de 7,90 à environ 11. Ainsi, dans notre mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) le ténofovir resterait mono-chargé.

Il a également été montré que le pKa de différentes amines dérivées de la pyridine diminue linéairement jusqu'à 60% d'acétonitrile en volume, pourcentage auquel le pKa minimal est atteint. La valeur du pKa augmente ensuite jusqu'à sa valeur maximale dans 100% d'acétonitrile.²⁵⁹ Pour une teneur de 90% en volume d'acétonitrile, le pKa de l'amine est proche de sa valeur initiale observée dans 100% d'eau. Ainsi dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v), le pH est proche du pKa et le monomère possédant une fonctionnalité amine est donc à 50% sous sa forme neutre ne permettant pas de solubiliser le ténofovir. Ces observations issues de la littérature expliquent donc l'insolubilité du Ténofovir, dans le mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) lorsque le monomère amine est ajouté en dernier.

²⁵⁷ Deleebeeck, L.; Snedden, A.; Nagy, D.; Szilágyi Nagyné, Z.; Roziková, M.; Vičarová, M.; *et al.* Unified pH Measurements of Ethanol, Methanol, and Acetonitrile, and Their Mixtures with Water. *Sensors*. **2021**, *21*, 3935.

²⁵⁸ Espinosa, S.; Bosch, E.; Rosés, M. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 5. pH Scales and the Retention of Acids and Bases with Acetonitrile–Water Mobile Phases. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5193–5200.

²⁵⁹ Espinosa, S.; Bosch, E.; Rosés, M. Acid–Base Constants of Neutral Bases in Acetonitrile–Water Mixtures. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *454*, 157–166.

A contrario, lorsque la paire d'ion est initialement créée dans l'eau et que l'acétonitrile est ajouté dans un second temps, le ténofovir est soluble. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la constante diélectrique du milieu diminue fortement en présence d'acétonitrile (Figure 160).²⁶⁰ A 90% d'ACN, celle-ci est d'environ 39 et n'est donc plus suffisante pour dissocier la paire d'ions créée dans 100% d'eau. Le complexe formé reste donc stable.

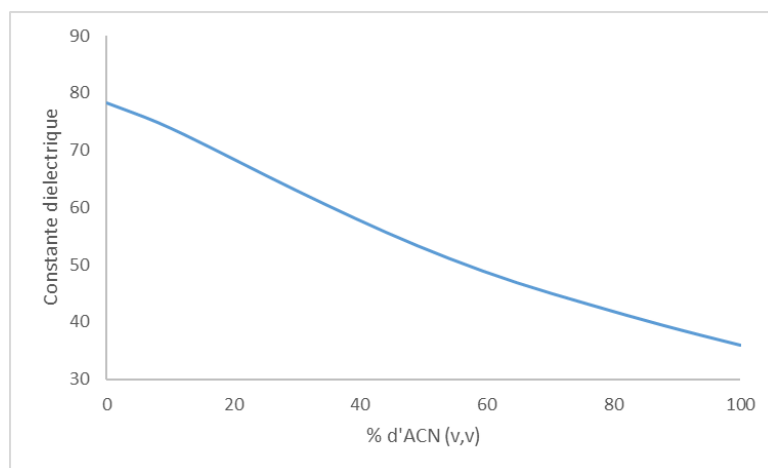


Figure 160 : Constante diélectrique de la solution en fonction du pourcentage d'acétonitrile dans l'eau à 25°C (adapté de Gagliardi *et al.*²⁶⁰)

5.2. Polymérisation avec des monomères de type allyle

Dans le cadre d'une polymérisation avec des monomères aux motifs allyles, l'allylamine est le monomère de choix pour solubiliser le ténofovir en jouant le rôle d'agent de paire d'ions avec le motif phosphonate. Nous avons aussi choisi d'utiliser un second monomère de type « allyle » pour générer la reconnaissance de la base, le diallyle isocyanurate (Figure 161). Il est préférable de choisir des monomères de même type ayant une cinétique de polymérisation identique.

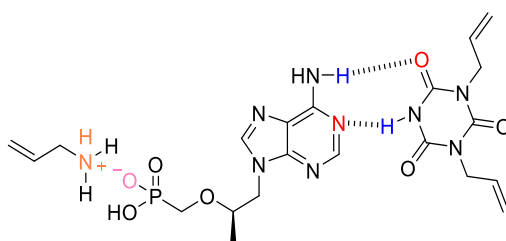


Figure 161 : Complexe de pré-polymérisation avec les monomères allyles

Le diallyle isocyanurate possède une double fonction car il joue à la fois le rôle de monomère, en raison de sa ressemblance structurale avec les nucléobases thymine et uracile, et de réticulant *via* ses deux fonctions allyles. Plusieurs essais de polymérisation ont été effectués :

²⁶⁰ Gagliardi, L. G.; Castells, C. B.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. Static Dielectric Constants of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye-Hückel A and $a_0 B$ Parameters for Activity Coefficients. *J. Chem. Eng. Data.* **2007**, *52*, 1103–1107.

Tableau 40 : Essais de polymérisation des allyles en faisant varier le réticulant

Polymère*	Ténofovir	Allylamine	Diallyle isocyanurate	Initiateur	Température
MIP	1 eq.	1 eq.	12 eq.	X	T (°C) d'activation des initiateurs
NIP					

* Toutes les synthèses ont été effectuées dans un mélange binaire ACN/H₂O (9/1, v/v)

Plusieurs initiateurs ont été utilisés pour déclencher la polymérisation par voie thermique (Figure 162) :

- Le 2,2'-azobis(isobutyronitrile) ou AIBN **120** est l'un des initiateurs les plus utilisés en polymérisation radicalaire (hydrophobe) ($t_{1/2}$ de 10 h à 65 °C dans le toluène).
- Le 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) ou ACPA (V-501) **121** est un initiateur hydrosoluble ($t_{1/2}$ de 10h à 69 °C dans l'eau).
- Le 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochloride ou VA-044 **122**, est un initiateur hydrosoluble utilisé pour polymériser des monomères vinyliques ($t_{1/2}$ de 10 h à 44 °C dans l'eau).
- L'ammonium persulfate **123**, ou APS, est un sel hydrosoluble pouvant être utilisé pour la polymérisation en solution aqueuse pour des températures comprises entre 70 °C et 90 °C.
- Le peroxyde de benzoyle **124** est l'un des peroxydes le plus utilisé pour initier la polymérisation des monomères allyles, dont la température d'utilisation est de 80 °C.

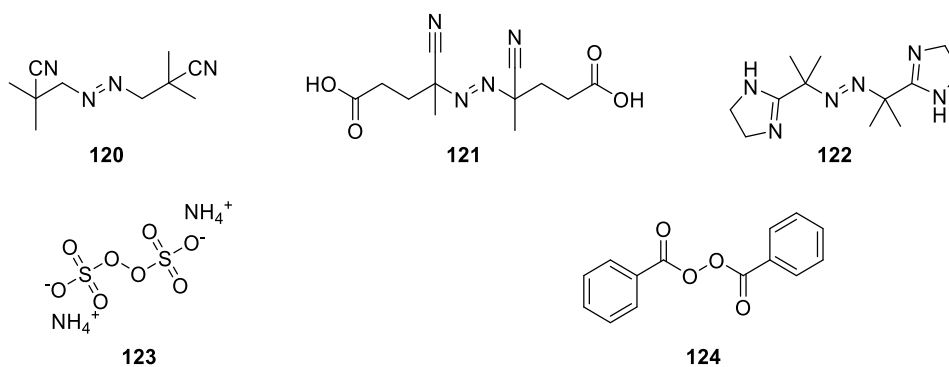


Figure 162 : Structures des différents initiateurs

Cependant aucun de ces initiateurs n'a permis la formation d'une matrice polymérique par précipitation, même après un temps de chauffage supérieur à 24 h. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la cinétique de polymérisation du diallyl isocyanurate est lente. En effet, Matsumoto *et al.*²⁶¹

²⁶¹ Matsumoto, A.; Watanabe, K.; Matsumoto, T.; Aota, H.; Hirabayashi, M.; Kameyama, A.; *et al.* Polymerization of Diallyl Alkyl Isocyanurates. *J. Macromol. Sci., Part A.* **1998**, *35*, 1889–1893.

ont rapporté que le taux de conversion de cinq dérivés diallyle alkyle *isocyanurates* est d'environ 20% au bout de 10 h de polymérisation (Figure 163).

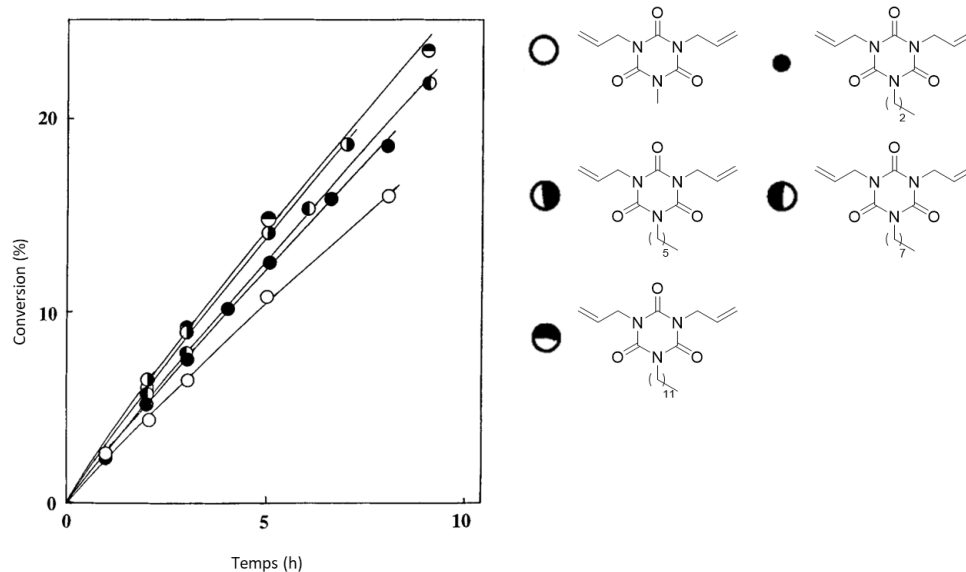


Figure 163 : Taux de conversion des monomères diallyle alkyle *isocyanurates* par polymérisation en bulk en utilisant 0,05 mol/L d'AIBN à 60 °C.²⁶¹

Nous avons donc réalisé un nouvel essai en conservant le diallyle *isocyanurate* comme monomère mais en ajoutant un nouveau composé ayant le rôle de réticulant. Nous avons choisi le 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione **125**, car il possède 3 fonctions polymérisables (Figure 164).

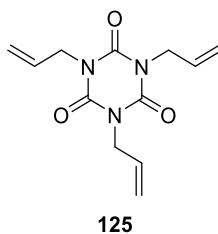


Figure 164 : Structure du 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione

En utilisant ce réticulant, nous portons ainsi à 6 les fonctions polymérisables dans la solution et nous espérons ainsi favoriser la polymérisation du complexe. Cependant, les tentatives de propagation de nos monomères après amorçage des fonctions allyles se sont révélées infructueuses. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ce réticulant n'est pas peut être pas adapté pour la polymérisation par précipitation car il semblerait qu'il « gélifie » dès que la polymérisation dépasse 12,4% de conversion.²⁶²

²⁶² Matsumoto, A.; Inoue, H.; Matsumoto, T.; Masayoshiwa; Kimura, T.; Saito, H. Comparison of Gelation in the Free-Radical Polymerization of Triallyl Isocyanurate and Its Isomer Triallyl Cyanurate. *J. Macromol. Sci., Part A.* **1989**, *26*, 1279–1289.

La polymérisation par précipitation de monomères et réticulants comportant des fonctionnalités allyles n'ayant pas abouti, nous avons décidé d'établir le même type de complexe de pré-polymérisation qu'envisagé précédemment (Figure 161) en utilisant des monomères de type acrylate. En effet, il est connu dans la littérature que la cinétique de propagation de chaînes acrylates est supérieure à celle des allyliques.²⁶³

5.3. Polymérisation avec des monomères de types acrylates

Dans le cadre d'une polymérisation avec des motifs de type acrylate, le DMAEM **97** est le monomère de choix pour solubiliser le ténofovir car il joue le rôle d'agent de paire d'ions interagissant avec le motif phosphonate. Ce monomère a été choisi pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il a déjà été utilisé dans notre équipe pour la reconnaissance du motif phosphate de l'adénosine 5'-monophosphate.²⁶⁴ En effet, il se distingue par sa capacité à former une interaction ionique avec le groupement phosphate des nucléotides, que ce soit dans l'eau ou dans le DMSO. De plus, il est faiblement toxique sous forme de polymère.²⁶⁵ Pour la reconnaissance de la base, nous avons opté pour 2 monomères différents, à savoir, l'acide méthacrylique **114** et le dérivé de la thymine **119** synthétisé dans le paragraphe 4.

5.3.1. Synthèse d'un polymère avec l'acide méthacrylique

Pour ce qui est de la reconnaissance de la base, nous avons opté pour l'acide méthacrylique, car celui-ci est grandement utilisé dans la conception de MIP-DDS¹⁸⁰ et a déjà fait ses preuves dans notre équipe en créant des MIPs sélectifs de (ribo)nucléosides.^{144,177} Pour le MAA **114**, dont la complexation avec la nucléobase adénine a déjà été montrée dans les années 90,²⁶⁶ le ratio template monomère sera choisi égal à 1 : 4. Ce ratio reste, à ce jour, le plus utilisé dans la littérature dans le cas de l'approche non covalente et conduit majoritairement à une sélectivité maximale des MIPs synthétisés.²⁶⁷ Par ailleurs, le véritable atout de ce monomère réside dans la fonction acide carboxylique qui agit à la fois en tant qu'accepteur et donneur de liaisons hydrogène.

Ainsi l'association du DMAEM **97** et de l'acide méthacrylique **114** va former le complexe de pré-polymérisation représenté sur la Figure 165.

²⁶³ Cruz-Aguilar, A.; Herrera-González, A. M.; Vázquez-García, R. A.; Navarro-Rodríguez, D.; Coreño, J. Synthesis of Acrylic and Allylic Bifunctional Cross-Linking Monomers Derived from PET Waste. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2013**, *45*, 012007.

²⁶⁴ Ayari, M. G.; Kadhivel, P.; Favetta, P.; Plano, B.; Dejous, C.; Carbonnier, B.; *et al.* Synthesis of Imprinted Hydrogel Microbeads by Inverse Pickering Emulsion to Controlled Release of Adenosine 5'-monophosphate. *Mater. Sci. Eng., C.* **2019**, *101*, 254–263.

²⁶⁵ Xu, F.-J.; Li, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Kang, E.-T.; Neoh, K.-G. Pentablock Copolymers of Poly(Ethylene Glycol), Poly((2-Dimethyl Amino)Ethyl Methacrylate) and Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) from Consecutive Atom Transfer Radical Polymerizations for Non-Viral Gene Delivery. *Biomaterials.* **2008**, *29*, 3023–3033.

²⁶⁶ Spivak, D. A.; Shea, K. J. Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers. *Macromolecules.* **1998**, *31*, 2160–2165.

²⁶⁷ Andersson, H. S.; Karlsson, J. G.; Piletsky, S. A.; Koch-Schmidt, A.-C.; Mosbach, K.; Nicholls, I. A. Study of the Nature of Recognition in Molecularly Imprinted Polymers, II. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *848*, 39–49.

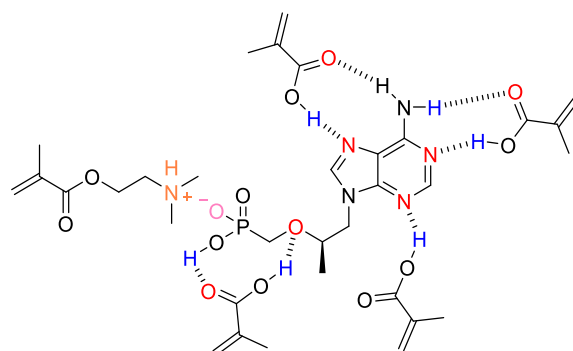


Figure 165 : Complexe de pré-polymérisation entre le ténofovir, le MAA et le DMAEM

Pour former le complexe de pré-polymérisation, le ténofovir et la DMAEM sont dans un premier temps solubilisés dans l'eau puis l'acétonitrile est ajouté jusqu'à obtenir un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v). Dans ces conditions, la paire d'ions reste soluble dans le milieu. Cependant, en ajoutant, ensuite, l'acide méthacrylique, un trouble est observé ne permettant, donc pas dans ces conditions de lancer la polymérisation. L'insolubilité du ténofovir après ajout du MAA peut potentiellement s'expliquer par un déplacement d'équilibre. En effet, bien que le ΔpK_a (ténofovir – DMAEM) = 7,11 soit supérieur au ΔpK_a (MAA – DMAEM) = 3,57, la présence de 4 équivalents de MMA peut suffire à créer un déplacement d'équilibre (Figure 166). L'acide méthacrylique vient interagir préférentiellement avec la DMAEM et casse ainsi la paire d'ions créée initialement entre le ténofovir et la DMAEM. Le ténofovir se retrouve relargué du complexe et le reste des MAA dans la solution ne permet pas de le solubiliser dans le milieu porogène.

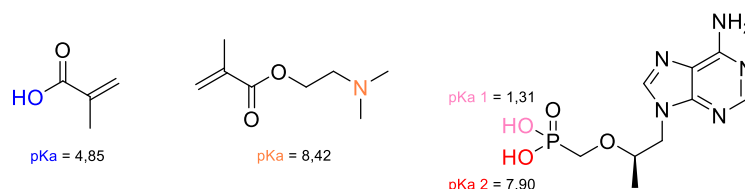


Figure 166 : Estimation des pKa par le logiciel Marvin Sketch®

Ainsi, dans ces conditions, où nous espérons deux sites d'encrage pour maximiser la reconnaissance, l'acide méthacrylique ne peut être utilisé. De ce fait, nous avons opté pour le monomère dérivé de la thymine synthétisé dans le paragraphe 4.

5.3.2. Synthèse de polymères avec le composé 119

En utilisant le monomère **119**, dérivé de la thymine, et le DMAEM **97** des matériaux imprimé et non imprimé ont été synthétisés avec divers réticulants. Le complexe de pré-polymérisation théorique est représenté sur la Figure 167 où sont montrées les interactions permettant la reconnaissance du ténofovir.

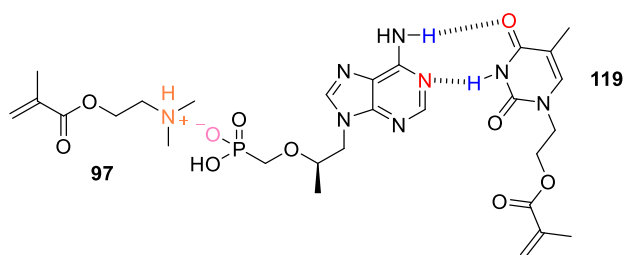


Figure 167 : Complexe de pré-polymérisation

Le premier réticulant choisi est l'EGDMA **113**. Ce réticulant biocompatible, soluble dans notre mélange ACN/H₂O, appartient à la même famille des acrylates et est un des plus utilisés dans la conception de MIPs. Ce réticulant a également été choisi afin de minimiser les interactions hydrophiles avec le template. Le second réticulant choisi est le 3-(acryloyl)-2-hydroxypropylméthacrylate **112**, ressemblant à l'EGDMA mais possédant une fonction hydroxyle qui va permettre d'apporter une certaine hydrophilie à nos matériaux, les rendant plus compatible avec les fluides biologiques.

Tableau 41 : Formulation des MIP-1/NIP-1 et MIP-2/NIP-2

Polymère	Ténofovir (mg)	97 (μL)	119 (mg)	Réticulant (μL)	AIBN (mg)	Solvants (mL)
MIP-1	75 (1 éq.)	44 (1 éq.)	62 (1 éq.)	112 736 (12 éq.)	12	8 (H ₂ O) + 70 (ACN)
NIP-1						
MIP-2	50 (1 éq.)	29 (1 éq.)	42 (1 éq.)	113 658 (20 éq.)	7,5	8 (H ₂ O) + 68 (ACN)
NIP-2						

5.3.3. Extraction du ténofovir

Une fois les polymères obtenus, une extraction du template doit être effectuée avant l'étude de recapture. Afin de s'assurer de la conformité de nos analyses, les lavages du MIP et du NIP sont réalisés dans les mêmes conditions. Afin de casser l'interaction ionique et les liaisons hydrogène, notre solution de lavage est composée d'un mélange MeOH/ACOH (9/1, v/v) qui est l'un des mélanges les plus utilisés pour extraire les petites molécules organiques jouant le rôle de template.¹⁷² Ce lavage sera suivi de plusieurs lavages par une solution MeOH/H₂O (9/1 v/v) afin d'éliminer l'acide acétique du milieu. Pour s'assurer de l'efficacité du lavage, c'est à dire s'assurer que le template, les monomères et le réticulant n'ayant pas réagi sont bien extraits, une suivi HPLC-UV est réalisée sur chaque solution de lavage. Celle-ci est effectuée sur la colonne chromatographique Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μm), présentée précédemment. L'utilisation d'un débit de 0,8 mL/min, d'une température de colonne de 35 °C et d'une phase mobile composé d'eau (0,1% de NH₄OH et 0,1% de H₃PO₄) et de méthanol en mode

gradient (8% de méthanol pendant 3 min puis gradient pendant 10 min jusqu'à 90 % de méthanol et plateau pendant 7 min) nous ont permis de suivre les composés présents dans les différents lavages.

5.3.4. Analyse microscopique de la formulation 2

Les nanoparticules issues de la formulation 2 ont été analysées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) par la plateforme MACLE-CLV (Campus CRNS- Université d'Orleans). Les particules obtenues, synthétisées dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) sont majoritairement sphériques et polydispersées.

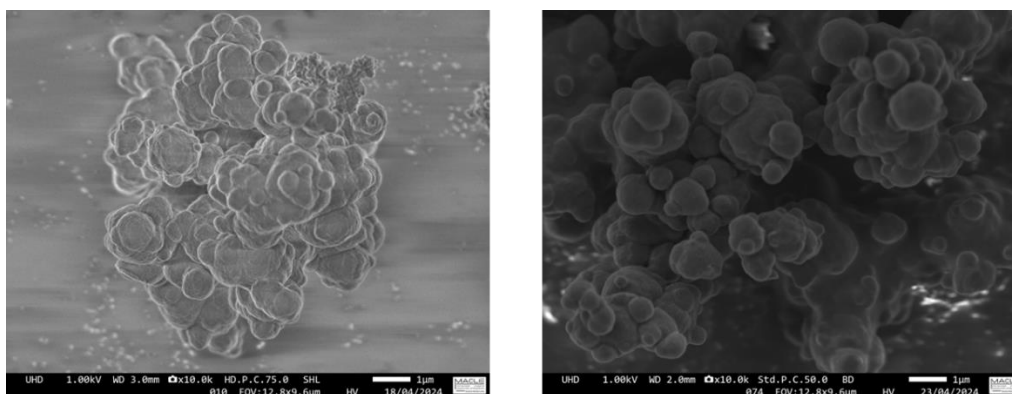


Figure 168 : Analyse microscopique de la formulation 2 (à gauche : MIP-2 ; à droite : NIP-2)

5.3.5. Etude de l'adsorption du ténofovir

Les caractérisations de l'affinité et de la capacité des polymères obtenus avec le ténofovir ont été menées par batch (cf. partie expérimentale, paragraphe 8). Pour rappel, cette étude consiste à mettre en contact une masse constante de poudre (MIP ou NIP) avec des solutions de ténofovir dont les concentrations sont croissantes. Pour rappel, la quantité adsorbée de ténofovir par nos matériaux en fonction de la concentration mise en contact est obtenue grâce à l'équation 15 (cf. chapitre 3, paragraphe 4.1) :

$$Q = \frac{C_{\text{initial}} - F}{m} \times V \quad (\text{Eq. 15})$$

Avec Q la quantité adsorbée par gramme de polymère (mg/g), C_{initial} la concentration mise en contact (mM), F la concentration dans le surnageant et m la quantité de polymère utilisée.

Les résultats obtenus pour les deux formulations précédentes sont présentés dans les Tableau 42 et Tableau 43.

Tableau 42 : Résultats de l'étude d'adsorption du Ténofovir avec les matériaux MIP-1 et NIP-1

Echantillons*	Masse de MIP/NIP (mg)	C _{ténofovir} solution en contact (mM)	C _{ténofovir} à l'équilibre (mM)	Quantité adsorbée (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
1	9,74	4,98.10 ⁻²	4,98.10 ⁻²		
	8,52		4,98.10 ⁻²		
2	9,43	7,54.10 ⁻²	7,54.10 ⁻²		
	9,06		7,54.10 ⁻²		
3	8,71	1,00.10 ⁻¹	9,04.10 ⁻²	0,32	1,22
	7,60		9,32.10 ⁻²	0,26	
4	8,57	5,05.10 ⁻¹	1,96.10 ⁻¹	10,34	1,29
	10,27		2,20.10 ⁻¹	7,97	
5	7,98	1,04	2,21.10 ⁻¹	29,3	1,09
	7,50		3,31.10 ⁻¹	27,0	

* Le volume en contact est de 1 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

Pour les polymères synthétisés avec le réticulant **112**, nous pouvons remarquer que, bien les capacités à hautes concentrations soient conséquentes, cette étude d'adsorption ne montre pas de différence significative entre le MIP et le NIP (valeurs de la dernière colonne proches de 1). De plus, aux basses concentrations, les matériaux ne semblent pas adsorber la molécule de ténofovir. Ainsi, au vu de ces résultats, l'étude de ces polymères n'a pas été poursuivie.

Pour les polymères synthétisés avec le réticulants **113**, nous remarquons que la capacité de liaison ou « binding capacity » est supérieure à 1 sur toute la gamme des concentrations étudiées et est très élevée aux faibles concentrations (Tableau 43). Ce paramètre est utilisé pour caractériser la qualité relative du MIP par rapport au NIP. Cependant, celui-ci n'est calculé que pour une concentration donnée. Afin d'obtenir une caractérisation exhaustive du comportement des matériaux, les isothermes d'adsorptions du MIP et du NIP doivent être rapportés.²⁶⁸ Ainsi, les courbes représentant les capacités d'adsorption Q (mg/g) du MIP et du NIP en fonction de la concentration à l'équilibre sont tracées sur la Figure 169. Nous pouvons observer que la courbe du MIP est située au-dessus de celle du NIP sur la gamme de concentration étudiée et qu'un plateau est atteint à 1,8 mM (C_{eq}) et, traduisant la saturation des sites d'adsorptions. Cela montre que le MIP a un comportement d'adsorption vis-à-vis du ténofovir différent du NIP. Cette différence peut s'expliquer par la présence d'une population de cavités formée dans la masse du MIP qui est plus ou moins spécifique du ténofovir. Cette première observation graphique permet de mettre en évidence l'impression moléculaire de notre matériau.

²⁶⁸ Castell, O. K.; Barrow, D. A.; Kamarudin, A. R.; Allender, C. J. Current Practices for Describing the Performance of Molecularly Imprinted Polymers Can Be Misleading and May Be Hampering the Development of the Field. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 1115–1122.

Tableau 43 : Résultats de l'étude d'adsorption du Ténofovir avec les matériaux MIP-2 et NIP-2

Echantillons*	Masse de MIP/NIP (mg)	C _{ténofovir} solution en contact (mM)	C _{ténofovir} à l'équilibre (mM)	Quantité adsorbée (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
1	12,38	1,95.10 ⁻²	8,62.10 ⁻³	0,25	5,48
	12,03		1,76.10 ⁻²	0,05	
2	10,04	3,67.10 ⁻²	1,41.10 ⁻²	0,65	2,95
	11,71		2,77.10 ⁻²	0,22	
3	11,32	5,50.10 ⁻²	2,73.10 ⁻²	0,70	2,55
	11,60		4,39.10 ⁻²	0,28	
4	9,49	7,33.10 ⁻²	5,00.10 ⁻²	0,70	1,91
	11,7		5,83.10 ⁻²	0,37	
5	9,73	9,76.10 ⁻²	7,06.10 ⁻²	0,80	1,73
	12,58		7,74.10 ⁻²	0,46	
6	10,41	1,83.10 ⁻¹	1,25.10 ⁻¹	1,60	1,61
	9,31		1,51.10 ⁻¹	0,99	
7	11,29	2,75.10 ⁻¹	2,04.10 ⁻¹	1,81	1,26
	9,38		2,28.10 ⁻¹	1,44	
8	9,61	3,67.10 ⁻¹	2,78.10 ⁻¹	2,66	1,41
	9,86		3,02.10 ⁻¹	1,88	
9	10,17	4,58.10 ⁻¹	3,46.10 ⁻¹	3,18	1,23
	11,05		3,59.10 ⁻¹	2,59	
10	12,51	9,76.10 ⁻¹	7,39.10 ⁻¹	5,43	1,16
	11,37		7,91.10 ⁻¹	4,67	
11	8,9	2,00	1,82	5,79	1,23
	10,32		1,83	4,70	

* Le volume en contact est de 1 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

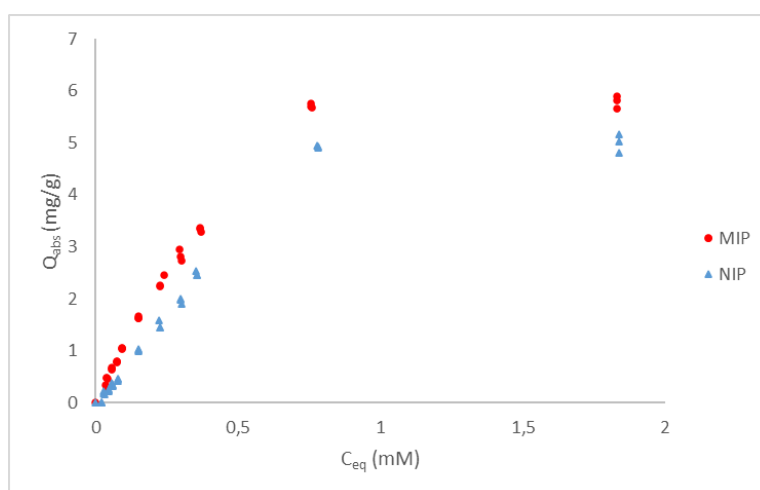


Figure 169 : Isothermes d'adsorption du MIP/NIP

Afin de déterminer les paramètres caractéristiques du MIP et du NIP, à savoir la constante d'association K_a entre le ténofovir et le polymère et la capacité maximale N des deux matériaux, nous avons appliqué les modèles d'adsorption cités dans la littérature.²²² Comme présenté dans le chapitre

3, les modèles les plus connus sont ceux de Langmuir (L), de Freundlich (F) et de Freundlich-Langmuir (F-L).

Afin de trouver à quel modèle ces isothermes expérimentaux corrélerent, pour déterminer les paramètres K_a et N , la régression non linéaire est utilisée en utilisant le logiciel Origin®. Le choix du meilleur modèle se base sur l'ajustement du tracé donné par chacun des isothermes avec les points expérimentaux. Afin de déterminer la bonne corrélation entre les modèles théorique et expérimental, plusieurs tests statistiques ont été pris en compte, comme préconisé dans l'article de Ncibi *et al.*,²⁶⁹ tels que le coefficient de détermination R^2 , qui doit être le plus proche de 1, le test de Fisher F_{value} , qui doit être le plus élevé possible, et le test du Chi carré (χ^2) qui doit donner un nombre le plus petit possible. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 44 : Valeurs des constantes d'affinités (K_a ; L.mol⁻¹), nombre de site actifs (N ; mol.g⁻¹), coefficient de détermination (R^2), valeur du test statistique de Fisher (F_{value}), valeur du Chi carré (χ^2) obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP de la formulation 2.

Formulation MIP-2						
Modèle	N	K_a	m	R^2	χ^2	F_{value}
Langmuir	$2,74.10^{-5} \pm 1,34.10^{-6}$	1973 ± 210		0,962	$1,71.10^{-12}$	1004
Freundlich-Langmuir	$2,27.10^{-5} \pm 8,40.10^{-7}$	3079 ± 227	$1,45 \pm 0,1$	0,980	$9,04.10^{-13}$	1273
Freundlich	$1,51.10^{-5} \pm 1,65.10^{-5}$	932 ± 6115	$0,5 \pm 0,03$	0,870	$5,84.10^{-12}$	292
Formulation NIP-2						
Modèle	N	K_a	m	R^2	χ^2	F_{value}
Langmuir	$2,59.10^{-5} \pm 1,92.10^{-6}$	1373 ± 209		0,946	$2.04.10^{-12}$	545
Freundlich-Langmuir	$1,89.10^{-5} \pm 6,06.10^{-7}$	2754 ± 148	$2 \pm 0,17$	0,982	$6,77.10^{-13}$	1117
Freundlich	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

*non concluant

D'après le Tableau 44, la meilleure adéquation est obtenue avec le modèle théorique de Freundlich-Langmuir pour le MIP et le NIP. Dans ce modèle, le paramètre m caractérise l'hétérogénéité de distribution des sites et doit être compris entre 0 et 1. Cependant, à la suite des calculs effectués, la valeur obtenue est de 1,45 et 2 pour le MIP et le NIP, respectivement. Ce phénomène est caractéristique d'un effet de coopérativité positive au niveau de l'adsorption. Ce phénomène montre que plus d'une molécule cible peuvent se loger dans les cavités : soit les molécules de ténofovir

²⁶⁹ Ncibi, M. C. Applicability of Some Statistical Tools to Predict Optimum Adsorption Isotherm after Linear and Non-Linear Regression Analysis. *J. Hazard. Mater.* **2008**, 153, 207–212.

s'agrègent ensemble avant de pénétrer dans la cavité, soit une première molécule de ténofovir pénètre dans la cavité suivie d'une deuxième qui vient former des interactions avec la première. Ce phénomène peut provenir d'un gonflement de notre matériau qui conduit à l'élargissement de la cavité permettant ainsi l'insertion de plusieurs molécules de ténofovir.

D'après les résultats obtenus, le modèle de Freundlich-Langmuir indique que le MIP possède une capacité théorique de $2,27 \cdot 10^{-5}$ mol/g (soit 6,52 mg/g) et une constante d'affinité de 3079 L/mol. A contrario, le NIP présente une capacité théorique plus faible de $1,89 \cdot 10^{-5}$ mol/g (soit 5,42 mg/g) et une constante d'affinité également plus faible de 2754 L/mol.

5.3.6. Etude de la cinétique de relargage du ténofovir

L'objectif final étant la synthèse d'un matériau imprimé sélectif au ténofovir et permettant un relargage contrôlé de ce dernier, la cinétique de libération de l'ANP a été étudiée.

5.3.6.1. Mode opératoire

Cette étude de relargage a été menée dans une solution aqueuse PBS tamponnée à pH 7,4 (0,01 M). La cinétique de relargage est réalisée à 25 °C, température ambiante, et à 37 °C, température corporelle. Le relargage a été suivi sur deux semaines à 25 °C et sur 6 jours à 37 °C. Les résultats de cette expérience sont donnés en exprimant le pourcentage de ténofovir libéré en fonction du temps. Les matériaux imprimés et non imprimés sont chargés en utilisant une solution de ténofovir dans le mélange ACN/H₂O (1/1, v/v). Puis, en analysant le surnageant après mise en contact, la quantité maximale adsorbée dans le MIP et le NIP peut être calculée (Tableau 45).

Tableau 45 : Quantités initiales de ténofovir dans les matériaux pour l'étude cinétique à 25 °C et 37 °C

Matériaux	Q _{adsorbée} 25 °C	Q _{adsorbée} 37 °C
MIP	8,37 mg/g	7,2 mg/g
NIP	9,69 mg/g	6,4 mg/g

5.3.6.2. Cinétique à 25 °C

La cinétique de libération du ténofovir est, dans un premier temps, réalisée à 25 °C. Les profils obtenus pour les matériaux imprimés et non imprimés sont tracés sur la Figure 170.

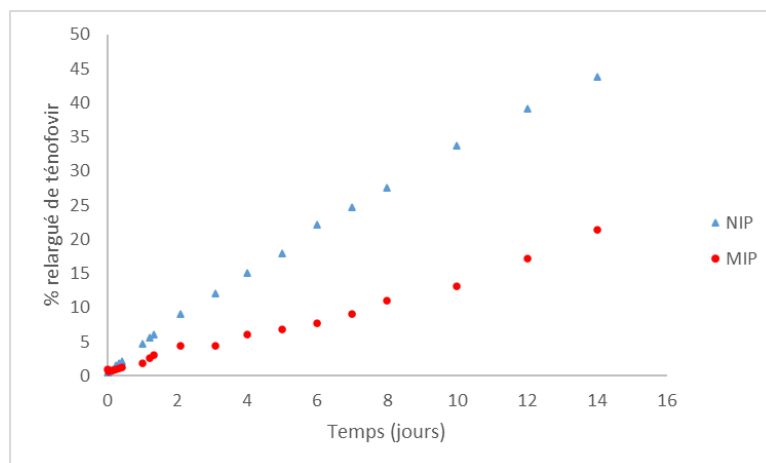


Figure 170 : Relargage du ténofovir (exprimé en %) en fonction du temps dans le PBS à 25 °C

Les courbes obtenues montrent une différence dans les profils de relargage entre le matériau imprimé et non imprimé. En effet, la quantité de ténofovir relarguée en fonction du temps par le NIP est supérieure à celle libérée par le MIP. Cette cinétique est relativement lente avec 44% (soit 55 µg) et 26% (soit 20 µg) libérés en 2 semaines, par le NIP et le MIP, respectivement. Cette différence de cinétique est cohérente avec les études d'adsorption qui ont montrées que le NIP avait une plus petite constante d'association que le MIP. Ainsi, le ténofovir étant plus faiblement retenu dans le NIP, la dissociation sera plus facile et plus rapide ($K_d = 1/K_a$).

Ensuite, nous avons voulu déterminer le mode de libération du ténofovir qui semble différent graphiquement. En effet, le NIP semble corrélérer à une droite affine tandis que le MIP semble présenter un profil triphasique.

➤ Modèle de libération du NIP

Pour le NIP, nous avons appliqué deux modèles, le modèle d'ordre 0 et le modèle d'ordre 1.

Ce premier modèle décrit un taux de libération du principe actif indépendant de sa concentration et est exprimé par l'équation 27.

$$Q = Q_0 + k_0 \times t \text{ (Eq. 27)}$$

où Q_0 est la quantité initiale relarguée (généralement faible), k_0 la constante de vitesse d'ordre 2 et Q la quantité de principe actif libérée. Pour ce modèle, la libération du principe en fonction du temps est constante en fonction du temps.

Le modèle d'ordre 1 est, quant à lui, exprimé par l'équation 28.

$$\ln Q = \ln Q_0 + k_1 \times t \text{ (Eq. 28)}$$

où Q_0 est la quantité initiale du bioactif, k_1 la constante de vitesse d'ordre 1 et Q la quantité de principe actif restante en fonction du temps.

En appliquant ces deux modèles au NIP, nous avons obtenu, par régression linéaire, un coefficient de détermination (R^2) de **0,9953** et de **0,9995** pour l'ordre zéro et l'ordre 1, respectivement.

La libération du ténofovir par le matériau non imprimé est d'ordre 1 avec une constante de vitesse k_1 égale à $0,0017 \text{ h}^{-1}$

➤ Modèle de libération du MIP

Le profil du MIP semble quant à lui être triphasique et ne correspond à aucun des modèles classiques. Pendant les premières heures, le profil semble être linéaire et semblable au NIP. Dans un premier temps, ce sont les molécules de ténofovir retenues en surface par des interactions non spécifiques qui vont être libérées dans le milieu. Ensuite, une phase II dite « lag-time » ou temps de latence est observée. Durant cette phase, une libération lente contrôlée par diffusion lieu. En effet, les molécules de la solution tampon mettent un certain temps pour hydrater en profondeur le polymère et libérer ainsi les molécules de ténofovir retenues à l'intérieur des cavités. Ce phénomène peut s'expliquer par la grande proportion de réticulant, l'EGDMA, rendant nos particules hydrophobes et augmentant donc le temps d'hydratation de notre polymère. Enfin, au bout d'une dizaine de jours, une troisième phase est observée durant laquelle, une libération plus rapide du ténofovir est notée. Cette troisième phase est possiblement due à un phénomène d'érosion de la matrice polymérique dû au temps de contact long avec l'eau. Ce phénomène peut également être dû à un gonflement du polymère qui va permettre de libérer plus facilement et rapidement le ténofovir. Des profils triphasiques similaires ont été rapportés dans la littérature et semblent indiquer que la troisième phase provient de la dégradation du polymère.²⁷⁰

5.3.6.3. Cinétique à 37 °C

La cinétique de libération du ténofovir est, dans un second temps, réalisée à 37 °C. Les profils obtenus pour les matériaux imprimés et non imprimés sont tracés sur la Figure 171.

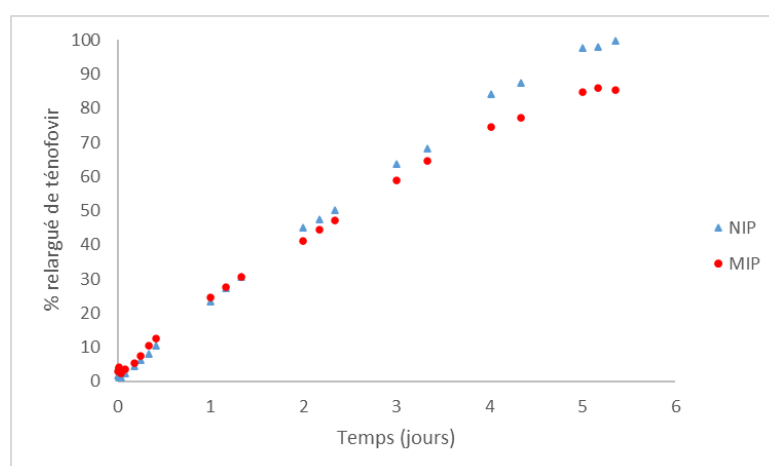


Figure 171 : Relargage du ténofovir (exprimé en %) en fonction du temps dans le PBS à 37 °C

²⁷⁰ Freiberg, S.; Zhu, X. X. Polymer Microspheres for Controlled Drug Release. *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 1–18.

Contrairement à la cinétique à 25 °C, les courbes obtenues à 37 °C ne montrent pas de différence notable, les 4 premiers jours, dans les profils de relargage entre le MIP et le NIP. A partir du 4^{ième} jour d'étude, un léger ralentissement est observé pour le MIP comparé au NIP. Ces profils nous montrent également que la cinétique de libération est dépendante de la température et est plus rapide à 37 °C. En effet, 100% du ténofovir contenu dans le NIP est relargué au bout de 6 jours (contre 22% à 25 °C) tandis que le MIP en libéré 85% dans le même temps (contre 9% à 25 °C).

Ainsi, la température joue un rôle très important dans le relargage du ténofovir. La diffusion étant accélérée avec la température, le polymère est plus vite hydraté en profondeur et va donc libérer plus rapidement le ténofovir retenu à l'intérieur des cavités. De même, l'interaction des chaînes hydrophobes, due aux forces de dispersion, est réduite à 37 °C, du fait de l'agitation thermique, facilitant ainsi l'entrée du solvant entre ces chaînes.

Pour mieux connaître le phénomène qui régit la libération du ténofovir, nous avons eu recours aux modèles mathématiques disponibles dans la littérature.

Nous avons appliqué à nos matériaux, le modèle de Korsmeyer-Peppas²⁷¹ qui permet de décrire la libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique. Ce modèle de cinétique a déjà été appliqué à des matériaux imprimés pour la délivrance d'analogues nucléosidiques, comme la ribavirine.¹⁷⁷ L'équation 29 développée en 1983 est semi-empirique et est définie comme suit :

$$\frac{Q}{Q_0} = k \times t^n \quad (\text{Eq. 29})$$

avec Q la quantité de la molécule relarguée à un temps t, Q₀ la quantité totale libérée à l'équilibre (peut être assimilée à la quantité initialement contenue dans la matrice), k la constante de vitesse de libération et n l'exposant de libération. Cette variable caractérise le mode de libération et dépend de la forme et nature du matériau.

Les paramètres obtenus à la suite de la régression non linéaire sont répertoriés dans le **Tableau 46**.

Tableau 46 : paramètres obtenus à la suite de la régression non linéaire sur le MIP et NIP

Matériaux	Modèle de Korsmeyer-Peppas		
	R ²	k	n
MIP	0,992	2,29 ± 0,25	0,76 ± 0,02
NIP	0,997	2,04 ± 0,15	0,80 ± 0,01

²⁷¹ Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers. *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25–35.

Les valeurs de n obtenues étant comprises entre 0,5 et 1 nous permet de conclure que le mode de libération est non-fickien ou anormal.²⁷² Le mécanisme de libération est donc régi simultanément par la diffusion du ténofovir au sein de la matrice polymérique et par la relaxation du polymère. Les valeurs obtenues de n pour le MIP et pour le NIP sont très proches. Ainsi, le taux de diffusion et de gonflement sont comparables. Ces résultats sont en adéquation avec les profils de cinétique qui sont similaires.

Nous avons étudié la libération du ténofovir par nos matériaux imprimé et non imprimé dans du PBS. Cette étude a, dans un premier temps, été effectuée à 25 °C. Les **profils de libération** obtenus corrélaient à une cinétique **d'ordre 1 pour le NIP et est triphasique pour le MIP**. Dans un second temps, l'étude a été effectuée à 37 °C et a permis de mettre en évidence **une accélération de la libération du ténofovir avec la température**. Les **profils de libération** obtenus corrélaient au modèle mathématique de **Korsmeyer-Peppas** et sont identiques entre le MIP et le NIP. A 37 °C, la libération est régie à la fois par la diffusion du ténofovir dans le milieu et par le gonflement du polymère.

Ainsi, bien que la libération du ténofovir ne montre pas de différence significative entre le MIP et le NIP à 37 °C, notre MIP présente **un relargage ralenti et contrôlé** du ténofovir (50% libéré en un peu plus de 2 jours). Par ailleurs, la cinétique de libération à 25 °C étant extrêmement lente pour le MIP, nos matériaux chargés pourront être **préparés et stockés à température ambiante ou à 4 °C, pendant plusieurs jours/semaines** avant d'être administré **sans perdre de leur capacité**.

6. Utilisation d'un « dummy-template »

Dans le but d'utiliser uniquement l'acétonitrile comme porogène, qui confère une meilleure morphologie aux nanoparticules, nous avons décidé d'utiliser des « dummy-templates ». Afin de ne pas avoir à prouver la toxicité de notre dummy-template, nous avons utilisé 3 dérivés du ténofovir, le *bis*(POC)-ténofovir **86**, prodrogue du ténofovir commercialement disponible, ainsi que deux analogues synthétiques, le *bis*(méthyle)-ténofovir **126** ainsi que le *bis*(éthyle)-ténofovir **127** (Figure 172).

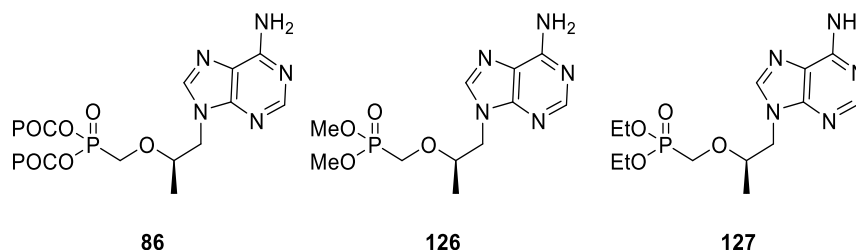


Figure 172 : Structures des « dummy-templates » du ténofovir

²⁷² Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs. *J. Control. Release.* **1987**, *5*, 23–36.

6.1. Synthèse des dérivés de ténofovir

Les analogues *bis*(méthyle) **126** et *bis*(éthyle) **127** du ténofovir ont été synthétisés en s'inspirant des protocoles de He *et al.*²⁷³ et de Wang *et al.*²⁷⁴ Le ténofovir est activé par le chlorure d'oxalyle, en présence de DMF, puis substitué deux fois par le méthanol ou l'éthanol formant le *bis*(Me)-ténofovir et *bis*(Et)-ténofovir, respectivement (Schéma 20). Les composés **126** et **127** sont obtenus avec des bons rendements de plus de 70%.

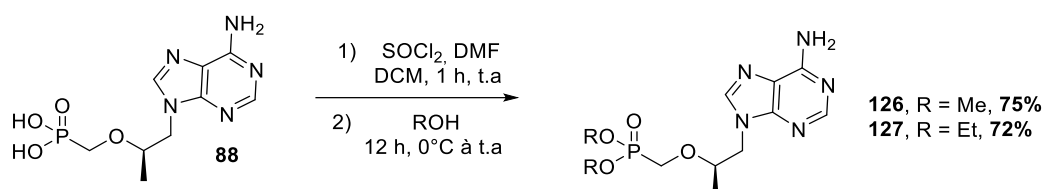


Schéma 20 : Synthèse des analogue *bis*(Me) et *bis*(Et) du Ténofovir

6.2. Méthode analytique

Comme pour le ténofovir, une méthode analytique a été mise en place pour chacun de ces 3 composés. Ces structures étant des analogues du ténofovir, nous avons utilisé la même colonne et élué ces différents composés en modulant les proportions de modificateur organique. La fonction phosphonate devenant un ester de phosphonate, l'utilisation d'un tampon dans la phase mobile n'est plus nécessaire pour retenir ces composés. Les différentes phases mobiles sont résumées dans le Tableau 47 et les chromatogrammes se trouvent en Annexe 9, Annexe 10 et Annexe 11.

Tableau 47 : Conditions d'analyses des analogues du ténofovir

« Dummy-template »	 <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@@H](C)OCP(=O)(OC(=O)C)OC(=O)C</chem> (86)	 <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@@H](C)OCP(=O)(OC)OC</chem> (126)	 <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@@H](C)OCP(=O)(OCC)OCC</chem> (127)
Conditions d'analyses *	D = 0,8 mL/min T = 40 °C, H ₂ O/MeOH (45/55, v/v)	D = 0,8 mL/min T = 35 °C, H ₂ O/MeOH (80/20, v/v)	D = 0,8 mL/min T = 35 °C, H ₂ O/MeOH (70/30, v/v)

* Colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μm).

6.3. Polymérisation par précipitation

Dans un premier temps, nous avons utilisé le *bis*(POC)-ténofovir **86**, soluble dans l'acétonitrile, dont la toxicité est déjà connue. Les matériaux ont été synthétisés en utilisant l'acide méthacrylique comme monomère et le pentaérythritol triacrylate (PETRA) comme réticulant (Tableau 48).

²⁷³ Jun He, J. H.; Zhi He, Z. H.; Changyuan Wei, C. W.; Hongjun Gao, H. G.; Yuanqiang Li, Y. L.; Daqing Che, D. C. Identification, Synthesis and Characterization of New Impurities in Tenofovir. *Pharmazie*. **2015**, 283–288.

²⁷⁴ Wang, Y.; Zhao, J. Preparation of novel antiviral nucleoside reverse transcriptase inhibitors. CN109485676 A, 2019.

Tableau 48 : Formulation MIP-3/NIP-3

Polymère	<i>bis</i> (POC)-ténofovir (mg)	MAA (μL)	PETRA (mL)	AIBN (mg)	ACN (mL)
MIP-3	100 (1 éq.)	65 (4 éq.)	1,05 (12 éq.)	10	105
NIP-3					

Une fois les polymères obtenus, nous avons pu étudier leur capacité de recapture du « dummy-template » et du ténofovir afin de comparer les résultats (Tableau 49). Bien que nous souhaitions faire un MIP pour la délivrance du ténofovir, il nous faut également prouver que celui-ci est bien sélectif du template utilisé pour sa conception.

Tableau 49 : Résultats de l'étude d'absorption du MIP-3/NIP-3

Molécules	Polymères	Solvants	C _{initial} (mM)	Quantité adsorbée (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
<i>Bis</i> (POC)-ténofovir	MIP	100% ACN	8,00.10 ⁻²	0,61	0,94
	NIP			0,60	
	MIP		1,98.10 ⁻²	0,15	1,18
	NIP			0,13	
Ténofovir	MIP	H ₂ O/ACN (1/1, v/v)	9,86.10 ⁻²	0,51	0,94
	NIP			0,55	
	MIP		1,97.10 ⁻²	0,06	1,35
	NIP			0,04	

* Le volume en contact est de 1 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

En comparant la recapture du template utilisé lors de la synthèse à celle du ténofovir, pour deux concentrations molaires proches, nous avons montré que la capacité est plus grande avec le « dummy-template » qu'avec le ténofovir, mais que la sélectivité n'est pas très élevée ni pour l'une ni pour l'autre molécule. Les groupements POC pourraient influencer la taille et la forme de la cavité en créant des interactions avec le monomère qui ne sont pas essentiellement focalisées sur la base. Ainsi des « dummy-templates » ayant des groupements de taille plus réduite greffés au phosphonate sont utilisés par la suite : le *bis*(Me)-ténofovir **126** et le *bis*(Et)-ténofovir **127**, préalablement synthétisés.

Néanmoins, nous avons remarqué que le *bis*(Me)-ténofovir n'était pas soluble dans l'acétonitrile à température ambiante. Or, le mélange n'a pas été chauffé afin d'augmenter la solubilité du « dummy-template » car il y avait un risque de déclencher la polymérisation lors de la formation du complexe de pré-polymérisation. L'analogue *bis*(Et)-ténofovir a également montré aussi des problèmes de solubilité. Ainsi, l'utilisation de trois deux dummy-templates a été abandonnée.

6.4. Utilisation d'un analogue DAPy **31** comme « dummy-template »

Un dernier essai a été réalisé avec le composé **31** (DAPy C8) comme « dummy-template ». Bien que la toxicité de ce composé ne soit pas encore connue, nous avons quand même envisagé de l'utiliser, car il est soluble dans 100% d'acétonitrile et l'obtention d'un polymère imprimé *via* ce dummy-template pourrait nous servir à la fois à reconnaître le ténofovir et la forme phosphonate du LAVR-289. En effet, comme mentionné auparavant, la DAPy peut s'apparenter à une base purique, permettant ainsi la reconnaissance du ténofovir. De plus, ce « dummy-template » possédant la même base hétérocyclique que le LAVR-289, le polymère imprimé pourrait reconnaître également la forme phosphonate libre **17** du LAVR-289 et ainsi nous servir de système de délivrance pour ce dernier. L'utilisation du monomère **119**, possédant la nucléobase thymine, apparaît être le monomère adéquat pour créer les interactions avec « ce dummy-template » (Figure 173). En effet, ce monomère est capable à la fois de reconnaître la base adénine du ténofovir par deux points de liaison) et la base du LAVR-289 par 3 points d'interactions.

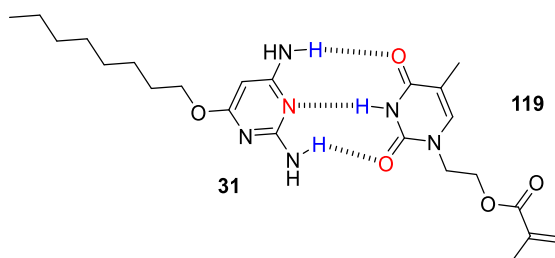


Figure 173 : Interactions entre le « dummy-template » **31** et le monomère **117**

Ainsi, les polymères imprimés et non imprimés ont été synthétisés en utilisant les quantités répertoriées dans Tableau 50.

Tableau 50 : Formulation du MIP-4/NIP-4

Polymères	31 (mg)	119 (mg)	AHPM (μ L)	AIBN (mg)	Porogène (mL)
MIP-4	25 (1 éq.)	25 (1 éq.)	361 (12 éq.)	5	33 (ACN)
NIP-4					

Pour ces synthèses, le choix du réticulant s'est porté sur l'AHPM, soluble dans l'acétonitrile et ayant une fonctionnalité alcool, qui permet de diminuer l'hydrophobie du polymère et d'augmenter sa solubilité dans les fluides biologiques en comparaison à l'EGDMA.

Après avoir réalisé les synthèses et extrait le « dummy-template » du MIP, la recapture par batch a été effectuée avec le ténofovir. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence notable entre le MIP et le NIP (Tableau 51).

Tableau 51 : Résultats de recapture du ténofovir par le MIP-4/NIP-4

Echantillons*	Masse de MIP/NIP (mg)	C _{ténofovir} solution en contact (mM)	C _{ténofovir} (mM) surnageant	Quantité adsorbée (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
1	10,82	1,39	0,966	11,33	0,62
	7,03		0,943	18,40	
2	8,33	0,21	0,201	0,28	0,74
	8		0,198	0,39	
3	11,12	6,41.10 ⁻²	6,41.10 ⁻²		
	11,81		6,41.10 ⁻²		

* Le volume en contact est de 1 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

Ces polymères imprimé et non imprimé seront conservés afin de réaliser l'étude de recapture du LAVR-289 sous sa forme phosphonate libre, une fois le problème de synthèse résolu. En parallèle, l'étude de recapture devra être menée sur le « dummy-template ».

Conclusions et perspectives

Pour conclure cette partie, nous avons synthétisé **trois monomères** possédant une nucléobase pyrimidique portant une fonctionnalité acrylate en *N1*. Ces monomères s'hydrolysant dans nos conditions de polymérisation, **un espaceur éthyle** a été ajouté entre la fonction acrylate et la nucléobase conduisant à la synthèse du **monomère 119** (Figure 174).

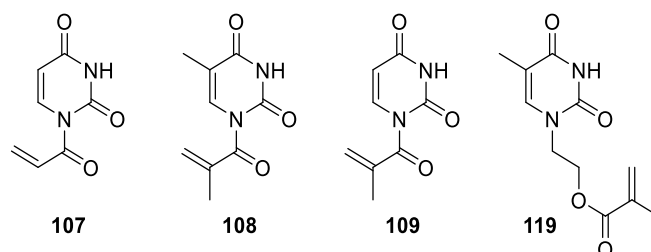


Figure 174 : Récapitulatif des monomères synthétisés

Nous avons **développé un polymère à empreintes moléculaires**, par polymérisation par précipitation, pour la **reconnaissance et la libération contrôlée du ténofovir**. Ce MIP a été conçu en utilisant **deux points d'interaction** :

- ✓ *Via* la fonctionnalité phosphonate du ténofovir en utilisant le DMAEM **97** comme monomère pour créer une interaction de type ionique.
- ✓ *Via* la nucléobase du ténofovir, en utilisant le composé **119**, par interaction de type Watson-Crick.

Le nanomatériau imprimé a montré une **meilleure sélectivité** et un **relargage retardé** vis-à-vis du non imprimé, avec **22% libéré en 6 jours par le NIP contre 9% par le MIP à 25 °C**. L'analyse microscopique, de ces nanomatériaux, a mis en évidence que l'utilisation d'un **mélange composé** à 90% d'acétonitrile et **10% d'eau** permet d'obtenir des **nanoparticules sphériques**. Afin de compléter cette étude,

l'activité biologique des nanomatériaux chargés en ténofovir devra être réalisée et comparée aux activités obtenues avec le ténofovir seul et celles de ses deux prodrogues, le TDF et le TAF.

En parallèle, **la conception** de polymères à empreintes moléculaires à l'aide de « **dummy-templates** » a été réalisée. Pour ce faire, deux analogues du ténofovir ont été synthétisés mais se sont montrés insolubles dans le mélange de polymérisation. Les polymères synthétisés à partir du *bis*(POC)-ténofovir **86**, ou de la DAPy C8 **31** n'ont pas montré de différences notables entre le matériau imprimé et le non imprimé.

Ces travaux serviront, lorsque la synthèse de la forme phosphonate libre du LAVR-289 **17** aura été résolue, **d'aide pour la conception d'un MIP de ce dernier**. Dans un premier temps, une étude d'adsorption du composé **17** pourra être menée sur le MIP, qui a engendré le meilleur résultat pour le ténofovir. De même, une étude d'adsorption sur le MIP synthétisé avec le composé **31** comme « dummy template » devra être menée. Dans un second temps, la conception d'un MIP sélectif de la forme phosphonate libre du LAVR-289 pourra être réalisée en utilisant les mêmes monomères, c'est-à-dire le DMAEM **97** pour la reconnaissance du phosphonate et le *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine **119** pour la reconnaissance de la DAPy (Figure 175). Il sera intéressant, ensuite, de comparer l'activité biologique de ces nanoparticules chargées vis-à-vis du LAVR-289.

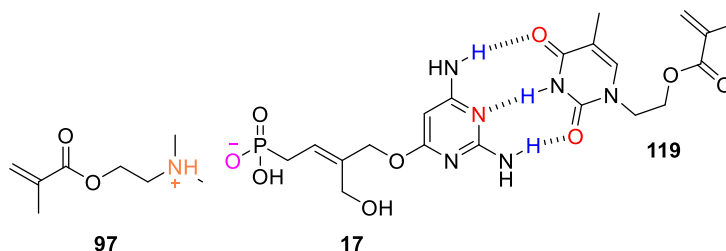


Figure 175 : Interactions entre la forme phosphonate libre du LAVR-289 et les deux monomères fonctionnels

Partie B : Développement d'un core-shell imprimé à base de polydopamine

En parallèle des polymères à empreintes moléculaires synthétisés par polymérisation par précipitation, nous avons développé des nanoparticules de type core-shell imprimées à cœur de polydopamine. Ce développement s'est articulé en plusieurs étapes avec, dans un premier temps, le choix et la synthèse du « cœur » (core), suivi de la dérivation de surface de nos nanoparticules, puis la création du core-shell et enfin la caractérisation des polymères. Avant de présenter ces différentes étapes, il est opportun de présenter la polydopamine et de justifier son utilisation.

1. Pourquoi la polydopamine ?

Chimiquement, la dopamine (DA) **128** est composée d'une chaîne alkylamine (en bleu sur la Figure 176, ressemblant à la lysine) et d'un groupement catéchol (en orange sur la Figure 176). Cette molécule possède 3 sites protonables dont les pKa sont les suivants²⁷⁵ : pKa₁ (OH) = 9, pKa₂ (OH) = 12 et pKa₃ (NH₃⁺) = 10,5. Elle a la capacité, en milieu alcalin, de « polymériser » sous forme de nanoparticules nommées polydopamine (PDA).

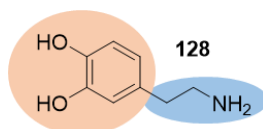


Figure 176 : Structure de la dopamine

Introduit en 2007 par Lee *et al.*,²⁷⁶ la PDA, nanomatériau bio-inspiré de la fibre naturelle ou byssus des moules, est rapidement devenu populaire pour sa capacité de revêtement. En effet, ses groupes chimiques (amine primaire et catéchol) sont facilement modifiables, ce qui lui confère une forte capacité d'adhésion aux surfaces de la plupart des matériaux. Grâce à ses propriétés physico-chimiques et à son excellente biocompatibilité,^{277,278} la polydopamine a montré un grand intérêt dans

²⁷⁵ Cui, J.; Iturri, J.; Paez, J.; Shafiq, Z.; Serrano, C.; d'Ischia, M.; *et al.* Dopamine-Based Coatings and Hydrogels: Toward Substitution-Related Structure–Property Relationships. *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 2403–2413.

²⁷⁶ Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science*. **2007**, *318*, 426–430.

²⁷⁷ Nurunnabi, M.; Khatun, Z.; Nafiujjaman, M.; Lee, D.; Lee, Y. Surface Coating of Graphene Quantum Dots Using Mussel-Inspired Polydopamine for Biomedical Optical Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2013**, *5*, 8246–8253.

²⁷⁸ Hong, S.; Kim, K. Y.; Wook, H. J.; Park, S. Y.; Lee, K. D.; Lee, D. Y.; Lee, H. Attenuation of the *in Vivo* Toxicity of Biomaterials by Polydopamine Surface Modification. *Nanomedicine*. **2011**, *6*, 793–801.

le domaine biomédical comme agent d'imagerie,²⁷⁹ anti-inflammatoire²⁸⁰ anticancéreux.²⁸¹ Récemment, une revue a présenté l'utilisation de polydopamine comme cicatrisant²⁸² ou encore comme matériau pour la libération contrôlée dans le foie de l'oseltamivir phosphate, un antiviral utilisé dans le traitement de la grippe.²⁸³

Bien que largement utilisé dans le domaine médical, aucun article ne présente la synthèse de nanoparticules de type core-shell imprimées en utilisant la polydopamine comme cœur. En effet, la majorité des articles décrivent l'utilisation de la polydopamine comme coquille, grâce à sa facilité de former une couche et non en tant que cœur principal (Lamaoui *et al.*²⁸⁴ listent plusieurs « cœur »/substrats ayant été modifiés avec la PDA). Fort de ce constat, et en s'appuyant sur la biocompatibilité et la facilité de modification de surface de la polydopamine, nous avons décidé de coupler la technologie de l'impression moléculaire au core-shell. Ce core-shell imprimé ayant la PDA comme cœur servira de système de délivrance du ténofovir.

2. Synthèse des nanoparticules

2.1. Synthèse de la polydopamine

Dans la littérature, un grand nombre de publications rapportent la synthèse de nanoparticules de polydopamine. Parmi ces nombreuses méthodes résumées par Vincent Ball,²⁸⁵ nous avons suivi la polydopamine selon le protocole de Ai *et al.*²⁸⁶ qui montre que la dopamine peut s'auto-polymériser dans un mélange eau/éthanol en présence d'hydroxyde d'ammonium. Il est à noter que la taille de ces nanoparticules synthétisées est inversement proportionnelle à la quantité de base utilisée (Figure 177).

²⁷⁹ Zhang, X.; Wang, S.; Xu, L.; Feng, L.; Ji, Y.; Tao, L.; Li, S.; Wei, Y. Biocompatible Polydopamine Fluorescent Organic Nanoparticles: Facile Preparation and Cell Imaging. *Nanoscale*. **2012**, *4*, 5581.

²⁸⁰ Zhao, H.; Zeng, Z.; Liu, L.; Chen, J.; Zhou, H.; Huang, L.; Huang, J.; Xu, H.; Xu, Y.; Chen, Z.; Wu, Y.; Guo, W.; Wang, J. H.; Wang, J.; Liu, Z. Polydopamine Nanoparticles for the Treatment of Acute Inflammation-Induced Injury. *Nanoscale*. **2018**, *10*, 6981–6991.

²⁸¹ Nieto, C.; Vega, M. A.; Marcelo, G.; Martín Del Valle, E. M. Polydopamine Nanoparticles Kill Cancer Cells. *RSC Adv*. **2018**, *8*, 36201–36208.

²⁸² Yazdi, M. K.; Zare, M.; Khodadadi, A.; Seidi, F.; Sajadi, S. M.; Zarrintaj, P.; *et al.* Polydopamine Biomaterials for Skin Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng*. **2022**, *8*, 2196–2219.

²⁸³ Yin, N.; Zhang, Z.; Ge, Y.; Zhao, Y.; Gu, Z.; Yang, Y.; Mao, L.; Wei, Z.; Liu, J.; Shi, J.; Wang, Z. Polydopamine-Based Nanomedicines for Efficient Antiviral and Secondary Injury Protection Therapy. *Sci. Adv*. **2023**, *9*, eadf4098.

²⁸⁴ Lamaoui, A.; Lahcen, A. A.; Amine, A. Unlocking the Potential of Molecularly Imprinted Polydopamine in Sensing Applications. *Polymers*. **2023**, *15*, 3712.

²⁸⁵ Ball, V. Polydopamine Nanomaterials: Recent Advances in Synthesis Methods and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol*. **2018**, *6*, 109.

²⁸⁶ Ai, K.; Liu, Y.; Ruan, C.; Lu, L.; Lu, G. (Max). Sp² C-Dominant N-Doped Carbon Sub-micrometer Spheres with a Tunable Size: A Versatile Platform for Highly Efficient Oxygen-Reduction Catalysts. *Adv. Mater*. **2013**, *25*, 998–1003.

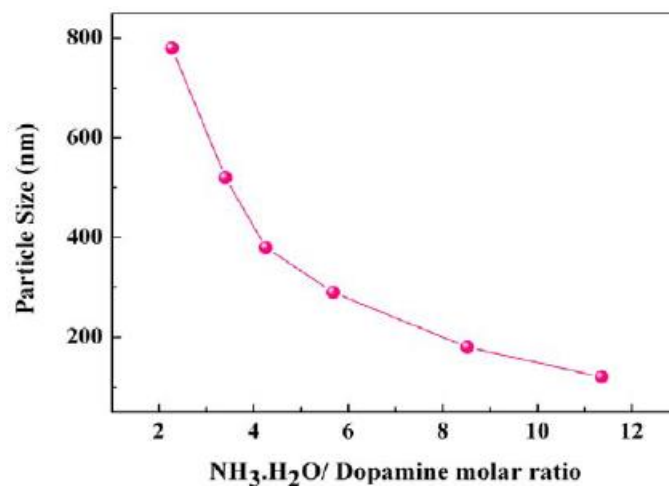


Figure 177 : Tailles des particules de PDA en fonction de la quantité de NH₄OH²⁸⁶

Ainsi, nous avons polymérisé La dopamine **128** dans un mélange H₂O/EtOH en présence d'hydroxyde d'ammonium pendant 30 h à 25 °C (Schéma 21). Nous avons choisi un ratio base/dopamine autour de 4,5 dans l'optique d'avoir des particules de PDA d'environ 300 nm, compatible pour une administration par voie intraveineuse. Les nanoparticules obtenues ont ensuite été purifiées par dialyse afin d'éliminer la dopamine n'ayant pas réagi et les oligomères de dopamine de très petites masses. La solution contenant la PDA en suspension sous forme d'une poudre noire est ensuite lyophilisée. Cette synthèse a pu être réalisée pour des quantités initiales de dopamine comprises entre 500 mg et 3 g.

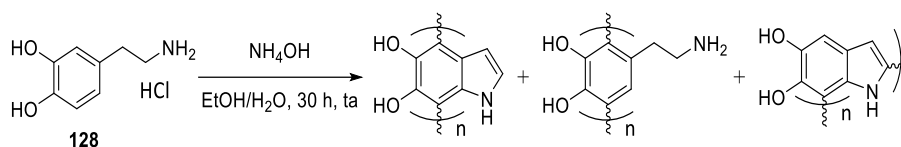


Schéma 21 : Schéma de synthèse de la polydopamine

Bien que la synthèse de la polydopamine soit connue depuis plusieurs années, son mécanisme a longtemps été une source de questionnement. Les dernières études ont mis en évidence que la synthèse passe par un dérivé 5,6-dihydroxyindole **129** (DHI). Ce dérivé peut ensuite former la polydopamine par polymérisation covalente et/ou par un auto-assemblage non covalent^{287,288} (Figure 178).

²⁸⁷ Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4711–4717.

²⁸⁸ Hong, S.; Wang, Y.; Park, S. Y.; Lee, H. Progressive Fuzzy Cation-π Assembly of Biological Catecholamines. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaat7457.

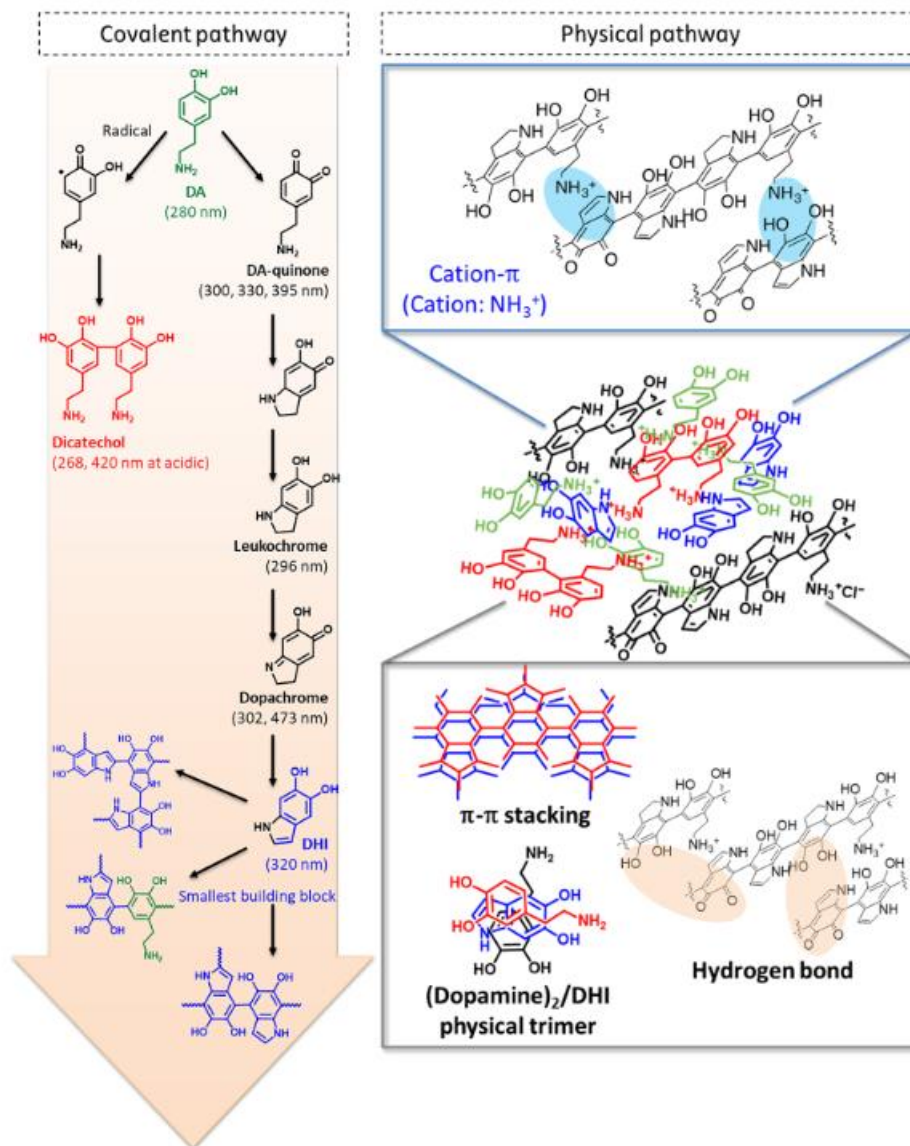
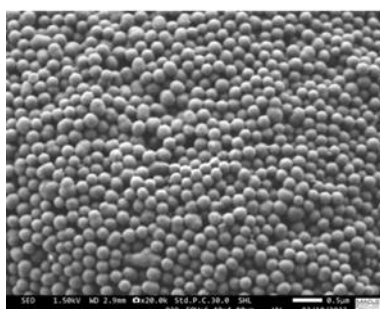
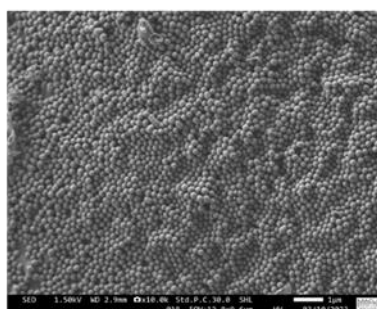


Figure 178 : Les deux voies de synthèses de la PDA²⁸⁸

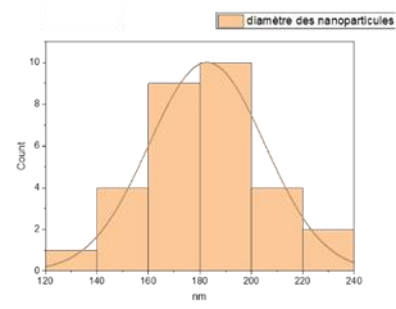
Les nanoparticules de PDA que nous avons obtenues ont ensuite été caractérisées par Microscopie à Balayage Electronique (MEB) par la plateforme MACLE-CLV (Campus CRNS-Université d'Orleans). Ces analyses (Figure 179) nous ont permis de déterminer la taille et la dispersité des particules, comprises entre 200 et 300 nm. Elles ont également permis de confirmer que nos synthèses étaient reproductibles d'un point de vue granulométrique.



Lot 1



Lot 1



Lot 1

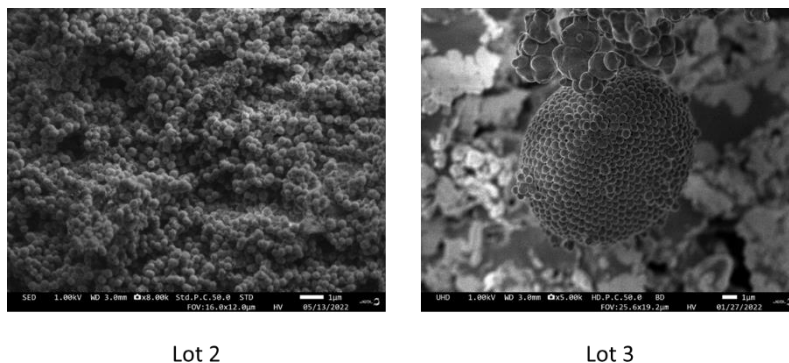


Figure 179 : Analyse MEB de trois lots de Polydopamine (Lot 1 et Lot 2, d = 180-200 nm et lot 3, d = 280 nm)

2.2. Synthèse de poly-(*N*-méthacrylamide)dopamine

Après avoir réussi à synthétiser nos particules de PDA en contrôlant leur taille, nous avons voulu créer des nanoparticules de polydopamine ayant des fonctionnalités acrylates à leur surface permettant la création d'une couche polymérique de faible épaisseur autour des nanoparticules. Pour ce faire deux options s'offrent à nous (Figure 180) :

- ✓ La création d'un nouveau monomère dérivé de la dopamine, suivi de sa polymérisation qui sera présenté par la suite.
- ✓ La modification de surface des nanoparticules de PDA

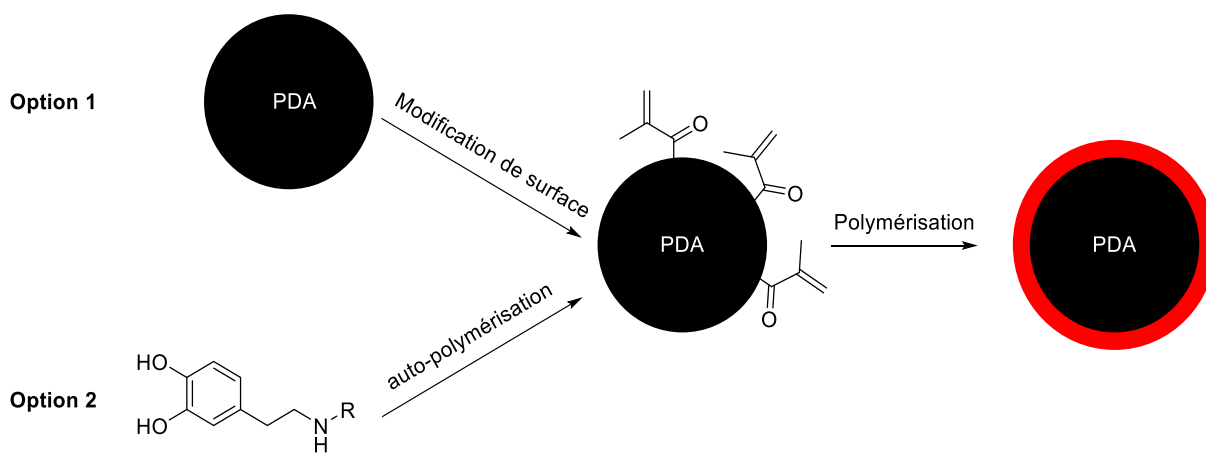


Figure 180 : Polymérisation des particules dérivées de PDA.

2.2.1. Synthèse de la *N*-méthacrylamide dopamine

Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur le développement d'un nouveau monomère. Le choix s'est porté sur la *N*-méthacrylamide dopamine **131** qui a été synthétisée comme suit (Schéma 22). Pour l'obtenir, l'acide méthacrylique **114** est, dans un premier temps, activé par un groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage *N*-*N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le THF pendant 6 h à température ambiante. Cet intermédiaire **130** est ensuite engagé directement avec la dopamine en présence de bicarbonate de sodium pour obtenir le produit désiré

N-substitué avec un rendement de 53%. La dopamine **128** étant sensible au dioxygène de l'air couplé aux conditions basiques, le solvant de la réaction doit être dégazé avant l'ajout de dopamine, puis après ajout de la base et la réaction doit s'effectuer sous atmosphère inerte. Ces précautions sont nécessaires pour empêcher l'auto-polymérisation de la dopamine et favoriser la réaction avec le composé **131**.

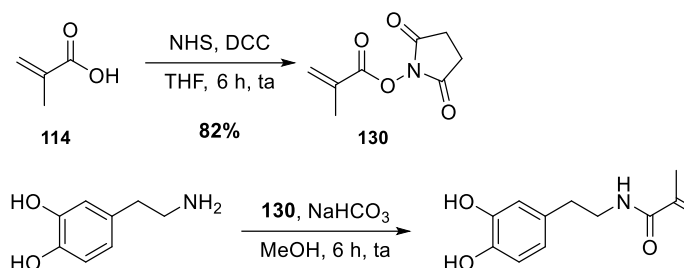


Schéma 22 : Synthèse de la *N*-méthacrylamide dopamine **131**

Une analyse HMBC (Annexe 12) nous a permis de confirmer que l'acide méthacrylique a bien été introduit sur la fonction amine de la dopamine et non sur les fonctions phénols.

2.2.2. Polymérisation de la *N*-méthacrylamide dopamine

Le composé **131** a ensuite été engagé dans une réaction de polymérisation en utilisant les conditions établies au préalable pour la dopamine (cf. paragraphe 2.1.) Cependant la quantité de poudre récupérée après les étapes de dialyse et de lyophilisation s'est avérée très faible (Schéma 23).

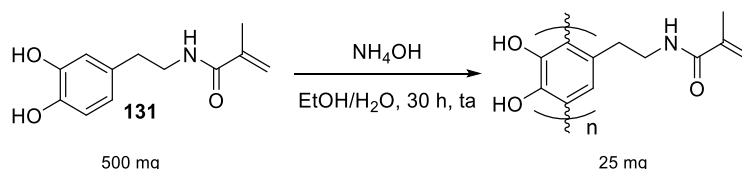


Schéma 23 : Synthèse des nanoparticules de poly(*N*-méthacrylamide)dopamine

En effet, la substitution de l'atome d'azote de la dopamine affecte la formation de l'intermédiaire clé, DHI **129**, responsable de la polymérisation de la dopamine.²⁸⁹ Land *et al.*²⁹⁰ ont montré que l'oxydation de différents dérivés de la dopamine sur la fonction amine ne conduit pas à leur polymérisation mais le plus souvent à la formation de 2-hydroxy-*para*-quinoneméthane. L'exemple qui se rapproche le plus de notre structure est l'oxydation de la *N*-dopamine acétamide **132** qui conduit à la formation du dérivé 2-hydroxy-*para*-quinoneméthane, **134** (Schéma 24 (a)). Plus surprenant, certains dérivés *N*-dopamine (**136** et **137**) conduisent à la cyclisation en produits benzothiazépine (**138**, Schéma 24 (b)) ou spiro (**139**, Schéma 24 (c)).

²⁸⁹ Mrówczyński, R.; Markiewicz, R.; Liebscher, J. Chemistry of Polydopamine Analogues. *Polym. Int.* **2016**, *65*, 1288–1299.

²⁹⁰ Land, E. J.; Perona, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. Dopamine Quinone Chemistry: A Study of the Influence of Amide, Amidine and Guanidine Substituents [-NH-CX-Y] on the Mode of Reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 944.

En complément de ces observations, il est intéressant de noter que dans la littérature, le composé **131** a été utilisé comme monomère ou réticulant dans la synthèse d'hydrogels,^{291,292} ayant une application en neurosciences pour mesurer l'activité du cerveau, mais jamais pour former des structures 3D d'analogues de PDA.

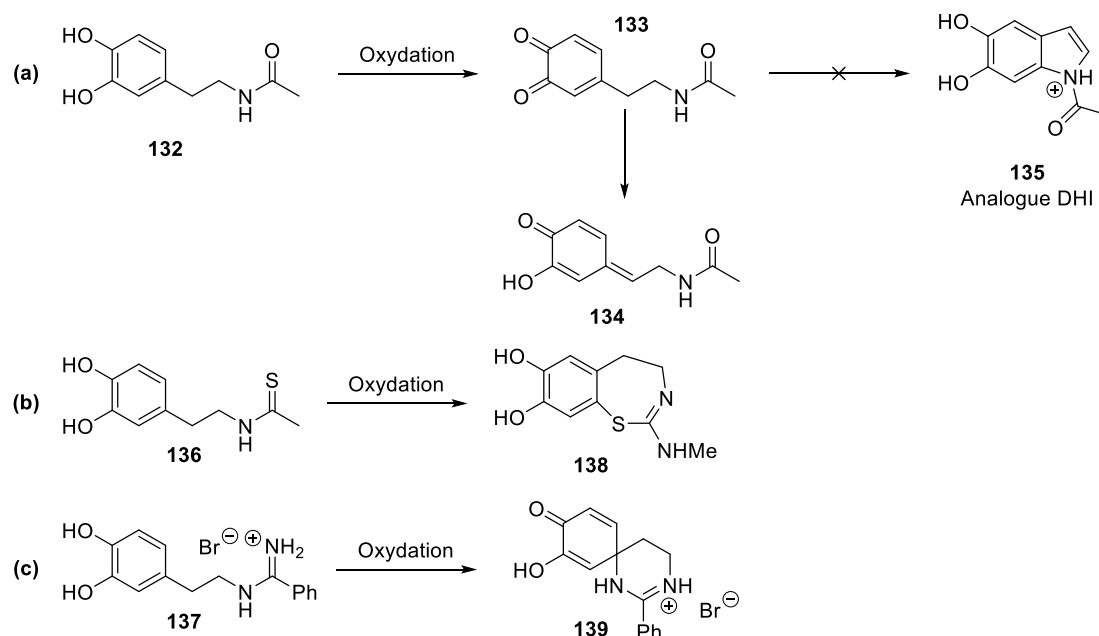


Schéma 24 : Oxydations de dérivés *N*-dopamine²⁹⁰

2.2.3. Synthèse d'un copolymère à base de dopamine et *N*-méthacrylamide dopamine

En se basant sur ces observations et sur la littérature, une approche alternative a été envisagée pour l'obtention de nanoparticules de poly(*N*-méthacrylamide)dopamine. En effet, des copolymères de PDA ont été synthétisés à partir de dopamine et d'analogues de dopamine.²⁸⁹ Parmi les différentes synthèses, celle de Gao *et al.*²⁹³ a attiré notre attention. En effet, cette équipe a synthétisé un copolymère en utilisant la dopamine et la dopamine lactosylée (DA-L) **140** qui est un dérivé possédant une fonctionnalité amide, tout comme le composé **131** (Schéma 25).

²⁹¹ Xue, J.; Zhang, Z.; Nie, J.; Du, B. Formation of Microgels by Utilizing the Reactivity of Catechols with Radicals. *Macromolecules*. **2017**, *50*, 5285–5292.

²⁹² Liu, L.; Liu, Y.; Tang, R.; Ai, J.; Ma, Y.; Chen, Y.; *et al.* Stable and Low-Resistance Polydopamine Methacrylamide-Polyacrylamide Hydrogel for Brain-Computer Interface. *Sci. China Mater.* **2022**, *65*, 2298–2308.

²⁹³ Gao, Y.; Wu, X.; Zhou, L.; Su, Y.; Dong, C.-M. A Sweet Polydopamine Nanoplatform for Synergistic Combination of Targeted Chemo-Photothermal Therapy. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 916–922.

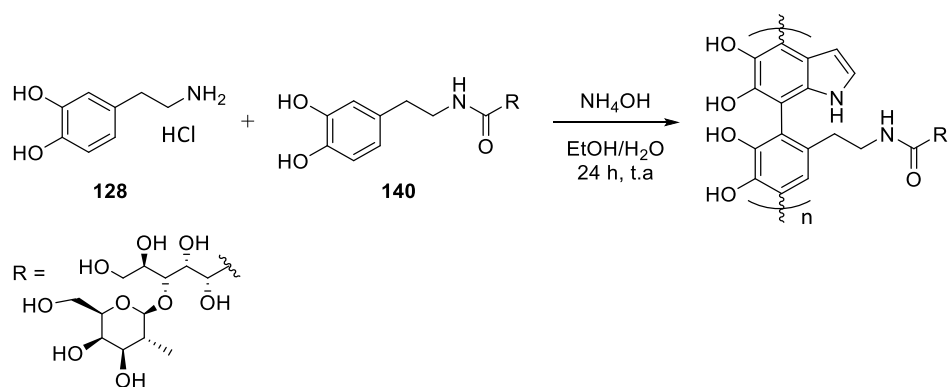


Schéma 25 : Synthèse d'un copolymère de P(DA-L)DA²⁹³

Ainsi, nous avons envisagé de créer un copolymère en utilisant la dopamine et le composé *N*-méthacrylamide dopamine **131** comme monomère avec un ratio 9/1 (m/m). Pour ce faire, la polymérisation a été initiée (Schéma 26) dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la synthèse de la polydopamine seule (cf. paragraphe 2.1). Après dialyse et lyophilisation, une analyse infrarouge de la poudre a été effectuée. Cependant, le spectre infrarouge (IR) du copolymère (Annexe 16) était identique à celui de la polydopamine (Annexe 15), traduisant la non-incorporation de notre second monomère dans les nanoparticules. A titre d'information, les spectres IR de la dopamine et de la *N*-méthacrylate dopamine sont représentés en Annexe 13 et Annexe 14.

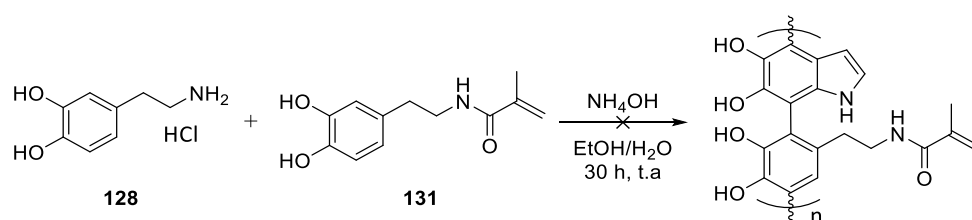


Schéma 26 : Synthèse du copolymère polydopamine-poly(*N*-méthacrylamide)dopamine

Face à cette difficulté d'obtenir des nanoparticules comportant une fonctionnalité polymérisable *via* le dérivé *N*-méthacrylamide dopamine **131**, un autre analogue de la polydopamine a été utilisé.

2.3. Synthèse de L-polydopamine (L-PDA)

La polydopamine a été rapportée comme ayant l'habilité d'absorber et de désorber l'ADN en fonction du pH de la solution lorsque ce polymère est utilisé en enrobage.²⁹⁴ Cependant, dans des conditions acides ou basiques, il a été observé que la polydopamine pouvait se dégrader et libérer de la dopamine. Au contraire, la L-polydopamine préparée à partir de la Lévodopa (L-DA) **141** a montré une meilleure stabilité tout en présentant les mêmes propriétés que la dopamine²⁹⁵ (Figure 181).

²⁹⁴ Zhong, Z.; Yao, X.; Gao, X.; Jia, L. Polydopamine-Immobilized Polypropylene Microfuge Tube as a pH-Responsive Platform for Capture/Release of DNA from Foodborne Pathogens. *Anal. Biochem.* **2017**, *534*, 14–18.

²⁹⁵ Park, H.-J.; Cho, H.; Jung, H. S.; Cho, B. H.; Lee, M.-Y. Development of a DNA Isolation Device Using Poly(3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanine)-Coated Swab for on-Site Molecular Diagnostics. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8144.

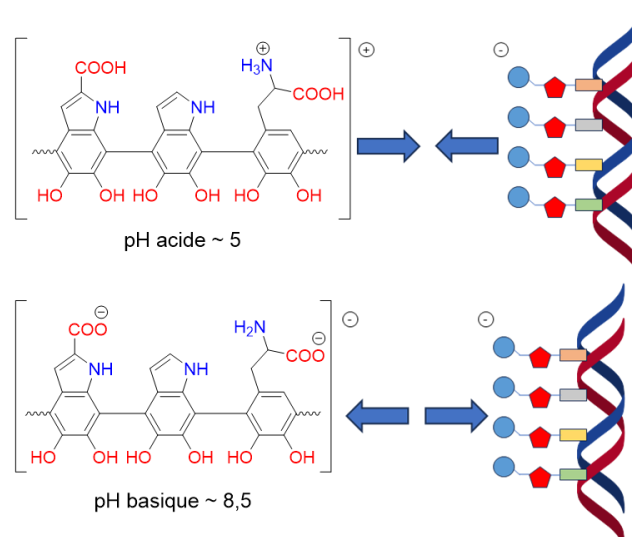


Figure 181 : Propriété de la L-PDA en fonction du pH (En haut adsorption et en bas désorption)

En utilisant ces propriétés, nous pourrions utiliser la L-PDA comme surface de reconnaissance du motif phosphonate du ténofovir par échange d'ions. Dans ce but, la synthèse de la L-PDA (Schéma 27) a été effectuée dans les mêmes conditions basiques que celles des nanoparticules de PDA (cf. paragraphe 2.1).

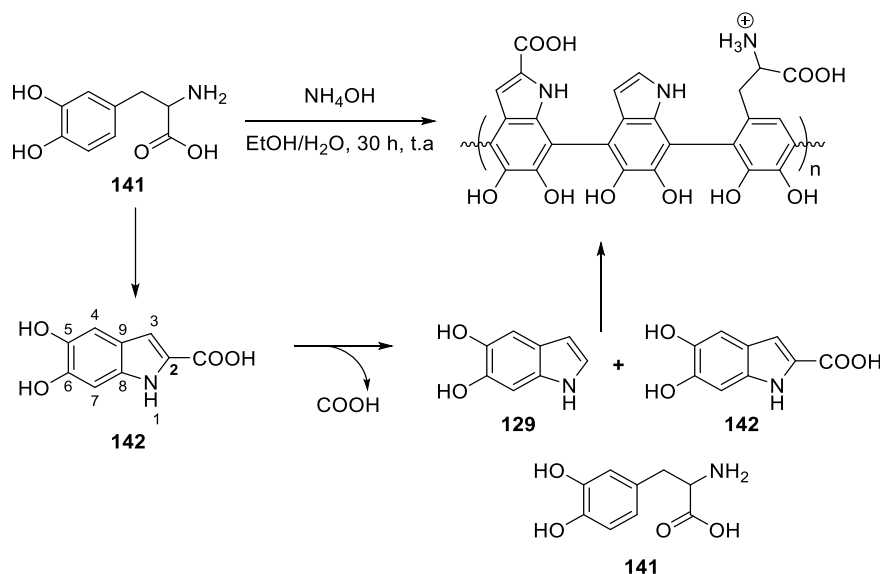


Schéma 27 : Synthèse de la L-PDA

Lors de la polymérisation de la L-Dopa **141**, les étapes d'oxydation de celle-ci conduisent à la formation du dérivé 5,6-hydroxyindole **142** possédant une fonction carboxylique en position 2. Cet intermédiaire peut subir une décarboxylation et être converti en DHI **129**. Le polymère obtenu est donc un enchaînement aléatoire de noyau 5,6-dihydroxyindole possédant ou non une fonction carboxylique en position 2²⁹⁶ et de Lévodopa n'ayant pas été oxydée. Après lyophilisation et dialyse, ce matériau a été

²⁹⁶ Tan, X.; Gao, P.; Li, Y.; Qi, P.; Liu, J.; Shen, R.; *et al.* Poly-Dopamine, Poly-Levodopa, and Poly-Norepinephrine Coatings: Comparison of Physico-Chemical and Biological Properties with Focus on the Application for Blood-Contacting Devices. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 285–296.

conditionné en milieu acide avec une solution d'acétate d'ammonium à pH \sim 5. Après séchage, la L-PDA a ensuite été mise en contact avec un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) contenant la paire d'ions ténofovir + DMAEM **97**, permettant de solubiliser le ténofovir dans une grande proportion d'acétonitrile. Après agitation à 25 °C pendant 16 h, la suspension est centrifugée et le surnageant est analysé par HPLC-UV. Par comparaison des aires entre la solution mère et le surnageant nous pouvons affirmer que le ténofovir a bien été adsorbé à la surface des particules à hauteur de 90% (Figure 182).

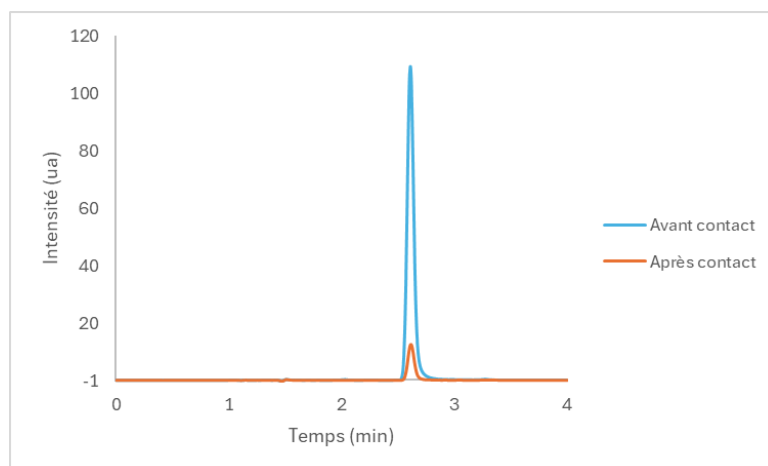


Figure 182 : Chromatogrammes du ténofovir avant et après contact avec la L-PDA (260 nm)

En effet, après contact, le DMAEM, observé à 210 nm, est présent dans les mêmes proportions qu'initialement, confirmant ainsi l'échange d'ions entre le ténofovir issu de la paire d'ions avec le DMAEM et l'ammonium présent en surface de la L-PDA. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la différence de pKa (Figure 183) entre le ténofovir et le DMAEM est plus faible que celle entre le ténofovir et la lévodopa (Δ pKa (Ténofovir- DMAEM) = 7,11 ; Δ pKa (Ténofovir- Levodopa) = 7,75).

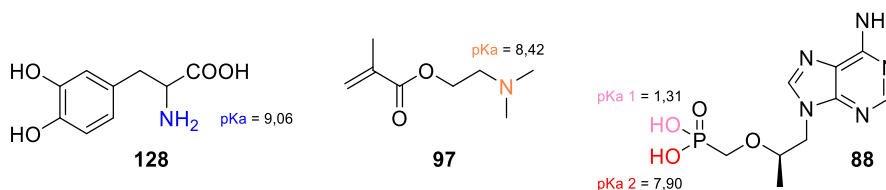


Figure 183 : Estimation des pKa par le logiciel Marvin Sketch® de la lévodopa **128**, du DMAEM **97** et du ténofovir **88**

Malgré ces résultats prometteurs, le développement de ces matériaux n'a pas été poursuivi car l'analyse MEB des nanoparticules de L-PDA a montré des objets non sphériques ayant une taille moyenne irrégulière de plusieurs micromètres (Figure 184), rendant l'utilisation des particules inappropriée pour la formulation d'un médicament.

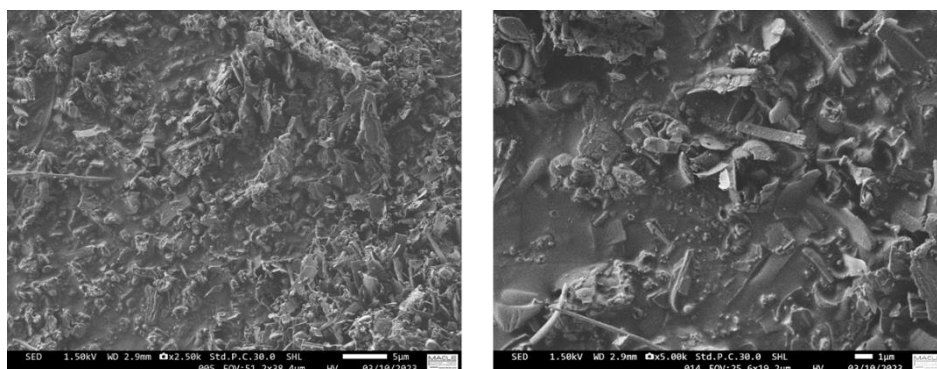


Figure 184 : Clichés de microscopie de la L-PDA

Pour conclure cette partie synthèse de dérivé de polydopamine, nous pouvons affirmer **un savoir-faire dans la synthèse de nanoparticules de polydopamine de tailles comprises entre 200 et 300 nm**. Ces synthèses sont reproductibles et leur montée en échelle est possible. Cependant, l'obtention de nanoparticules ayant des fonctionnalités polymérisables sur leur surface n'a pas abouti ni par copolymérisation ni par polymérisation du monomère dérivé seul. La polymérisation de la L-Dopa a conduit à des particules étant capables d'adsorber le ténofovir à sa surface mais ayant une morphologie non adaptée pour la voie d'administration visée. Parmi ces 3 matériaux étudiés, seule la polydopamine a conduit à des nanoparticules sphériques et a été sélectionnée comme cœur pour la création du core-shell. Cependant, en surface, les particules de polydopamine ne présentent ni fonction polymérisable, ni fonctionnalité pouvant reconnaître le ténofovir. Ainsi **une modification de surface a été nécessaire pour introduire ces fonctionnalités**.

3. Modification de surface de la polydopamine

La polydopamine peut être facilement dérivée, sur sa surface, *via* ses nombreux groupes fonctionnels tels que les fonctions amine, quinone ou encore cathécol.^{289,297} La polydopamine peut réagir aussi bien avec des nucléophiles (amine, thiol) que des électrophiles (lactone, acide carboxylique) et peut également complexer des métaux.

Parmi les 3 sites disponibles de modification sur la surface des nanoparticules de PDA, nous nous sommes focalisés sur la fonctionnalité amine qui peut réagir avec un grand nombre d'électrophiles²⁹⁷ par des réactions d'acylation, d'addition d'aza-Michael et par les formations d'azométhine ou de groupe azido. Ces derniers peuvent ensuite être engagés dans une réaction de chimie de cycloaddition avec un alcyne, chimie dite « click » (Figure 185). La dérivation de surface par la fonctionnalité amine permet donc la formation d'un large panel de nanoparticules dérivées.

²⁹⁷ Liebscher, J. Chemistry of Polydopamine – Scope, Variation, and Limitation. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**,31–32, 4976–4994.

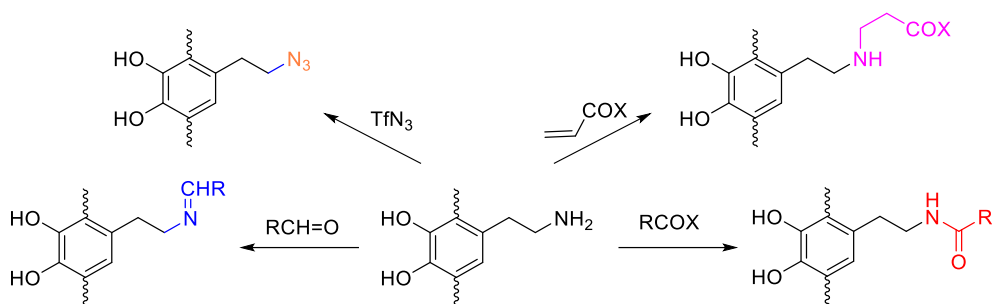


Figure 185 : Réactivité de la fonction amine de la PDA

Concernant ces modifications, nous avons choisi celle créant une fonctionnalité amide en raison de sa facilité à être mise en œuvre. Pour ce faire, des dérivés de l'uracile ont ainsi été synthétisés afin de modifier la surface des billes de polydopamine, et ainsi reconnaître l'adénine du ténofovir.

3.1. Synthèse des électrophiles

Notre objectif était, dans un premier temps, la synthèse de dérivés pyrimidiques portant une fonction acide carboxylique en N_1 (Figure 186) afin d'effectuer un couplage peptidique avec la polydopamine. En effet, Zhan *et. al.*²⁹⁸ ont dérivé la polydopamine avec l'éritadénine *via* sa fonction carboxylique afin de reconnaître un dérivé de la thymine. Dans notre cas, nous souhaitons faire l'inverse, c'est-à-dire dériver la polydopamine avec un analogue d'uracile susceptible de reconnaître l'adénine du ténofovir.

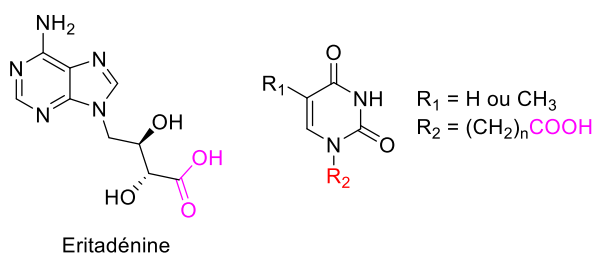


Figure 186 : Dérivés pyrimidiques souhaités

Nous avons décidé de modifier les bases pyrimidiques en N_1 en utilisant un espaceur de 1 carbone entre le cycle et la fonction acide carboxylique. Ceci permettrait d'avoir de la flexibilité tout en préservant de l'élimination le groupement acide carboxylique si ce dernier était directement greffé sur l'azote N_1 (cf. partie A, paragraphe 3).

En se basant sur les travaux de Qu *et al.*,²⁹⁹ qui ont développé une *N*-(alkoxycarbonylméthyle) nucléobase par activation micro-ondes, la synthèse de dérivés d'uracile a été réalisée. Les intermédiaires **143** et **144** sont obtenus par une réaction entre le chloroacétate de méthyle et la base correspondante, en présence de K_2CO_3 , par activation micro-ondes à 160 °C pendant 8 min, avec des

²⁹⁸ Zhan, Q.; Shi, X.; Zhou, J.; Zhou, L.; Wei, S. Drug-Controlled Release Based on Complementary Base Pairing Rules for Photodynamic–Photothermal Synergistic Tumor Treatment. *Small* **2019**, *15*, 1803926.

²⁹⁹ Qu, G.; Zhang, Z.; Guo, H.; Geng, M.; Xia, R. Microwave-Promoted Facile and Efficient Preparation of *N*-(Alkoxycarbonylmethyl) Nucleobases – Building Blocks for Peptide Nucleic Acids. *Molecules* **2007**, *12*, 543–551.

rendements de 31-33% (Schéma 28). Les rendements modestes de cette réaction peuvent s'expliquer par la formation des produits **145** et **146** de di-alkylation en *N1* et *N3* observés pour la thymine et l'uracile (Figure 187).

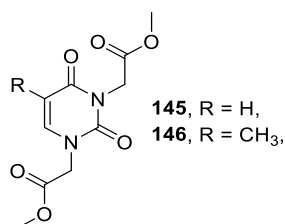


Figure 187 : Produits secondaires observés dans la réaction de *N*-acylation

Ces intermédiaires sont ensuite engagés dans une réaction de saponification en condition basique avec de l'hydroxyde de sodium dans le méthanol. Les composés **147** et **148** sont obtenus avec des rendements quasi-quantitatifs (Schéma 28). Les rendements globaux sur deux étapes sont de 31%.

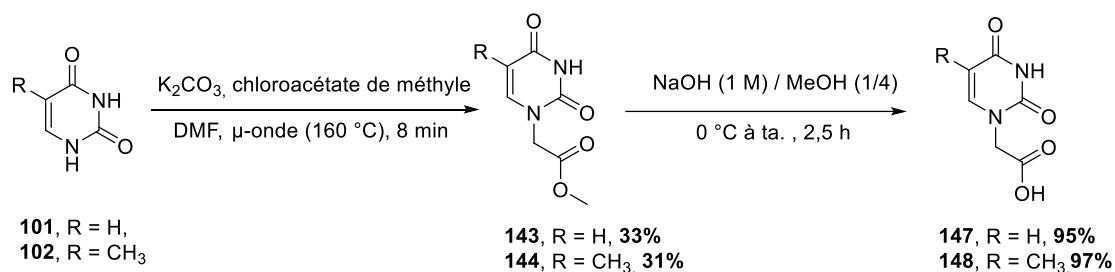


Schéma 28 : Synthèse des dérivés *N1*-acétate pyrimidique

Les analyses RMN (1D et 2D) du composé **144** nous ont permis de confirmer la formation du composé *N1*-alkylé. En effet, l'analyse HMBC (Figure 188) nous montre une corrélation entre les hydrogènes du CH₂ avec le H6 et le C2 de la thymine. Les mêmes corrélations sont observées avec le dérivé uracile **143**.

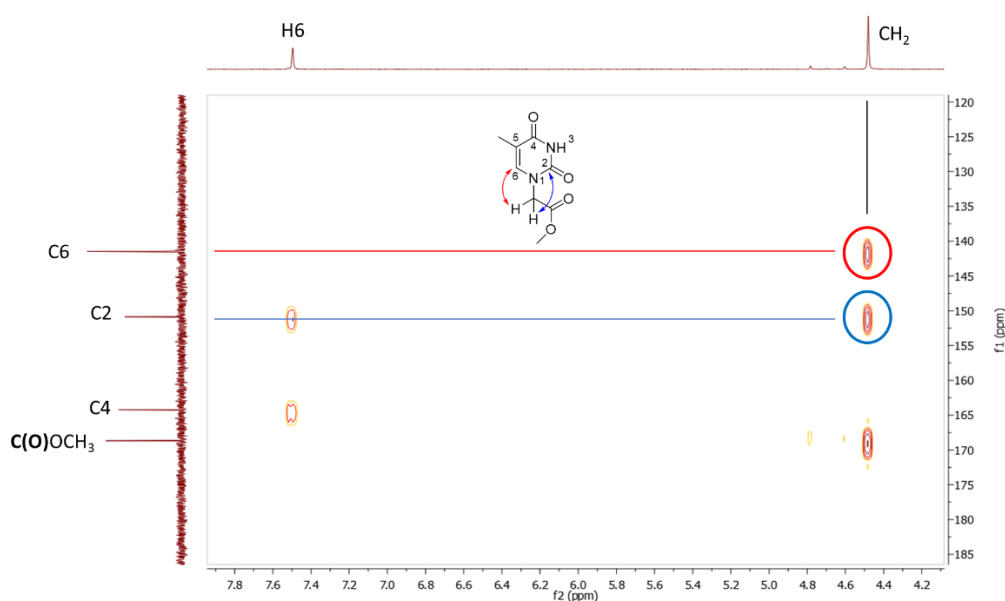


Figure 188 : Corrélations HMBC du composé **144**

Afin d'augmenter le rendement de la synthèse de ces dérivés, il a été envisagé une synthèse en une seule étape.³⁰⁰ En effet, la réaction en milieu basique de la base pyrimidique correspondante avec l'acide bromoacétique, pendant 5 h, suivi d'une neutralisation acide pendant une nuit, permet d'obtenir les composés **147** et **148** avec des rendements de 44-46% (Schéma 29).

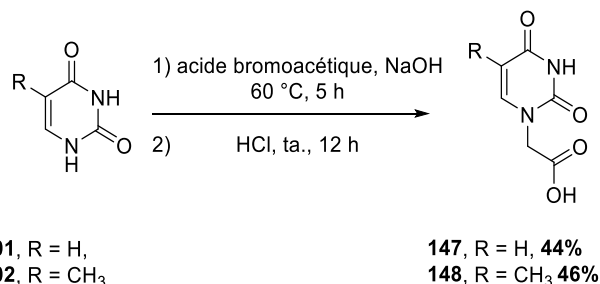


Schéma 29 : Synthèse des dérivés N1-acide-acétique pyrimidique en une étape

Cette étape, permettant d'obtenir ces composés avec des rendements acceptables, sera privilégiée par rapport à la précédente voie de synthèse. De plus, la purification des composés obtenus par cette voie de synthèse nécessite seulement une recristallisation et non une purification sur gel de silice.

3.2. Modification de la surface des nanoparticules de PDA

Une fois les dérivés **147** et **148** obtenus, nous avons pu envisager la modification de surface des nanoparticules de PDA. En s'inspirant du protocole décrit par Zhan *et al.*²⁹⁸, la fonction acide carboxylique du composé **148** a été activée par le groupement NHS en présence de DCC dans le DMSO à 25 °C pendant 12 h. L'intermédiaire **149** est ajouté à une suspension de nanoparticules de PDA dans l'eau. Après 24 h d'agitation à 25 °C, le mélange est centrifugé et le culot formé des nanoparticules dérivées est ensuite lavé à l'eau ultra pure puis par un mélange MeOH/H₂O (9/1, v/v) (Schéma 30).

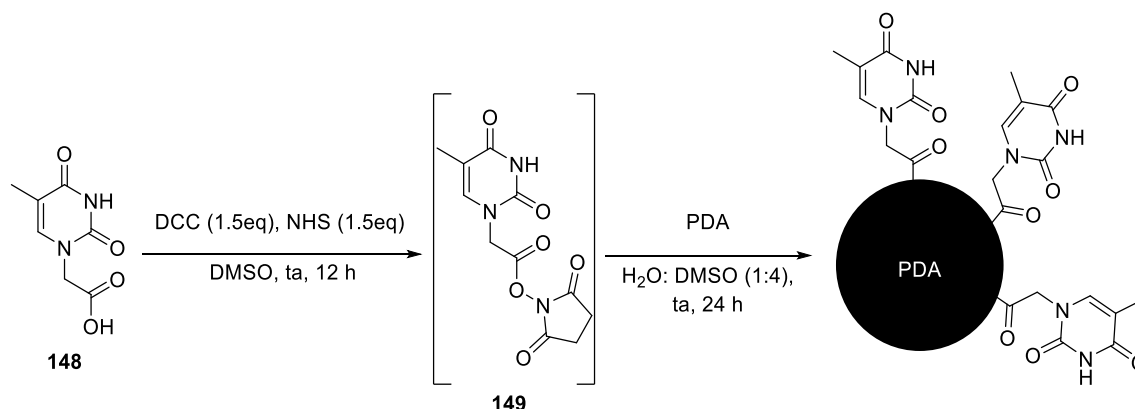


Schéma 30 : Dérivation de la polydopamine

Afin de vérifier que l'analogue de thymine se soit greffé sur les particules de polydopamine, le surnageant du milieu réactionnel est récupéré et analysé par HPLC-UV. La solution initiale de thymine

³⁰⁰ Li, D.-Z.; Zhang, Q.-Z.; Wang, C.-Y.; Zhang, Y.-L.; Li, X.-Y.; Huang, J.-T.; *et al.* Synthesis and Antitumor Activity of Novel Substituted Uracil-1'(N)-Acetic Acid Ester Derivatives of 20(S)-Camptothecins. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 1235–1246.

acide est également analysée par la même méthode que celle utilisée pour quantifier le ténofovir (cf. introduction du chapitre 4, paragraphe 2.1). La thymine étant le chromophore du composé **148**, ce dernier aura une absorbance maximale proche de 260 nm (Figure 140), qui est la longueur d'onde maximale de la thymine en solution aqueuse.²⁴⁴ Ainsi, avec une détection à 260 nm et dans ces conditions d'analyse, le composé **148** présente un temps de rétention de 3,3 min (Figure 189). Par comparaison des aires mesurées sur les différents chromatogrammes, nous pouvons donc calculer la quantité d'analogue de thymine qui s'est greffée par unité de masse de PDA.

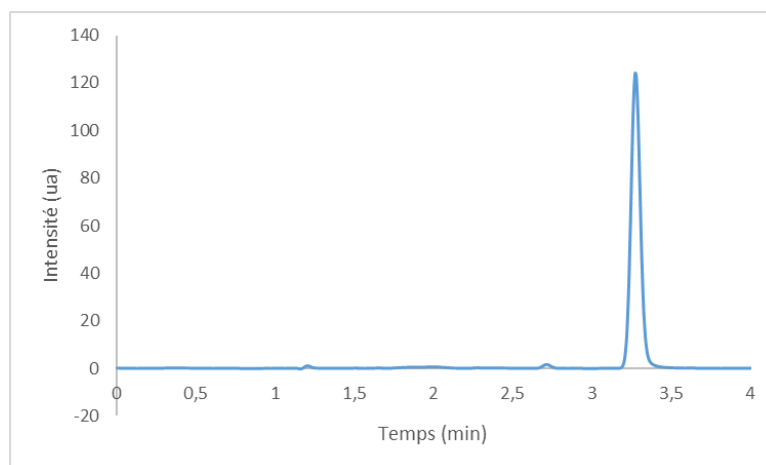


Figure 189 : Chromatogramme du composé **148** (260 nm)

Cette réaction a été réalisée plusieurs fois avec un taux de greffage variant entre 140 et 220 mg/g (0,76 et 1,20 mmol/g) de PDA. Ces nanoparticules dérivées ont ensuite été utilisées dans la synthèse de notre core-shell imprimé.

4. Synthèse du core-shell-imprimé

4.1. Vérification de l'adsorption du ténofovir

Avant de synthétiser une couche mince de polymère autour des cœurs de PDA dérivés en surface, nous avons vérifié que le ténofovir est bien reconnu par les motifs thymine et donc bien adsorbé. Cette étude a également servi à déterminer les équivalents de monomère et réticulant à ajouter pour former le complexe de pré-polymérisation.

Pour ce faire, une dizaine de milligrammes de PDA dérivée est mise en contact avec 1 mL d'une solution contenant le ténofovir ($\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et le DMAEM (1 équivalent) dans un mélange ACN/H₂O (9/1,v/v) (Figure 190).

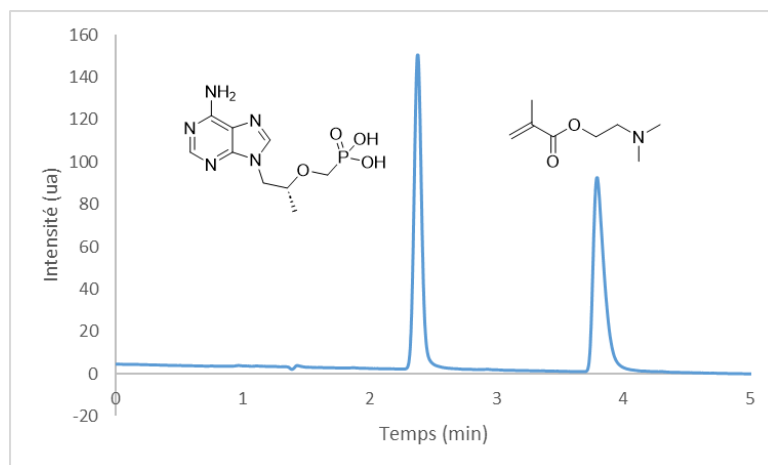


Figure 190 : Chromatogramme de la solution de ténofovir et du DAMEM (210 nm)

Cette suspension est maintenue par agitation pendant 16 h à 25 °C, puis centrifugée et le surnageant est ensuite analysé par HPLC-UV. En utilisant la gamme d'étalonnage du ténofovir (cf. introduction du chapitre 4, paragraphe 2.2), et l'analyse des chromatogrammes de la solution mère et du surnageant, nous pouvons déterminer la quantité de ténofovir adsorbée à la surface. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois pour un taux d'adsorption variant entre 0,09 mmol/g et 0,18 mmol/g. En termes d'équivalents cela correspond à une molécule de ténofovir pour 10 molécules de thymine greffées à la surface de la PDA.

4.2. Synthèse du core-shell

Après avoir vérifié que le ténofovir interagissait bien avec la surface du cœur, et calculé la quantité adsorbée par gramme de nanoparticules, nous avons engagé nos particules dans l'étape de synthèse de la couche imprimée.

Dans la synthèse du core-shell, le monomère, 2-(diméthylamino)éthyle méthacrylate **97**, joue en même temps le rôle de monomère fonctionnalisé reconnaissant le motif phosphonate du ténofovir et permet de rendre soluble le ténofovir sous forme d'un complexe dans une solution contenant une grande proportion (90%) de solvant aprotique. Cette solution aprotique est choisie pour favoriser les liaisons hydrogène entre l'adénine du ténofovir et la thymine à la surface de la PDA, formant le complexe de pré-polymérisation (Figure 191).

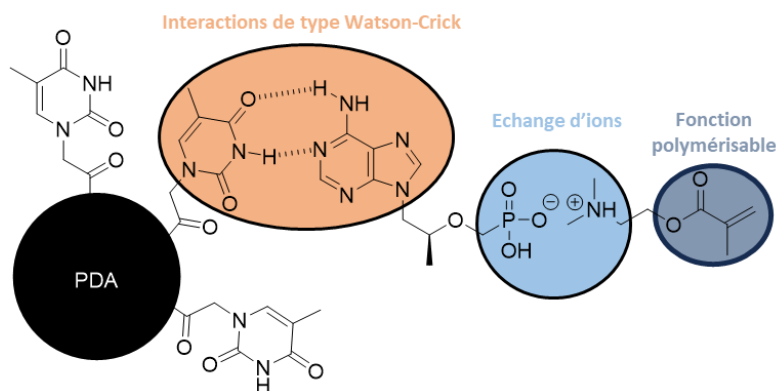


Figure 191 : Complexe de pré-polymérisation

Concernant le réticulant, notre choix s'est porté sur le 3-(acryloyl)-2-hydroxypropylméthacrylate **112** car celui-ci possède une structure similaire à l'EGDMA mais présente une fonction hydroxyle supplémentaire. Celle-ci apportera, premièrement, une hydrophilie aux nanoparticules imprimées afin de les rendre plus compatibles avec les fluides biologiques, et, deuxièmement, la capacité à créer des interactions supplémentaires de type Van der Waals et liaisons hydrogène avec notre template. Ce réticulant a par ailleurs déjà été utilisé dans la synthèse de nanoparticules de type hydrogel pour la délivrance intracellulaire de l'anticancéreux cisplatine.³⁰¹

Dans un premier temps, à une centaine de mg de particules de PDA dérivées en suspension dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) est ajoutée une solution de ténofovir et de DMAEM dans ce même solvant. Cette suspension est agitée à température ambiante pendant 6 h permettant au pré-complexe de polymérisation de se former. Après ajout du réticulant, le 3-(acryloyloxy)-2-hydroxypropyl méthacrylate **112**, et dégazage de la solution, la polymérisation est initiée par ajout d'AIBN. La réaction est maintenue à 70 °C pendant 16 h sous légère agitation. Les nanoparticules sont ensuite récupérées par centrifugation et le ténofovir est extrait par plusieurs lavages successifs de la poudre avec une solution MeOH/AcOH (9/1, v/v), puis MeOH/H₂O (9/1, v/v). Les nanoparticules obtenues présentent théoriquement dans leur couche extérieure des cavités reconnaissant sélectivement le ténofovir (Schéma 31)

Comme pour une synthèse de MIP classique, la synthèse d'un matériau référence non imprimé est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions mais sans le template.

³⁰¹ Shirakura, T.; Smith, C.; Hopkins, T. J. J.; Koo Lee, Y.-E.; Lazaridis, F.; Argyrakakis, P.; *et al.* Matrix Density Engineering of Hydrogel Nanoparticles with Simulation-Guided Synthesis for Tuning Drug Release and Cellular Uptake. *ACS Omega*. **2017**, *2*, 3380–3389.

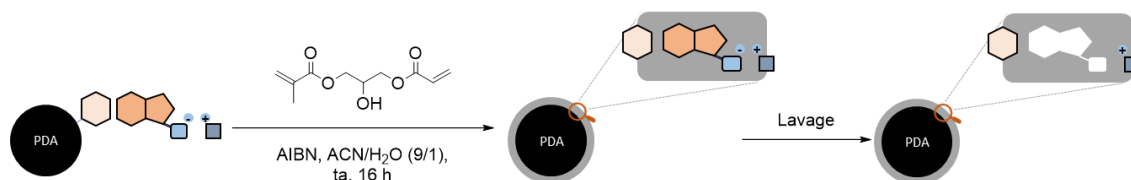


Schéma 31 : Synthèse des nanoparticules core-shell imprimées

Ainsi, plusieurs synthèses de core-shell ont été réalisées en faisant varier les conditions : la concentration des nanoparticules, le nombre d'équivalent de réticulant ainsi que le monomère fonctionnel utilisé. Les différentes formulations sont répertoriées dans le Tableau 52.

Tableau 52 : Synthèses des différents core-shell

Formulations	Polymères	m _{PDA}	Monomère fonctionnel greffé	Ténofovir	DMAEM	Réticulant AHPM	AIBN	Porogène ACN/H ₂ O
1	Core-Shell MIP-1	150 mg	<i>N1</i> -acide-acétique thymine 148	13,7 μmol (1 eq.)	13,7 μmol (1 eq.)	0,64 mmol (47 eq.)	9%/mol _{tot}	8 mL (9/1)
	Core-Shell NIP-1							
2	Core-Shell MIP-2	100 mg	<i>N1</i> -acide-acétique uracile 147	10,8 μmol (1 eq.)	10,8 μmol (1 eq.)	0,20 mmol (18,6 eq.)	8%/mol _{tot}	8 mL (1/1)
	Core-Shell NIP-2							
3	Core-Shell MIP-3	110 mg	<i>N1</i> -acide-acétique thymine 148	19,7 μmol (1 eq.)	19,7 μmol (1 eq.)	0,36 mmol (18,4 eq.)	9%/mol _{tot}	110 mL (9/1)
	Core-Shell NIP-3							

Formulation 1 : La synthèse a été réalisée en utilisant une quantité élevée de réticulant dans un volume assez réduit de solvant porogène composé à 90% d'acétonitrile et à 10% d'eau. Il a été observé, après centrifugation, que le résultat de la synthèse du NIP est un mélange de deux types de poudres de teinte et de densité différentes, après centrifugation.

Les nanoparticules issues de cette formulation ont été analysées en Microscopie Electronique à Transmission (MET) par la plateforme MACLE-CLV (Campus CRNS- Université d'Orleans). Ces analyses permettent d'observer la présence d'une fine couche polymérique d'épaisseur moyenne d'environ 20 nm autour des particules de PDA (Figure 192, photo de gauche).

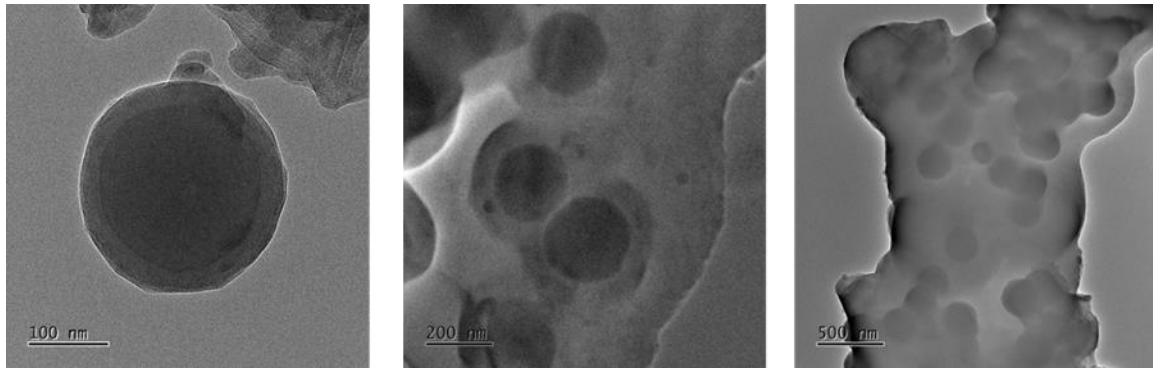


Figure 192 : Analyses MET du MIP-1 (Gauche et milieu) et du NIP-1 (droite)

Concernent le NIP, l'analyse microscopique semble montrer que la fine couche polymérique englobe plusieurs nanoparticules de PDA. Ces dernières sont agrégées et prises dans une gangue de polymère. La différence de morphologie observée entre les particules de MIP et de NIP peut s'expliquer par leur synthèse. Les nanoparticules de PDA dérivées ne possèdent pas sur leur surface des fonctions polymérisables ; les seules molécules pouvant être polymérisables dans le milieu de synthèse sont le DMAEM et le réticulant. Dans la **synthèse du MIP**, chaque **monomère** sous la forme ammonium est **associé à une molécule de ténofovir**, formant un complexe. Ce complexe va ensuite s'associer avec la base thymine présente à la surface de la PDA, par le biais de la base adénine du ténofovir, **positionnant donc la fonction acrylate polymérisable du monomère amine proche de la surface des nanoparticules**. Concernant le NIP, le monomère acrylate fonctionnalisé amine tertiaire ne va pas se concentrer naturellement autour des nanoparticules comme on peut l'imaginer pour le MIP. Cela peut provoquer la synthèse simultanée d'une couche de polymère autour du noyau de type PDA, formant ainsi des nanoparticules de type core-shell, et de nanoparticules formées par polymérisation du monomère amine et du réticulant sans noyau PDA. Ceci pourrait expliquer les deux populations de particules trouvées après la centrifugation du milieu de synthèse du NIP. De plus, un milieu concentré, comme c'est le cas ici, où un volume de porogène faible associé à un nombre d'équivalents de réticulant élevé peut favoriser la synthèse d'un réseau polymérique tridimensionnel emprisonnant des nanoparticules de PDA en son sein, type « pont de grenouille verte » (Figure 192, photo de droite).

Formulation 2 : La synthèse a été réalisée avec une PDA dérivée uracile et un nombre d'équivalent réduit de réticulant ainsi qu'un porogène constitué d'un mélange ACN/H₂O (1/1, v/v). La modification de ces paramètres permet d'évaluer l'influence de la base nucléique greffée sur la surface de la PDA, de la composition du porogène ainsi que de la quantité de réticulant. Le mélange ACN/H₂O a été choisi pour que le porogène et le milieu de recapture du ténofovir, sous la forme d'un mélange de solvants, soient identiques. Ce choix va permettre, théoriquement, de favoriser la reconnaissance du matériau imprimé vis-à-vis du template, lors de l'étape de recapture et permettre d'augmenter la sélectivité du

MIP par rapport au NIP. Sur les clichés (Figure 193), les analyses microscopiques montrent une agglomération des nanoparticules qui sont prises dans une couche de taille supérieure à 5 μm . Sur ces images, contrairement aux précédentes, nous n’observons pas, dans le MIP des particules individuelles possédant une fine couche en leur surface. Il semblerait que l’ajout d’une importante proportion d’eau dans la synthèse, influence l’agrégation des nanoparticules, pour former des « blocs » emprisonnés par le réticulant.

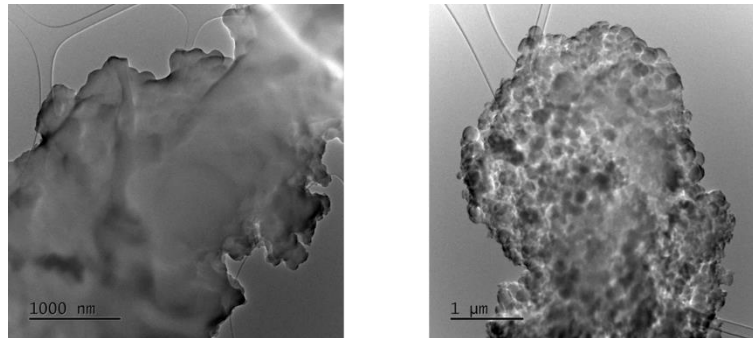


Figure 193 : Analyses TEM du MIP-3 (Gauche) et du NIP-3 (droite)

Au vu de ces analyses microscopiques, l’étude de ces matériaux n’a pas été poursuivie.

Formulation 3: La synthèse a été réalisée avec un nombre d’équivalent de réticulant identique à la formulation 2 mais en utilisant, cette fois-ci, un volume permettant d’avoir 1 mg de PDA/mL, soit un milieu plus dilué. Cette synthèse a pour but d’étudier l’influence de la concentration des nanoparticules sur la morphologie du core-shell. (Les analyses TEM sont en cours).

Pour les formulations 1 et 3, les études de recapture et le tracé des isothermes d’adsorption, entre les matériaux imprimés et non imprimés, ont été réalisés afin de nous permettre de choisir la formulation présentant la meilleure sélectivité envers le ténofovir. En amont de ces études, le ténofovir est extrait suivant le même protocole de lavage qu’utilisé pour la polymérisation par précipitation (cf. partie A, paragraphe 5.3.3).

5. Isothermes d’adsorption

Les caractérisations de l’affinité et de la capacité des polymères obtenus avec le ténofovir ont été menées par batch (cf. partie expérimentale, paragraphe 8). L’équation utilisée pour calculer les quantités adsorbées de ténofovir par nos matériaux est la même que celle décrite au paragraphe 5.3.5 de la partie A (cf. équation 15).

5.1. Etude de la formulation 1

Afin d'étudier l'influence du solvant de recapture sur ces matériaux de type core-shell, cette étude a été menée dans 100% d'eau et dans le mélange ACN/H₂O (1/1, v/v). Les résultats sont présentés dans le Tableau 53.

Tableau 53 : Résultats de recapture de la formulation 1

Echantillons*	Masse de MIP/NIP (mg)	C _{ténofovir} solution en contact (mM)	C _{ténofovir} (mM) équilibre	Quantité adsorbée (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
<i>Recapture dans 100% H₂O</i>					
1	6,23	1,03	2,13.10 ⁻¹	15,48	0,91
	6,27		1,72.10 ⁻¹	17,03	
2	6,12	1,03.10 ⁻¹	5,24.10 ⁻³	2,43	0,95
	6,08		4,40.10 ⁻⁴	2,30	
3	7,60	1,03.10 ⁻²	Nd*	0,24	1
	7,25		Nd*	0,24	
<i>Recapture dans 50% ACN et 50% H₂O</i>					
1	6,71	1,06	1,90.10 ⁻¹	18,62	1,25
	8,61		1,67.10 ⁻¹	14,90	
2	9,23	1,06.10 ⁻¹	Nd*	1,65	1,04
	8,83		8,84.10 ⁻³	1,58	
3	7,43	1,06.10 ⁻²	Nd*	0,2	2,80
	8,84		6,10.10 ⁻³	0,07	

* Le volume de la solution en contact de la poudre est de 0,5 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

* Valeur en dessous de la limite de détection.

Nous pouvons remarquer que le rapport des quantités adsorbées par les deux matériaux (MIP et NIP) est plus élevé quand la recapture est effectuée dans le mélange binaire, quelle que soit la concentration du ténofovir. De ces résultats, nous pouvons conclure que la reconnaissance de nos matériaux imprimés est impactée par le solvant de recapture utilisé. Comme attendu, le solvant polaire protique, l'eau, défavorise la reconnaissance du ténofovir par nos polymères. En effet, les interactions de type liaison hydrogène entre l'adénine du ténofovir et la thymine présente en surface de nos nanoparticules sont défavorisées en présence d'eau. L'interaction prépondérante étant l'échange d'ions entre le phosphonate et la fonctionnalité amine.

Par manque de matière issu de la formulation 1, les isothermes d'adsorptions n'ont pas pu être complétées.

5.2. Etude de la formulation 3

5.2.1. Recapture du ténofovir

Une fois le ténofovir extrait, l'étude de recapture est menée et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 54.

Tableau 54 : Résultats de recapture de la formulation 3

Echantillons*	Masse (mg)	C _{Tenofovir} (mM)	C _{Tenofovir} (mM) eq	Q (mg/g)	Q _{MIP} /Q _{NIP}
1	1,97	1,70	1,36	48,91	1,29
	2,17		1,41	37,76	
2	2,09	1,50	1,20	40,93	1,14
	2,03		1,24	35,91	
3	2,06	1,30	1,04	36,50	1,25
	2,00		1,10	29,29	
4	2,13	0,99	0,773	29,77	1
	2,02		0,785	29,29	
5	1,93	0,70	0,544	23,73	1,11
	2,15		0,543	21,38	
6	2,05	0,50	0,353	21,17	1,44
	2,00		0,402	14,68	
7	2,21	0,30	0,232	8,85	1,19
	2,00		0,248	7,45	
8	2,01	9,02.10 ⁻²	8,00.10 ⁻²	1,46	1
	2,07		7,97.10 ⁻²	1,46	
9	2,3	7,95.10 ⁻²	7,18.10 ⁻²	0,96	1,33
	2,02		7,44.10 ⁻²	0,72	
10	1,98	7,03.10 ⁻²	6,74.10 ⁻²	0,42	0,68
	2,11		6,57.10 ⁻²	0,62	

* Le volume de la solution en contact de la poudre est de 1 mL. Les valeurs pour le MIP sont représentées en orange.

Les isothermes d'adsorption sont représentés sur la Figure 194. Pour cette formulation, il ne semble pas y avoir de différence notable entre le MIP et le NIP. En effet, nous pouvons remarquer que les deux isothermes sont proches et semblent plutôt suivre une adsorption linéaire. Cependant, la capacité à haute concentration d'environ 50 mg/g est encourageante.

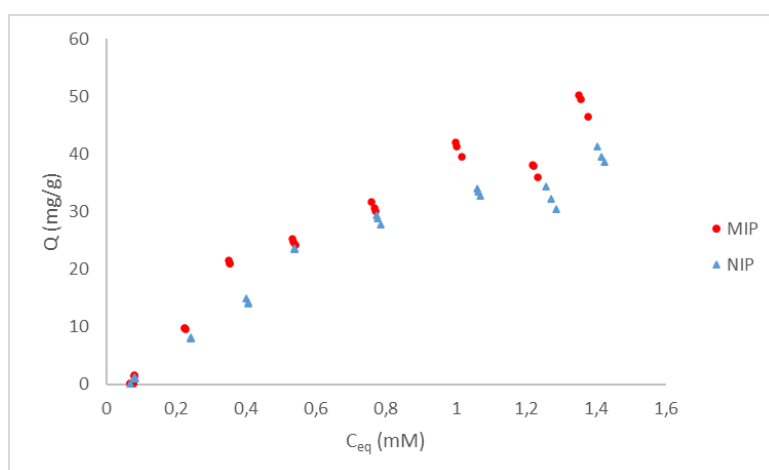


Figure 194 : Isothermes d'adsorption pour le MIP et le NIP de la formulation 3

Ainsi, nous avons tout de même voulu déterminer les paramètres caractéristiques du MIP et du NIP de la formulation 3. Pour calculer la constante d'association K_a entre le ténofovir et le polymère et le

capacité N des deux matériaux, la régression non linéaire a été utilisée sur les mêmes modèles que ceux utilisés dans la partie A, paragraphe 5.3.5. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le Tableau 55.

Tableau 55 : Valeurs des constantes d'affinités (K_a ; L.mol⁻¹), nombre de site actifs (N ; g.g⁻¹), coefficient de détermination (R^2), valeur du test statistique de Fisher (F_{value}), valeur du Chi carré (χ^2) obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP de la formulation 3.

Core-shell MIP 3						
Modèle	N	K_a	m	R^2	χ^2	F_{value}
Langmuir	$1,16.10^{-1} \pm 2,37.10^{-2}$	484 ± 147		0,958	$1,28.10^{-5}$	867
Freundlich-Langmuir	$5,69.10^{-2} \pm 7,56.10^{-3}$	1638 ± 347	1,55	0,966	$1,03.10^{-5}$	726
Freundlich	$1,52.10^{-2} \pm 4,53.10^{-1}$	2596 ± 4407	0,81	0,947	$4,52.10^{-4}$	687
Core-shell NIP 3						
Modèle	N	K_a	m	R^2	χ^2	Fvalue
Langmuir	$9,57.10^{-2} \pm 1,89.10^{-2}$	480 ± 142		0,959	$9,11.10^{-6}$	873
Freundlich-Langmuir	$4,07.10^{-2} \pm 2,26.10^{-3}$	1984 ± 151	2,08	0,982	$3,96.10^{-6}$	1352
Freundlich	$1,25.10^{-2} \pm 4,03.10^{-1}$	2525 ± 4318	0,81	0,944	$1,24.10^{-5}$	637

D'après le Tableau 55, la meilleure adéquation est obtenue avec le modèle théorique de Freundlich-Langmuir pour le core-shell MIP et le core-shell NIP. Nous pouvons remarquer que la valeur de m calculé pour ce modèle est de 1,55 et 2,08 pour le MIP et le NIP, respectivement. Ainsi, dans nos matériaux synthétisés un phénomène de coopérativité positive à lieu au niveau de l'adsorption et plus d'une molécule de ténofovir peut se loger dans les cavités.

D'après les résultats obtenus, le modèle de Freundlich-Langmuir indique que le MIP possède une capacité théorique de $5,69.10^{-2}$ g/g (soit 56,9 mg/g) et une constante d'affinité de 1638 L/mol. A contrario, le NIP présente une capacité théorique plus faible de $4,07.10^{-2}$ g/g (soit 40,7 mg/g) MAIS une constante d'affinité également plus forte de 1984 L/mol.

Il est intéressant de noter que la capacité théorique du MIP de 56,9 mg/g est quasiment identique à la quantité de ténofovir introduit par gramme de PDA lors de la synthèse de ce core-shell.

D'après nos résultats, parmi les 3 formulations, la formulation 3 réalisée avec un nombre de réticulant réduit (18 eq.), avec une concentration de nanoparticules égale à 1 mg/mL et dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) est la plus prometteuse. Afin de compléter l'étude de ce matériaux, la relargage du ténofovir a été étudié.

5.2.2. Etude cinétique de relargage du ténofovir

L'objectif final de la synthèse d'un core-shell imprimé étant son utilisation comme système de délivrance, une étude de la cinétique de la libération du ténofovir a été effectuée. Bien que le matériau imprimé ne semble pas montrer de sélectivité vis-à-vis du ténofovir, l'étude du relargage a quand même été menée. Le protocole de cette étude est décrit dans la partie expérimentale.

Cette étude de relargage a été menée dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 (0,01 M) avec du PBS pour mimer le pH physiologique. Tout d'abord, les matériaux imprimés et non imprimés sont chargés à l'aide d'une solution de ténofovir à 1,71 mM. En analysant le surnageant après contact, la quantité maximale adsorbée dans le MIP et le NIP a été calculée à 39,2 mg/g (soit 1,06 mg de ténofovir dans 27 mg) pour le MIP à 38,0 mg/g (soit 0,878 mg de ténofovir dans 23 mg) pour le NIP.

Ensuite, la cinétique de relargage est dans un premier temps réalisée à 25 °C (Figure 195). Après 30 h, les pourcentages libérés en fonction du temps sont très faibles, avec 1,65% et 2,34% de la quantité adsorbée pour le MIP et le NIP, respectivement. Cette cinétique étant très lente, nous avons décidé d'augmenter la température afin d'observer une éventuelle accélération. Ainsi, à partir de 30 h, les matériaux ont été placés à 37 °C (Figure 195).

Il est intéressant de corrélérer la cinétique de libération du ténofovir aux isothermes d'adsorption. En effet, le MIP libère plus vite le ténofovir que le NIP. Cette observation peut s'expliquer par la constante d'association qui est plus forte pour le NIP que le MIP. Ainsi, le ténofovir étant plus faiblement retenu dans le MIP, la dissociation sera plus facile.

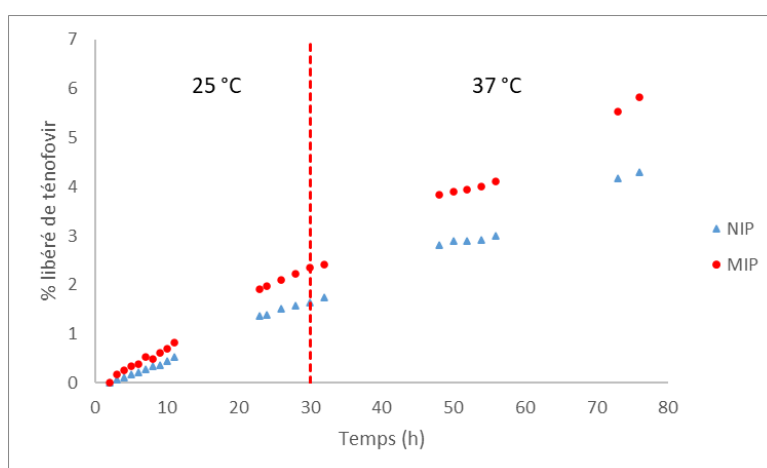


Figure 195 : Profils de relargage du ténofovir de la formulation 3

Afin de visualiser le phénomène de relargage et l'influence de la température, les profils de libération du ténofovir à 25 °C et 37 °C sont représentés sur la Figure 196 et la Figure 197, respectivement.

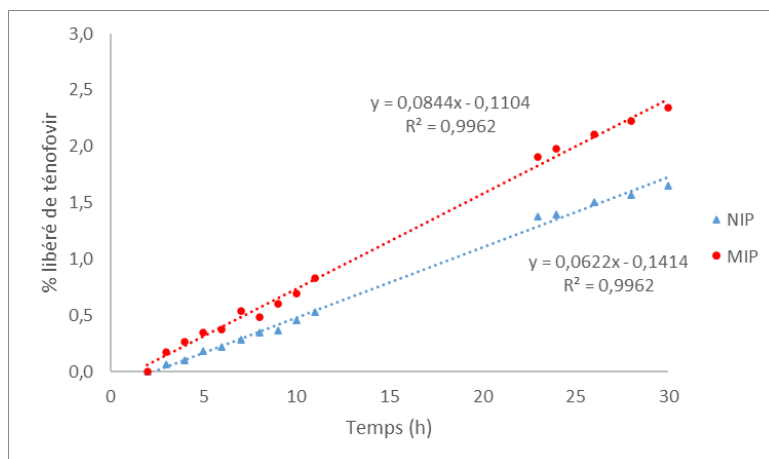


Figure 196 : Profils de relargage du Ténofovir à 25 °C

Nous pouvons remarquer que les profils obtenus, pour le MIP et le NIP à 25 °C, semblent être linéaires, avec un coefficient de corrélation de 0,996. La cinétique de relargage semble être de l'ordre zéro pour les deux matériaux.

A contrario, à 37 °C, le relargage ne semble plus être linéaire. Un plateau est observé entre 20 h et 30 h puis le relargage du ténofovir semble s'accélérer à partir de 40 h.

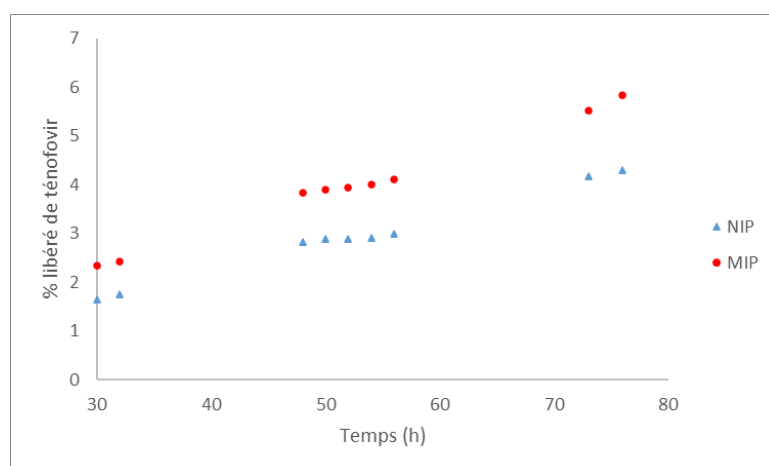


Figure 197 : Profils de relargage du ténofovir à 37 °C

A 37 °C, la courbe de cinétique présente donc trois domaines : Pendant les premières heures, le phénomène de libération est similaire à celui observé à 25 °C mais est accéléré. Dans un premier temps, ce sont les molécules de ténofovir retenues en surface par des interactions non spécifiques de type échange d'ions qui vont s'échanger avec les ions de la solution tampon. Ce phénomène est plus communément appelé « burst » ou fuite. Au bout d'une dizaine d'heure, une phase II dite « lag-time » ou « temps de latence » est observée. Durant cette phase, une libération lente contrôlée par la diffusion a lieu. En effet, les molécules de la solution tampon mettent un certain temps pour hydrater en profondeur le polymère et libérer ainsi les molécules de ténofovir retenues à l'intérieur des cavités. Enfin, après plus de 40 h, une troisième phase est observée durant laquelle, une libération rapide du

ténofovir est notée. Cette troisième phase est possiblement due à un phénomène d'érosion de la matrice polymérique (dégradation de la polydopamine par exemple) ou par un phénomène de gonflement du polymère et par la formation de pores par lesquels, le ténofovir est arraché en plus grande proportion qu'initialement, dû à l'effet de température.

Ce core-shell imprimé présente une cinétique de **relargage ralenti du ténofovir**, avec seulement **6%** de ténofovir relargué au bout de 76 h où un effet de température est observé. Cette étude encourageante reste exploratoire et plusieurs paramètres dans la synthèse du core-shell doivent être optimisés afin d'améliorer la morphologie des particules. Pour l'améliorer, une synthèse identique à la formulation 3 pourrait être envisagée tout en diminuant la quantité de réticulant à 5 équivalents. Cette diminution a pour objectif empêcher « l'emprisonnement » des nanoparticules de PDA au sein d'un réseau polymérique.

Une autre manière possible d'homogénéiser la synthèse du core-shell et de faciliter la création de la fine couche des nanoparticules, serait de greffer des fonctions acrylates en sa surface. Ainsi, pour se faire nous avons envisagé la synthèse de thymine ou d'uracile présentant cette fonctionnalité.

6. Synthèse de dérivés analogues d'uracile comportant une fonction acrylate et électrophile

Le but de ces analogues est triple :

- ✓ Créer des liaisons hydrogène avec l'adénine (base purique du ténofovir)
- ✓ Pouvoir être greffés sur la polydopamine *via* leur fonction électrophile
- ✓ Présenter une fonctionnalité de surface, acrylate, afin de créer la fine couche autour des nanoparticules

Dans un premier temps, nous avons choisi de garder le motif *N1*-acide acétique et d'ajouter en position *C5* une fonction acrylate (Figure 198).

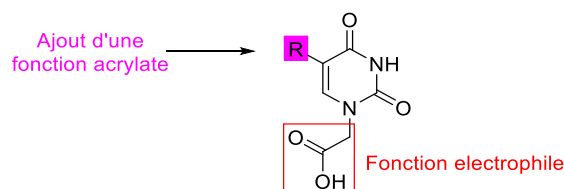


Figure 198 : Structures recherchées des nouveaux monomères

6.1. Dérivés de l'uracile portant les fonctions en *N1* et en *C5*

6.1.1. A partir du 5-aminouracile 150

Parmi les nombreux composés fonctionnalisés en position 5 à notre disposition, le 5-aminouracile **150** possédant une fonctionnalité amine facilement modulable a été choisi. Le composé **151** a été obtenu

par l'acylation du 5-aminouracile, préalablement silylé, par le chlorure de méthacryloyle en présence de triéthylamine dans le DCE. Celui-ci a ensuite été engagé dans la réaction effectuée aux micro-ondes décrite dans le paragraphe 3.1. Cependant, dans ces conditions, seul le composé di-alkylé **152** a été obtenu et isolé (Schéma 32).

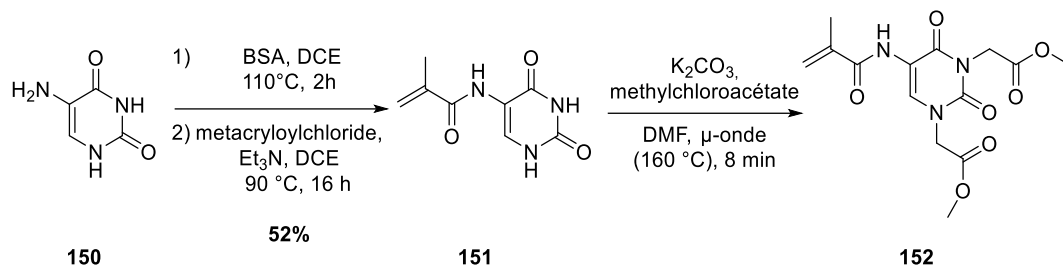


Schéma 32 : Modification du 5-aminouracile

6.1.2. A partir du 5-bromouracile **153**

Le 5-bromouracile a été choisi car, dans la littérature, il est montré qu'il peut facilement être substitué par des groupements amino. En effet, Boncel *et al.*³⁰² ont décrit la synthèse du 5-(2-hydroxyéthylamino)uracile à partir du 5-bromouracile et de l'éthanolamine avec un rendement de 96%. De même, Fang *et al.*³⁰³ ont substitué l'atome de brome par différentes amines, telles que la pipéridine, la morpholine ou encore la benzylamine, avec des rendements compris entre 92% et 98%. Dans un premier temps, nous avons, dans les mêmes conditions que décrites au paragraphe 3.1, introduit le groupement acide acétique en position *N1*. Le composé **154** est obtenu par activation micro-ondes entre le 5-bromouracile **153** et le chloroacétate de méthyle, en présence de K_2CO_3 , avec un rendement de 33%. Ce composé est ensuite engagé dans une réaction de saponification donnant le composé **155** avec un rendement de 95%. Ce composé a ensuite été engagé, en se basant sur le protocole de Boncel *et al.*,³⁰² dans une réaction de substitution avec l'éthanolamine. Cependant, la réaction n'a pas conduit au produit désiré **157** mais à la formation de l'amide **156** (Schéma 33).

³⁰² Boncel, S.; Gondela, A.; Mączka, M.; Tuszkiewicz-Kuźnik, M.; Grec, P.; Hefczyk, B.; *et al.* Novel 5-(N-Alkylaminouracil) Acyclic Nucleosides. *Synthesis*. **2011**, *2011*, 603–610.

³⁰³ Fang, W.-P.; Cheng, Y.-T.; Cheng, Y.-R.; Cherng, Y.-J. Synthesis of Substituted Uracils by the Reactions of Halouracils with Selenium, Sulfur, Oxygen and Nitrogen Nucleophiles under Focused Microwave Irradiation. *Tetrahedron*. **2005**, *61*, 3107–3113.

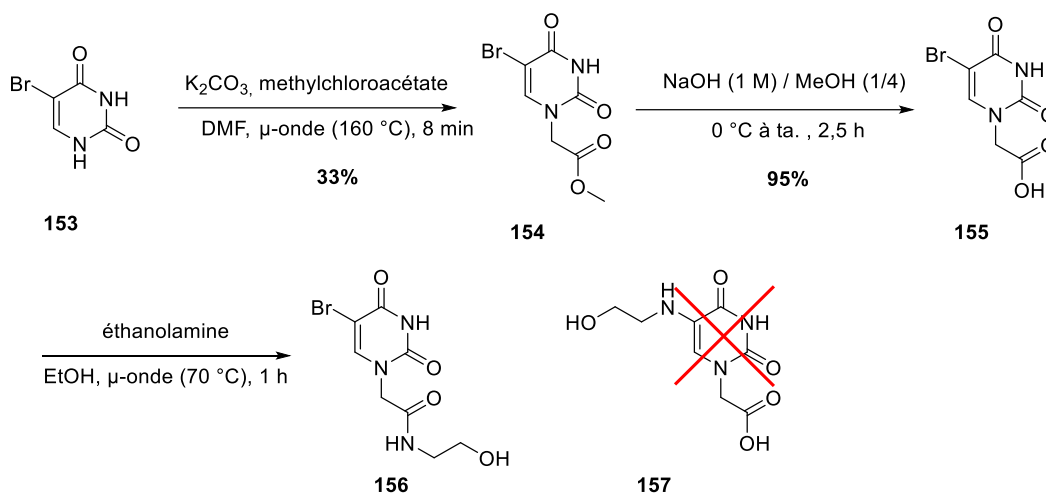


Schéma 33: Modification du 5-bromouracile

Les conditions employées n'ont pas permis d'obtenir le composé final à partir du 5-bromouracile. Cependant, comme la littérature montre plusieurs exemples de bromo-substitution, nous avons envisagé que le 5-bromouracile pouvait être substrat de la polydopamine et être greffé directement sur la surface des nanoparticules par l'intermédiaire des fonctions amines présentes.

6.2. Synthèse du *N*1-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile

Nous avons envisagé, dans un premier temps, de dériver la PDA avec le bromouracile. Pour ce faire, ce dernier a été solubilisé dans l'ACN à l'aide du BSA, formant l'intermédiaire silylé **158** qui a ensuite été mis en contact avec une suspension de PDA dans l'ACN (Schéma 34). Afin de quantifier le pourcentage de bromouracile adsorbé sur la PDA, ce composé est analysé sur la même colonne utilisée pour doser le ténofovir, la colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μ m), en utilisant un débit de 0,8 mL/min, une température de colonne de 35 °C, et une phase mobile H₂O/MeOH (90/10, v/v). Dans ces conditions, le bromouracile présente un temps de rétention de 2,5 min (Figure 199).

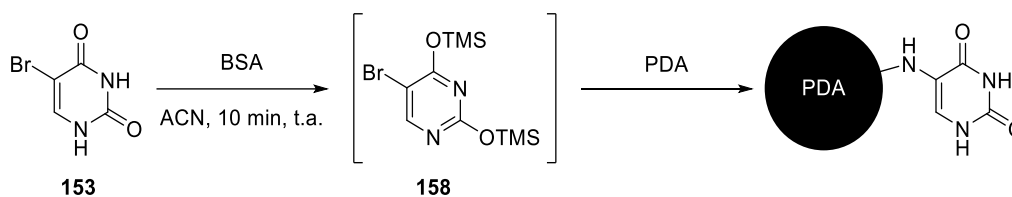


Schéma 34 : Dérivation attendue de la polydopamine par le bromouracile

Après 16 h d'agitation à 25 °C, le mélange est centrifugé et le surnageant est analysé par HPLC-UV. La solution initiale de 5-bromouracile est également analysée et, par comparaison des aires sous le pic chromatographique de ce composé, nous pouvons déduire le pourcentage du 5-bromouracile greffé sur la polydopamine qui est de 95% (Figure 199) et qui correspond à **0,76 mg/mg** de PDA.

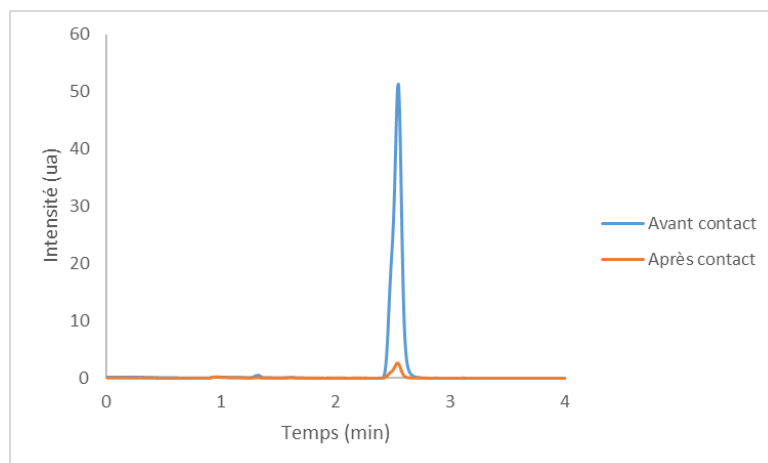


Figure 199 : Chromatogramme du bromouracile avant et après contact avec la PDA à 260 nm

Ayant réussi à greffer le 5-bromouracile sur la polydopamine, la synthèse d'un nouveau dérivé du 5-bromouracile a été envisagée, afin d'avoir des fonctionnalités polymérisables à la surface de nos nanoparticules. Comme les dérivés d'uracile comportant un motif directement en *N1* semblent s'hydrolyser dans l'eau (cf. Partie A, paragraphe 3), nous avons décidé de synthétiser le *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile **159** (Figure 200).

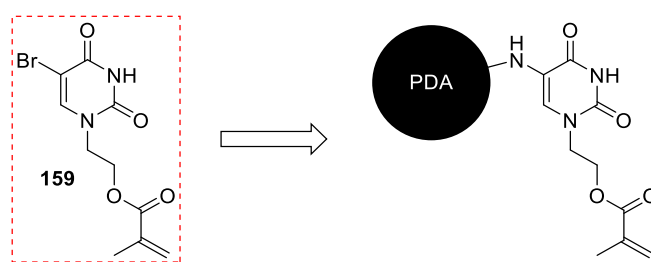


Figure 200 : Objectifs de greffage sur la PDA

La synthèse de ce composé a été envisagée, dans un premier temps, selon celle développée pour la thymine dans la partie A, paragraphe 4. Le 5-bromouracil **153** est benzoylé sélectivement en *N3* par réaction avec le chlorure de benzyle suivi d'une hydrolyse sélective en milieu basique avec un rendement de 36%. Le composé **160** est ensuite engagé dans une réaction de *N*-alkylation avec le bromoéthanol avec un faible rendement de 18%. Puis, le groupement benzyle du composé **161** est clivé dans une solution d'ammoniac dans le méthanol formant le composé **162** avec un rendement de 50%. La dernière étape consiste en une réaction d'estérification entre le composé **162** et le chlorure de méthacryloyle **106** (Schéma 35).

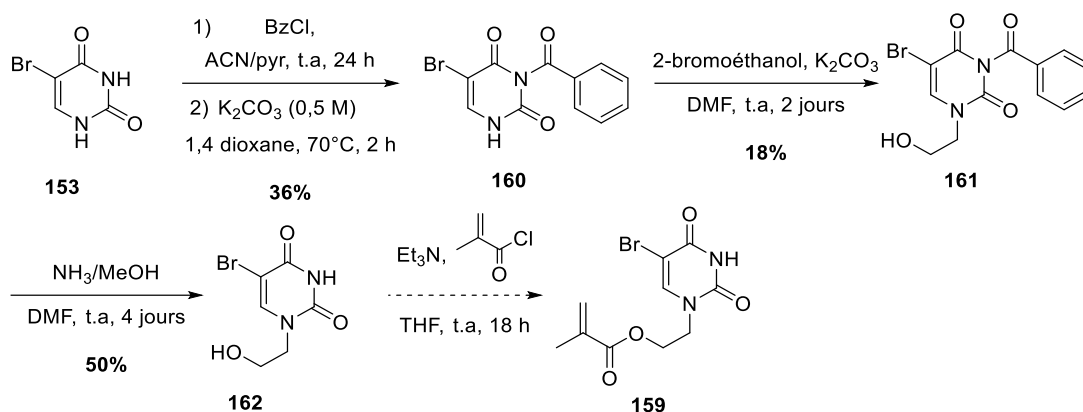


Schéma 35 : Première voie de synthèse du composé *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile

En parallèle, la synthèse de ce composé a été envisagée par une autre approche. Celle-ci commence par la protection sélective de la position *N3* du 5-bromouracile par un groupement Boc, méthode développée par notre équipe en 2014.³⁰⁴ Le bromouracile **153** est, dans un premier temps, entièrement protégé en *N1* et *N3* par un excès de dicarbonate de *tert*butyle (Boc_2O) et 0,35 équivalent de 4-*N,N*-(diméthylamino) pyridine (DMAP), dans le THF sous micro-ondes à 70 °C. La déprotection sélective de la position *N1* de l'intermédiaire **163** par traitement avec de la silice dans du diéthoxyméthane / éthanol (9/1, v/v) conduit au composé **164** souhaité avec un rendement de 31 %.

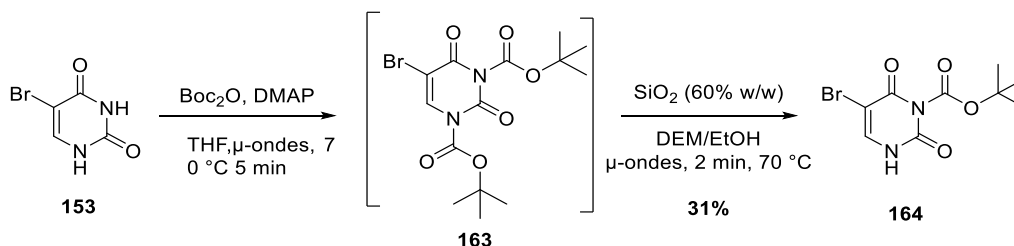


Schéma 36 : Protection sélective du bromouracile en *N3*

En parallèle, la fonction alcool du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle **165** est activé par un groupement tosyloxy par réaction avec le chlorure de tosyloxy (TsCl) dans le DCM en présence de Et_3N , avec un rendement de 82%. Le composé tosylé **166** doit être engagé rapidement dans l'étape suivante ou être stocké sous argon pour éviter sa polymérisation. Le *N3*-Boc-5-bromouracile **164** est ensuite engagé dans une réaction de substitution électrophile avec le composé **166** en présence d'hydruure de sodium (NaH) permettant d'obtenir le composé *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl],*N3*-Boc 5-bromouracile **167** avec un rendement de 44%. La dernière étape consiste en la déprotection de l'amine en position 3 par le TFA formant le composé **159** (Schéma 37).

³⁰⁴ Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A Convenient, Highly Selective and Eco-Friendly *N*-Boc Protection of Pyrimidines under Microwave Irradiation. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 59747–59749.

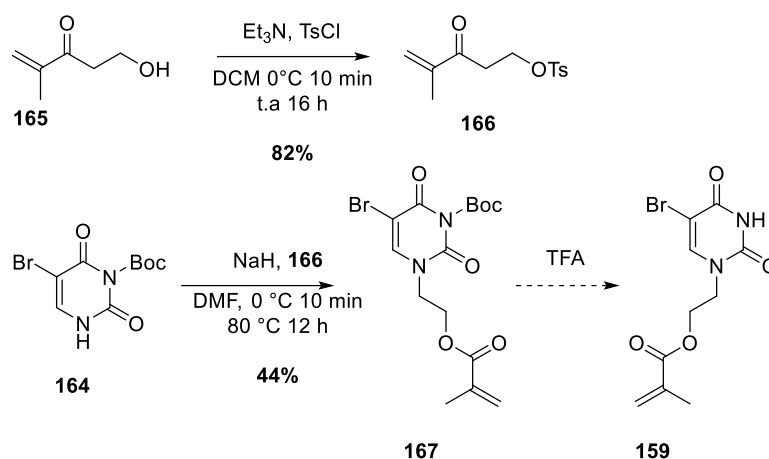


Schéma 37 : Deuxième voie de synthèse du composé *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]5-bromouracile

Bien que les deux voies de synthèse n'aient pas permis l'obtention du composé désiré, la seconde voie de synthèse semble être la plus convergente et celle présentant le moins d'étapes. Celle-ci devra être poursuivie, pour obtenir ce composé et envisager ensuite la dérivation de la PDA.

Conclusions et perspectives

Durant ces travaux, nous avons pu synthétiser **de façon reproductible**, des nanoparticules de **polydopamine monodispersées ayant une taille comprise entre 200 et 300 nm**. Afin d'avoir des nanoparticules de polydopamine ayant des fonctionnalités acrylates en leurs surfaces plusieurs essais ont été réalisés.

- ✓ Un analogue de la dopamine, la ***N*-méthacrylamide dopamine a été synthétisée**. Toutefois, la polymérisation de cet analogue seul, ou en présence de dopamine, n'a pas conduit à l'obtention des nanoparticules souhaitées.
- ✓ La synthèse de dérivés d'uracile présentant une fonctionnalité acrylate en position *N1* ou en position C5 a été envisagée mais n'a pas abouti.

Cependant, la synthèse de **dérivés *N1*-acide-acétique pyrimidiques avec des rendements de 44-46%** a permis de dériver la surface de la polydopamine avec un taux de greffage compris entre 140 et 220 mg/g.

Les nanoparticules de polydopamine, portant une fonctionnalité uracile/thymine en surface permettant la reconnaissance du ténofovir, ont été engagées dans plusieurs synthèses de core-shell imprimés.

De ces différentes synthèses de core-shell **plusieurs paramètres ont pu être optimisés** :

- ✓ La synthèse doit s'effectuer dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v)
- ✓ La concentration des nanoparticules de polydopamine doit être de 1mg/mL. Un milieu trop concentré conduit à l'obtention de plusieurs populations.

- ✓ Le nombre de réticulant doit être inférieur à 20 équivalents car la proportion élevée de réticulant joue sur la morphologie des nanoparticules. La cinétique très lente du relargage peut également s'expliquer par la proportion élevée de réticulant.

La formulation 3 présente une capacité élevée de plus de 50 mg/g. L'étude de la cinétique de libération a montré un profil ralenti du ténofovir et nous avons mis en évidence que la cinétique de libération est plus rapide à 37 °C mais reste très lente (6% de ténofovir libéré en 3 jours).

Par la suite, l'activité antivirale des nanoparticules chargées en ténofovir devra être mesurée et comparée à celle du ténofovir seul et aux deux prodrogues, le TDF et le TAF. La cytotoxicité de nos matériaux devra également être mesurée.

Afin de compléter **cette étude exploratoire** de core-shell à base de polydopamine comme cœur, une synthèse pourra être réalisée en utilisant au maximum, **5 équivalents** du réticulant, le 3-(acryloyloxy)-2-hydroxypropyl méthacrylate. En parallèle, les synthèses avec un réticulant plus hydrophobe comme l'EGDMA ou avec un réticulant possédant plus de fonctionnalités polymérisables comme le pentaérythritol triméthacrylate, pourront être envisagées.

La synthèse de nanoparticules de polydopamine ayant une fonctionnalité acrylate devra être poursuivie afin d'aider à la formation de la couche polymérique autour du cœur. Par exemple, après avoir finalisé la synthèse du composé **159**, les nanoparticules dérivées avec un motif uracile pourront être obtenues (Figure 201).

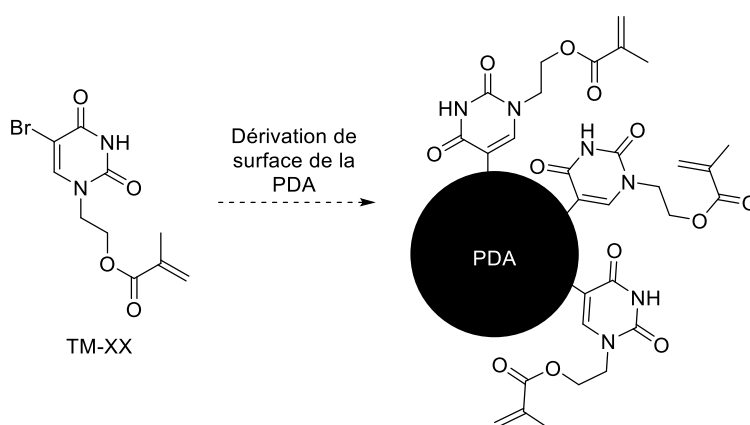


Figure 201 : Dérivation de surface des nanoparticules de PDA avec une molécule possédant une fonctionnalité uracile et méthacrylate

Lorsque la synthèse de la forme phosphonate libre du LAVR-289 sera résolue, cette méthodologie de synthèse de core-shell imprimé pourra être appliquée à cette molécule. Par ailleurs, elle pourra également être **utilisée pour d'autres antiviraux analogues nucléotidiques**, possédant une base purique tels que l'adéfovir, la ribavirine ou le remdesivir, par exemple, ou pour des antiviraux

synthétisés au laboratoire. **En remplaçant la nucléobase greffée** en surface des nanoparticules, ces dernières pourraient également être utilisées pour la reconnaissance d'analogues nucléotidiques possédant une base pyrimidique, tels que le cidofovir, l'emtricitabine, la gemcitabine ou des analogues synthétisés au laboratoire possédant une base 2,4(1H,3H)-quinazolinedione (Figure 202).

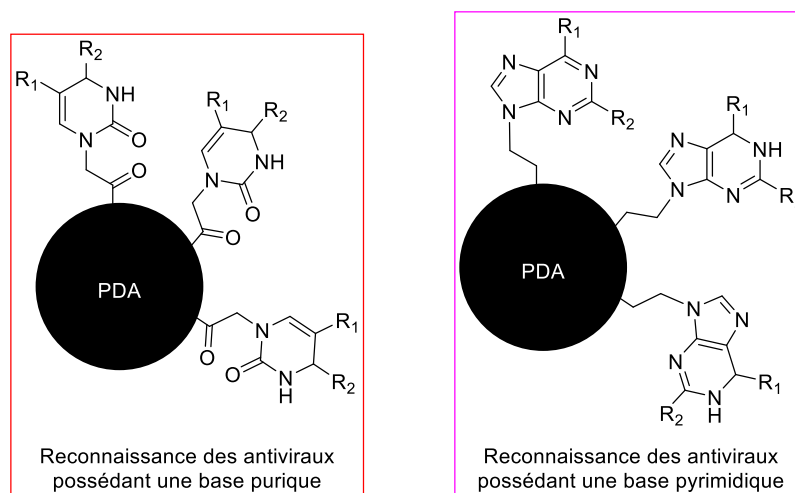


Figure 202 : Modulation de la surface de la PDA

Par ailleurs, l'utilisation d'autres **nanoparticules comme « cœur » est envisageable**. Des premiers essais avec la polyurée ont été menés. Ces nanoparticules ont été facilement obtenues en faisant polymériser le diisocyanate d'isophorone (IPDI) dans un mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) sans utiliser d'initiateur (Schéma 38).

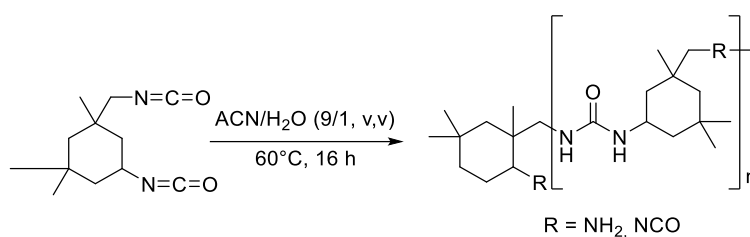


Schéma 38 : Synthèse de la polyurée à partir du IPDI

L'analyse microscopique représentée sur la Figure 203 a montré que la synthèse conduisait à des nanoparticules monodispersées ayant un diamètre moyen de 500 nm. L'analyse infrarouge de ces nanoparticules présente la bande caractéristique 2258 à cm⁻¹ des fonctions isocyanates (Annexe 17). Ainsi, des essais de dérivation de surface de la polyurée, *via* sa fonctionnalité *isocyanate*, ont été menés en utilisant la 5-aminouracile ou la *N1*-(2-hydroxyéthyl)uracile. Toutefois ces essais ne se sont pas avérés concluants à ce jour.

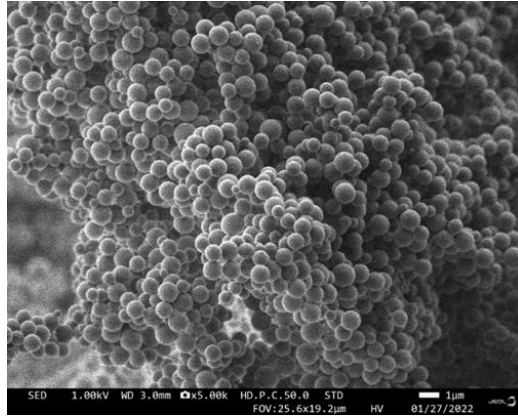


Figure 203 : Analyse microscopique des nanoparticules de polyurée

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le développement pré-clinique d'un nouvel antiviral à large spectre, le LAVR-289, synthétisé sous forme de prodrogue.

Dans la première partie, nous avons mis au point une méthode analytique permettant la séparation des isomères *Z* et *E* du LAVR-289. Cette méthode a permis de déterminer la stabilité aux solvants et aux pH de cette molécule. Celle-ci est **stable en milieu acide** mais se dégrade rapidement en **conditions basiques** et lentement en présence de solvants de type alcools. Les paramètres physico-chimiques tels que le pKa, la concentration d'agrégation critique ainsi que le Log P ont pu être déterminés par spectroscopie UV-visible, spectroscopie de fluorescence et par chromatographie liquide de polarité en phase inverse, respectivement. **Le LAVR-289 possède un pKa de 5,1, une CAC de 5,57 μ M et un Log P de 7,38** (Figure 204).

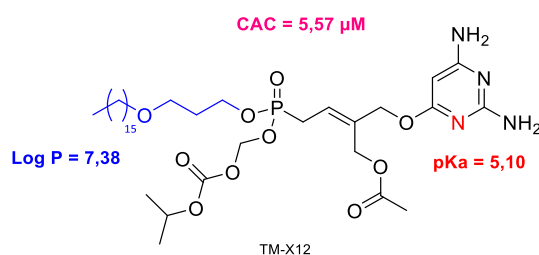


Figure 204 : Récapitulatif des paramètres physico-chimiques déterminés du LAVR-289

La méthode HPLC développée pour la détermination du Log P pourra être utilisée pour déterminer ceux de futures prodrogues développées au laboratoire. Grâce à ces paramètres, **des formulations sous forme de micelles** ont été réalisées en utilisant le SDS comme tensioactif. L'activité de ces micelles, chargées en LAVR-289, a été mesurée sur des cellules infectées par le virus de la vaccine. Les formulations n'ont pas présenté de toxicité apparente et la formulation chargée à 1 μ M présente une activité antivirale comparable à celle du LAVR-289 seul.

En parallèle, la stabilité plasmatique du LAVR-289 a été mesurée par HPLC-UV et a été estimée à 6 h. Un couplage à la spectrométrie de masse haute résolution a permis d'identifier **11 métabolites**, permettant une vision plus étendue du schéma de métabolisation de cet antiviral. **Cette étude reste qualitative** et l'obtention des divers composés identifiés sera rendue nécessaire pour une analyse quantitative.

Deux produits de dégradation, possédant un système diénique, ont été déterminés et leurs structures ont été confirmées par RMN 700 MHz (Figure 205). Une hypothèse de leur formation a également été présentée. **L'un des deux diènes se forme majoritairement en milieu basique** tandis que le second provient d'une **réaction intramoléculaire** et est présent dans les lots de synthèse. Sa présence a compliqué le développement d'une séparation par chromatographie semi-préparative, du LAVR-289 et de son isomère.

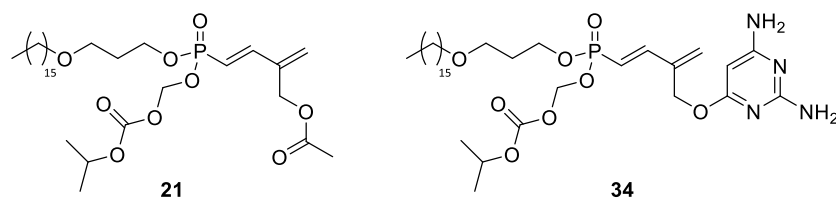


Figure 205 : Structures des produits de dégradations du LAVR-289

Enfin, la stabilité plasmatique des isomères Z P_r et Z P_s devra être effectuée afin d'étudier l'influence de la chiralité, au niveau du phosphore, sur cette stabilité.

Dans la seconde partie, nous avons réalisé une étude exploratoire destinée à développer différents systèmes polymériques imprimés moléculairement pour la libération d'un acyclonucléoside phosphonate sous sa forme libre. La synthèse de la forme phosphonate du LAVR-289 n'ayant pas abouti, nous avons utilisé le ténofovir comme modèle.

En amont de la synthèse des polymères, **une méthode analytique**, permettant de quantifier le ténofovir pendant les différentes étapes de la conception, a été développée. L'utilisation d'un tampon constitué d'acide phosphorique et d'hydroxyde d'ammonium a été nécessaire pour retenir et séparer le ténofovir sous la forme d'un pic gaussien.

Dans un premier temps, nous avons développé différents polymères à empreintes moléculaires par polymérisation par précipitation. L'influence du solvant de polymérisation sur la morphologie des nanoparticules obtenues a été étudié : les particules sont sphériques et polydispersées en utilisant de l'acétonitrile, sphériques et monodispersées avec un mélange binaire ACN/H₂O (9/1, v/v) et non sphériques et agglomérées en utilisant l'eau comme solvant.

La reconnaissance du ténofovir a été envisagée par deux points d'accroches en utilisant deux types d'interactions différentes :

- ✓ Interaction de type liaison hydrogène *via* la fonctionnalité phosphonate avec un monomère amine
- ✓ Interaction de type Watson-Crick (liaison hydrogène) *via* la nucléobase avec un monomère possédant une nucléobase pyrimidique.

4 monomères portant une nucléobase thymine ou uracile ont été synthétisés. Le polymère à empreintes moléculaires synthétisé avec le 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate, pour la reconnaissance du motif phosphonate et le avec le N1-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine a montré une **meilleure sélectivité** et un **relargage retardé** vis-à-vis du non imprimé. 100% du ténofovir contenu

dans le NIP a été relargué au bout de 6 jours (contre 22% à 25 °C) tandis que le MIP a libéré 85% de ténofovir dans le même temps (contre 9% à 25 °C).

Dans un second temps, nous avons développé des core-shell imprimés à base de **polydopamine** comme « cœur ». La synthèse de la polydopamine est **reproductible** et conduit à des nanoparticules ayant une taille comprise **entre 200 et 300 nm**. La **surface de ces nanoparticules a ensuite été dérivée** par une réaction de type peptidique entre les NH₂ en surface et les dérivés *N1*-acide acétique thymine ou uracile, préalablement synthétisés.

Ces nanoparticules dérivées avec un motif pyrimidique en surface, permettant de la reconnaissance de la nucléobase du ténofovir, ont été engagées dans plusieurs réactions de core-shell. La formulation obtenue en utilisant, le 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate, pour la reconnaissance du ténofovir, une mélange ACN/H₂O (9/1, v/v) et 20 équivalent du réticulant a **montré une capacité élevée de plus de 50 mg/g**. Cette formulation a également présenté **une libération ralentie du ténofovir** qui est plus rapide à 37 °C qu'à 25 °C. Cependant cette libération reste lente avec seulement **6% de ténofovir libéré en 3 jours**.

Cette **étude reste exploratoire** et pourra être complétée par une synthèse identique à la formulation 3 mais en diminuant le nombre d'équivalent de réticulant. La nucléobase greffée en surface de la polydopamine pourra être modulée afin de reconnaître des analogues nucléotidiques possédant une base purique. Enfin, d'autres nanoparticules, remplaçant la polydopamine, pourront être envisagées comme « cœur ». Par exemple, la polyurée pourrait être une alternative à la polydopamine en modifiant sa surface *via* sa fonctionnalité *isocyanate* avec un motif uracile.

Experimental part

General

Commercially available chemicals were provided as reagent grade and used as received. Reactions requiring anhydrous conditions have been carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry argon. Unless otherwise stated, all anhydrous solvents were provided from commercial source as very dry reagents. Tetrahydrofuran and acetonitrile were dried using Glass Technology dry-station GT S100 by passage through a column containing activated alumina under nitrogen pressure. Dichloromethane was distilled from phosphorus pentoxide under nitrogen atmosphere. *N,N*-dimethylformamide, 1,2-dichloroethane, pyridine and dimethylsulfoxide were dried using activated 4 Å molecular sieves.

Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (kieselgel 60F254, E. Merck). Compound were visualized by UV irradiation and/or spraying with potassium permanganate solution or ninhydrin stain, followed by charring at around 150 °C. Flash column chromatography was performed on Pure C-815 Flash (Buchi) using silica cartridge flash pure EcoFlex (40 µm, 4-80 g) or flash pure select (15 µm, 4-40g).

Microwave reactions were carried out in Biotage initiator apparatus. Reaction under ultrasons were carried out with Elmasonic P30H apparatus with frequency of 80 kHz and effective power of 100 W. The infrared spectra were measured with Nicolet iS10 IRTF spectrometer (Thermo Scientific). The UV spectra were measured with Shimadzu UV-1800 spectrometer. Fluorescence measurements were carried out on Horiba FluoroMax+ apparatus.

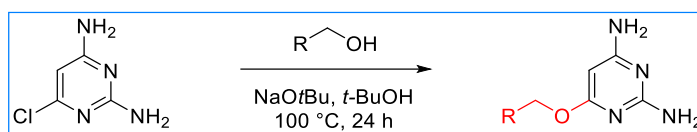
NMR spectra were recorded at 298 K on BrukerAvance DPX 250 or 400 MHz spectrometer equipped with a BBO probe. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. ¹H and ¹³C signals were attributed based on H–H (COSY) and H–C (HSQC) correlations. When appropriate or in case of ambiguous proton and carbon, assignments were established using heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), and nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY).

High resolution spectra were performed on a Bruker Q-TOF maXis spectrometer by the “Fédération de recherche” ICOA/CBM (FR 2708) platform.

All chromatograms were obtained on Agilent 1260 Infinity HPLC chromatograph (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The chromatograph is equipped with a 1260 binary pump (G1311B), a 1260 standard autosampler (G1329B), a 1260 thermostated column compartment (G1316A) and a 1260 diode array detector (G4212B) with a Max-Light cartridge cell (1 µL volume, 10 mm cell path length).

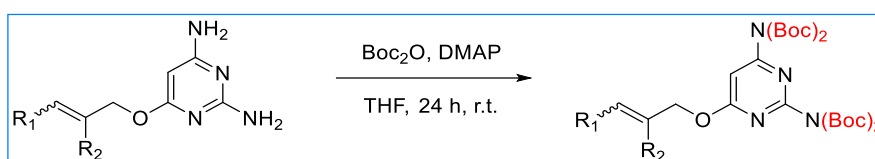
1. Organic synthesis

General procedure A:



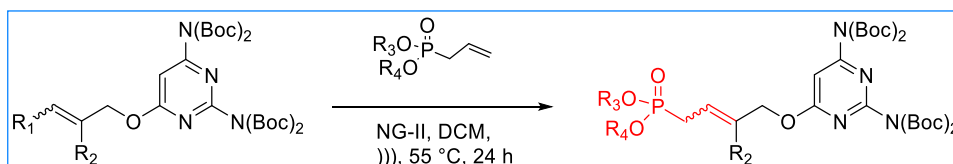
To a mixture of 2,6 diamino-4-chloropyrimidine (1 eq.) in *t*-BuOH was added the corresponding alcohol (3 eq.), followed by NaOtBu (2 eq.). After 24h stirring at 100 °C, the mixture was concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel to give desired compounds as a white powder.

General procedure B:



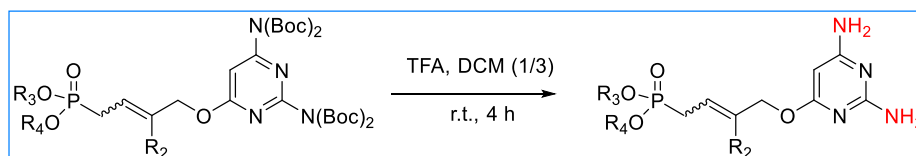
Di-tert-butyl carbonate (6 eq.) and 4-(dimethylamino)pyrimidine (0.35 eq.) were added to a solution of compound (1 eq.) in anhydrous THF under argon. The mixture was stirred overnight at room temperature. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by flash column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate as eluent affording expected product as a colourless oil.

General procedure C:



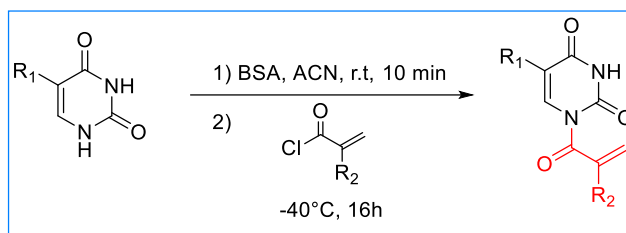
To a solution of pyrimidine (1 eq.) and allylphosphonate (2 eq.) in freshly distilled DCM, was added Nolan-Grubbs Catalyst 2nd generation (15 mol %). The catalyst addition was performed in five equal proportions of 3 mol % at *t* = 0, 3, 6, 9, and 20 h. The mixture was sonicated at 55 °C (80 kHz, 100 W) during 24 h. After evaporation of all volatiles, the desired product, was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate as brown oil.

General procedure D:



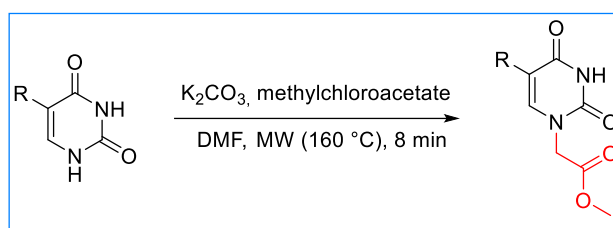
To a solution of Boc-compound (1 eq.) in DCM was added TFA and the mixture was stirred at room temperature for 4h. The reaction was neutralized with Na₂CO₃ and extracted with DCM. The organic layer was collected and evaporated under reduce pressure and pure desired compound was obtained by flash column chromatography eluting by DCM/MeOH.

General procedure E:



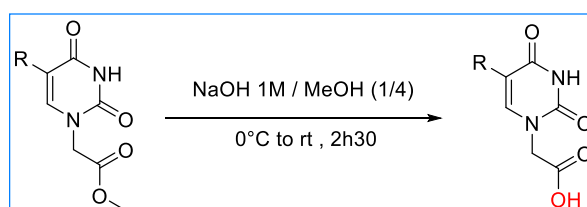
To a suspension of thymine or uracil (1eq.) in dry acetonitrile, BSA (2.5 eq.) was added, and the mixture was stirred until the solubilisation of pyrimidine base (10 min). The mixture was cooled down to -40°C, and the corresponding acryloyl chloride (2 eq.) was added dropwise. After 16 h stirring, the mixture was concentrated under reduce pressure. The crude was purified by recrystallisation in ethanol (uracil derivative) or acetonitrile (thymine derivative) to give desired compound.

General Procedure F:



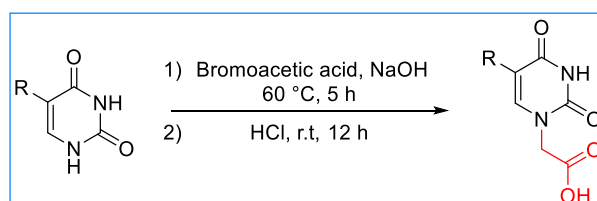
A mixture of uracil derivative (1eq.), K_2CO_3 (1eq.) and methylchloroacetate (3eq.), in DMF were placed in a sealed tube. After MW-irradiation for 8 min at 160 °C (250 W) the reaction mixture was concentrated to dryness under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting petroleum ether/ ethyl acetate) to afford expected product.

General procedure G:



To a solution of *N1*-methyl-uracil-acetate derivative (1 eq.) in MeOH was added dropwise at 0°C a solution of sodium bicarbonate (1M). The mixture was stirred to 0°C to room temperature for 2 h 30 and a H^+ resin (Amberlite IR120) was added until pH 5. H^+ resin was filtrated off and all the volatile was evaporated under reduce pressure to give desired compound.

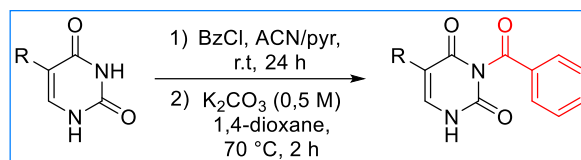
General procedure H:



To a solution of uracil derivative (1eq.) in water was added a solution of sodium hydroxide (4eq.) and the mixture was stirring until complete dissolution. To this solution, the solution of bromoacetic acid

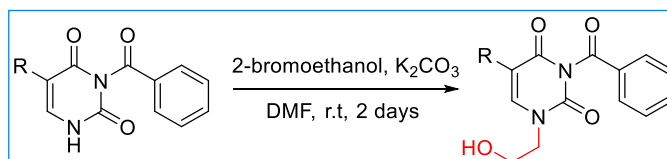
(1,2 eq.) was added dropwise over 30 min. Then, the mixture was stirred at 60°C for 5h and was allowed to cool to room temperature. The mixture was acidified to pH 2 with aqueous solution of HCl (37%) and stirred for 12 h. The resulting precipitated was filtrated off and the residue was recrystallized from distilled water to afford the expected product.

General procedure I:



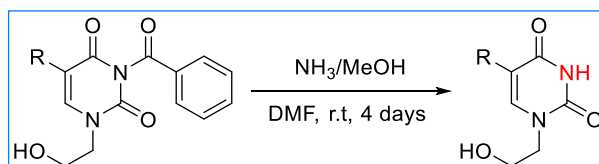
To a solution of uracil derivative (1 eq.) in mixture of dry pyridine/dry acetonitrile (2/5) was added benzoyl chloride (3 eq.). The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature and concentrated under reduce pressure. The residue was partitioned between dichloromethane and water. The organic layer was separated and then evaporated under reduce pressure. The residue was dissolved in mixture of aqueous potassium carbonate 0.5 M and 1,4 dioxane and stirred at 70°C until complete conversion (2h). The solution was cooled down to room temperature and the pH was lowered to 5 by addition of glacial acetic acid. The aqueous mixture was filtered, and the residue was washed with cold water and diethyl ether to obtain the desired N³-benzoyluracil derivative.

General procedure J:



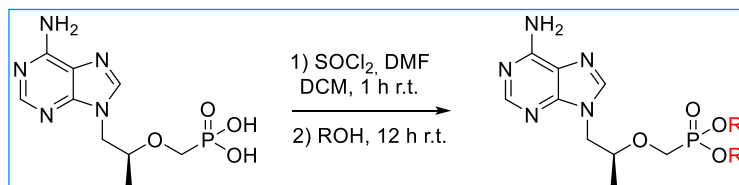
2-bromoethanol (4 eq.) was added to a suspension of N³-uracil analogues (1 eq.) and K₂CO₃ (3 eq.) in DMF at 0 °C. the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days. The resulting precipitate was filtrated off and the filtrated was concentrated under reduce pressure. The residue was diluted with EtOAc and washed whit H₂O and brine and dried over Na₂SO₃. The residue was concentrated under vacuum and purified on flash chromatography to give N¹-(2-hydroxyethyl)-N³-benzoyl uracil analogues.

General procedure K:



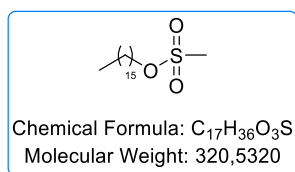
A mixture of N¹-(2-hydroxyethyl)-N³-benzoyl uracil analogues (1 eq.) and 16% (7M) ammonia in methanol was stirred at room temperature for 4 days. The mixture was concentrated in vacuum and the resulting residue was purified on flash chromatography to give N¹-(hydroxyethyl)-uracil analogues.

General procedure L:



To a suspension of Tenofovir (1 eq.) in dry DCM and dry DMF (0.2% v/v) was added dropwise thionyl chloride (5 eq.). The mixture was stirred at room temperature until obtained a clear solution (1 h). Then, all volatiles were evaporated under reduce pressure and corresponding dry alcohol (30 eq.) was added to the crude. The mixture was stirred at room temperature for 12 h. Then, remaining alcohol was evaporated, and the crude was purified by flash column chromatography using DMC/MeOH (98/2) as eluant to give expected *bis*(alkyl)-Tenofovir.

✓ Hexadecylmethanesulfonate (2)

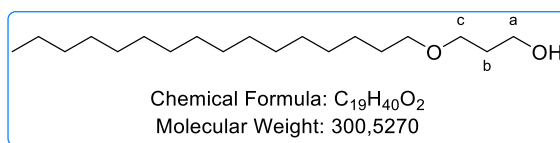


Anhydrous triethylamine (1.8 mL, 12.6 mmol, 1eq.) was added to a solution of hexadecanol (3.06 g, 12.6 mmol, 1eq.) in freshly distilled DCM (40 mL). The temperature was set to 0°C, and methanesulfonyl chloride (0.95 mL, 12.6 mmol, 1eq.) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature during 5 h then kept at -28 °C overnight, and the precipitate was then filtrated. The filtrate was evaporated and purified by silica gel column (PE/EtOAc 9/1) to afford desired compound **2** (3.06 g, 9.56 mmol, 75%) as a white powder.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) 4.24 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 3.02 (s, 3H, CH₃-S), 1.71 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.28 (m, 26H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

CAS : 124-63-0.

✓ Hexadecyloxypropyl alcohol (3)

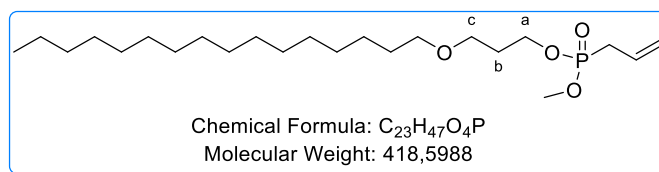


Under N₂ atmosphere, 1,3-propanediol (3.4 mL, 47.05 mmol, 5.2 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (90 mL), and sodium hydride (60% in oil, 966 mg, 24.9 mmol, 2.7 eq.) was carefully added. The solution was stirred for 30 minutes at room temperature, followed by the addition of **2** (2.91 g, 9.08 mmol, 1.0 eq.). This mixture was stirred for 12 h at room temperature, and the crude product was quenched with cold water (200 mL), dissolved in EtOAc (100 mL), the organic layer was washed two times with water (2 x 200 mL), one time with brine (200 mL) and dried over MgSO₄. After evaporation of all volatiles, the product was purified by flash column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 9/1 to 8/2) to give compound **3** (1.5 g, 56%) as a white powder.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.80 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H, **Ha**), 3.64 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **Hc**), 3.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.50 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, **OH**), 1.85 (quint, *J* = 5.6 Hz, 2H, **Hb**), 1.55 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.24 (m, 26H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

CAS: 23377-40-4.

✓ **3-(hexadecyloxy)propyl methyl allylphosphonate (5)**



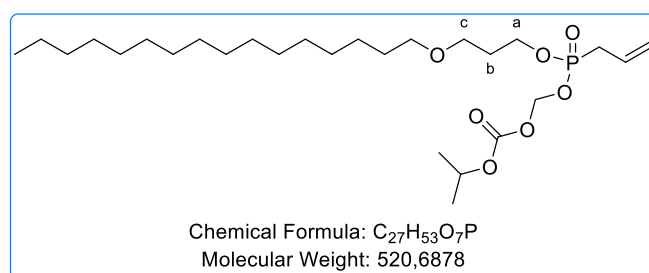
Oxalylchloride (1.07 mL, 11.8 mmol, 3 eq.) was added to a solution of dimethyl allylphosphonate **4** (624 mg, 4.14 mmol, 1 eq.) in freshly distilled DCM (30 mL). This mixture was refluxed during 72 h at 45 °C. After evaporation of all volatiles, the crude compound was diluted in 18 mL of freshly distilled DCM. Hexadecyloxypropyl alcohol **3** (1.2 g, 4 mmol, 1 eq.) and freshly distilled triethylamine (0.92 mL, 1.5 equiv., 6.6 mmol) were then added subsequently and the resulting solution was refluxed during 72 h at 45 °C. All volatiles were removed under reduced pressure, and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 7/3 to 6/4) to afford expected compound **5** (998 mg, 60%) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.75 (m, 1H, CH=CH₂), 5.23 (m, 2H, CH=CH₂), 4.13 (dt, *J* = 6.5, 1.7 Hz, 2H, **Ha**), 3.73 (d, *J* = 10.9 Hz, 3H, O-CH₃), 3.48 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **Hc**), 3.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.62 (dd, *J* = 22.0, 7.4 Hz, 2H, **CH₂-P**), 1.91 (quint, *J* = 6.3 Hz, 2H, **Hb**), 1.54 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.26 (m, 26H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) 28.3.

CAS: 1258789-65-9.

✓ **[allyl(3-(hexadecyloxy)propoxy)phosphoryl]oxymethyl isopropyl carbonate (6)**



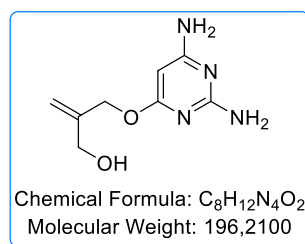
To a solution of compound **5** (0.920 g, 2.2 mmol, 1 eq.) in dry acetonitrile (10 mL), chloromethylisopropylcarbonate (0.44 mL, 3.3 mmol, 1.5 eq.), anhydrous sodium iodide (344 mg, 2.3 mmol, 1.05 eq.) and molecular sieves were respectively added, and the mixture was refluxed at 90°C during 48 h under N₂ atmosphere. After cooling, acetonitrile was evaporated, and molecular sieves were filtrated. The mixture was diluted with 70 mL of ethyl acetate, washed by 30 mL of water, 20 mL of aqueous solution of Na₂S₂O₃ and 20 mL of brine subsequently. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtrated, evaporated, and purified by column chromatography on silica gel (EP/AcOEt, 8/2 to 7/3) to give pure HDP/POC allylphosphonate **6** (475 mg, 0.91 mmol, 41%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.84-5.68 (m, 1H, CH=CH₂), 5.68-5.58 (m, 1H, O-CH₂-O), 5.27-5.17 (m, 2H, CH=CH₂), 4.92 (sept., *J* = 6.3 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 4.22-4.10 (m, 2H, Ha), 3.47 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, Hc), 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.67 (dd, *J* = 22.4, 7.4 Hz, 2H, CH₂-P), 1.91 (quint, *J* = 6.3 Hz, 2H, Hb), 1.55 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.33-1.20 (m, 26H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃ ; 6H, CH(CH₃)₂), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.7.

CAS: 1258789-66-0.

✓ **2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]prop-2-en-1-ol (8)**



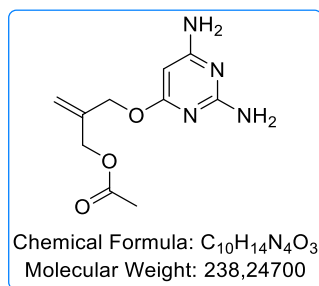
Following general procedure A, using 2,4-diamino-6-chloropyrimidine **7** (2 g, 13.8 mmol, 1 eq.) as starting material and 2-methylene-1,3-propenediol (3.4 mL, 41.51 mmol, 3 eq.), desired compound **8** (1.51 g, 56%) was obtained after purification by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)), as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.60 (bs, 2H, NH₂), 5.51 (bs, 2H, NH₂), 5.24 (s, 1H, H5), 5.17 (m, 1H, CH₂=C), 5.11 (m, 1H, CH₂=C), 4.74 (s, 2H, CH₂-O), 4.10 (s, 2H, CH₂-OH).

¹³C-NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 171.64 (C6), 167.39 (C2 or C4), 164.18 (C2 or C4), 147.10 (CH₂=C), 111.64 (CH₂=C), 77.96 (C5), 66.04 (CH₂-O), 63.46 (CH₂-OH).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₃N₄O₂ 197.1033, found 197.1029.

✓ **2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]allyl acetate (9)**



To a solution of compound **8** (1.51 g, 7.7 mmol, 1 eq.) in acetonitrile (160 mL), vinyl acetate (2.13 mL, 23.1 mmol, 3 eq.) and *Candida antarctica* lipase B (CAL-B, 50% w/w, 750 mg) were added at 35 °C. The mixture was stirred for 4 h at 35 °C, then all the solid were filtered off and washed with acetone (3 x 20 mL). The organic layer was then collected, dried over MgSO₄ and all the volatiles were evaporated.

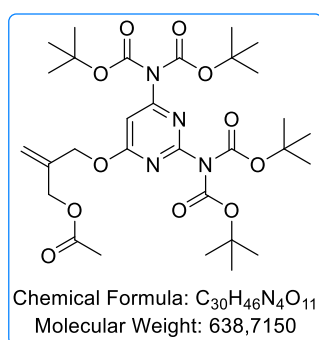
The residue was purified on a silica gel column eluting with CH₂Cl₂/MeOH (97/3 to 95/5), to perform the compound **9** (1.61 g, 89%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.73 (bs, 2H, NH₂), 5.66 (bs, 2H, NH₂), 5.28 (m, 1H, CH₂=C), 5.27 (s, 1H, H₅), 5.23 (m, 1H, CH₂=C), 4.76 (s, 2H, CH₂-O-DAPy), 4.64 (s, 2H, CH₂-OAc), 2.05 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 171.34 (C₆), 170.66 (O-(C=O)-CH₃), 167.25 (C₄ or C₂), 164.06 (C₄ or C₂), 141.67 (CH₂=C), 114.95 (CH₂=C), 77.87 (C₅), 65.73 (CH₂-O-DAPy), 64.96 (CH₂-OAc), 20.69 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₅N₄O₃ 239.1139, found 239.1137.

✓ 2-[[2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (**10**)



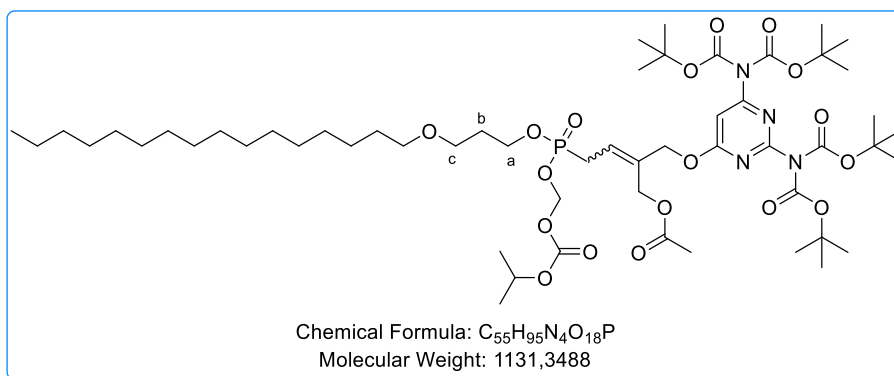
Following general procedure B, from compound **9** (1.61 g, 6.76 mmol, 1 eq.) as starting material, expected compound **10** (3.21 g, 74%) was obtained after purification on flash column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate (9/1) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (s, 1H, H₅), 5.31 (s, 1H, CH₂=C), 5.27 (s, 1H, CH₂=C), 4.84 (s, 2H, CH₂-O-DAPy), 4.62 (s, 2H, CH₂-OAc), 2.04 (s, 3H, CH₃), 1.48 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.41 (s, 18H, CH₃-Boc).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.24 (C₆), 170.57 (O-(C=O)-CH₃), 159.97 (C₄ or C₂), 156.45 (C₄ or C₂), 150.44 (C=O_{Boc}), 149.96 (C=O_{Boc}), 138.68 (CH₂=C), 116.75 (CH₂=C), 96.03 (C₅), 84.27 (C_q_{Boc}), 83.17 (C_q_{Boc}), 67.00 (CH₂-O-DAPy), 64.67 (CH₂-OAc), 27.88 (CH₃-Boc), 27.78 (CH₃-Boc), 20.88 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₀H₄₇N₄O₁₁ 639.3236, found 639.3231.

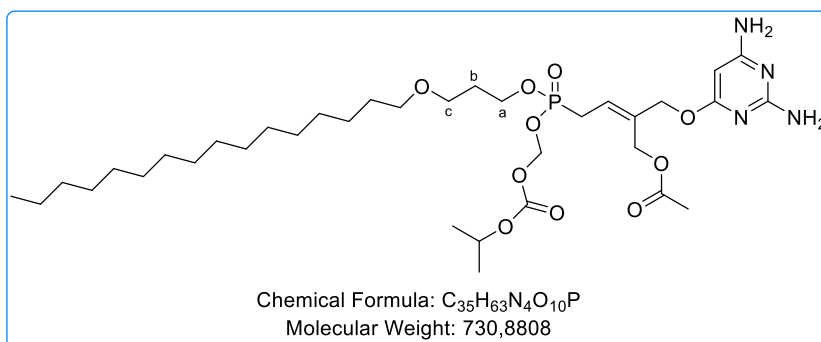
- ✓ [(E/Z)-2-[2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]-4-[3-hexadecyloxypropoxy-(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]but-2'-enyl] acetate (**11**)



Following general procedure C, using **10** (1.25 g, 1.95 mmol, 1 eq.) as starting material and HDP/POC allylphosphonate **6** (2.03, 3.90 mmol, 2 eq.), the desired brown oil compound, was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (6/4) as a mixture of four diastereoisomers **11** (*Z* (*P_R* and *P_S*)/*E* (*P_R* and *P_S*) 1/1) (1.21 g, 55%).

¹H-NMR (250 MHz, Acétone-d₆) δ 7.03 (s, 1H, H_s, *E* isomer), 7.02 (s, 1H, H_s, *Z* isomer), 5.81-5.78 (m, 1H, CH=C), 5.64-5.60 (m, 2H, O-CH₂-O), 5.06 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *E* isomer), 4.96 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *Z* isomer), 4.89 (sept, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 4.79 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂-OAc, *E* isomer), 4.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂-OAc, *Z* isomer), 4.16-4.10 (m, 2H, H_a), 3.49 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H_c), 3.41 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.86 (dd, *J* = 23.4, 8.0 Hz, 2H, CH₂-P), 2.01 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.88 (quint, *J* = 6.3 Hz, 2H, H_b), 1.55 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.53 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.48 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.30-1.22 (m, 26H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃; 6H, CH(CH₃)₂), 0.88 (m, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

- ✓ (*Z*)-2-(((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)methyl)-4-((3-(hexadecyloxy)propoxy)-((isopropoxycarbonyl)oxy)methoxy)phosphoryl]but-2-en-1-yl acetate (**12**)



Following general procedure D, from boc-compound **11** (3.72 g, 3.29 mmol, 1 eq.) as starting material a mixture of four diastereoisomers (*Z* (*P_R* and *P_S*)/*E* (*P_R* and *P_S*) 1/1) (2.29 g, 95%) was obtained as a colorless oil. The *Z* and *E* diastereoisomers were separated by several column chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (98/2 to 95/5) to give mixture of *Z* **12** (*P_R* and *P_S*) > 95%.

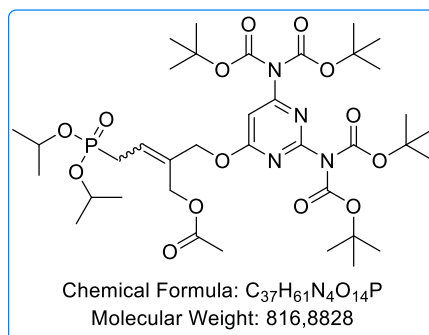
¹H NMR (700 MHz, Acetone-d₆) δ 5.82 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH=C), 5.64 (ddd, *J* = 17.6, 13.1, 5.5 Hz, 2H, O-CH₂-O), 5.54 (s, 2H, NH₂), 5.39 (bs, 2H, NH₂), 5.25 (s, 1H, H₅), 4.91 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 4.76 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy), 4.72 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, CH₂-OAc), 4.20 – 4.05 (m, 2H, Ha), 3.48 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, Hc), 3.41 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.87 (m, 2H, CH₂-P), 2.02 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.88 (quint, *J* = 7 Hz, 2H, Hb), 1.55 (quint, *J* = 7 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.36-1.27 (m, 26 H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃; 6H, CH(CH₃)₂), 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

¹³C NMR (176 MHz, Acetone-d₆) δ 170.47 (C6), 169.96 (O-(C=O)-CH₃), 166.43 (C4 or C2), 163.22 (C4 or C2), 153.19 (C=O_{POC}), 135.59 (d, *J* = 14.2 Hz, CH=C), 121.55 (d, *J* = 11.3 Hz, CH=C), 84.39 (d, *J* = 6.1 Hz, O-CH₂-O), 77.11 (C5), 72.58 (CH(CH₃)₂), 70.60 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 66.21 (Cc), 66.10 (d, *J* = 1.9 Hz, CH₂-O-DAPy), 63.01 (d, *J* = 7.0 Hz, Ca), 59.30 (d, *J* = 1.6 Hz, CH₂-OAc), 31.74 (s), 30.68 (d, *J* = 6.1 Hz, Cb), 29.51 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 26.55 (CH₂), 26.07 (m, CH₂-P), 25.75 (CH₂), 22.43 (CH₂), 20.93 (d, *J* = 2.5 Hz, CH(CH₃)₂), 20.93 (d, *J* = 2.5 Hz, CH₂), 19.85 (O-(C=O)-CH₃), 13.46 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone-d₆) δ 26.59.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺calcd for C₃₅H₆₄N₄O₁₀P: 731.4359, found: 731.4351.

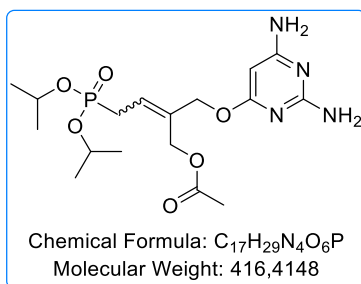
- ✓ [(*E/Z*)]-2-(((2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl)oxy)methyl)-4-(diisopropoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl acetate (**23**)



Following [general procedure C](#), from compound **10** (1.5 g, 2.4 mmol, 1 eq.) as starting material and diisopropyl allylphosphonate **22** (989 mg, 4.8 mmol, 2 eq.), the desired brown oil compound **23** (670 mg, 34%), was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (6/4 to 1/1) as a mixture of two diastereoisomers (*Z/E*, 1/1).

¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ 7.01 (s, 1H, H₅, *Z* or *E* isomer), 7.0 (s, 1H, H₅, *Z* or *E* isomer), 6.0-5.82 (m, 1H, CH=C), 5.05 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *E* isomer or *Z* isomer), 4.96 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *E* isomer or *Z* isomer), 4.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, CH₂-OAc, *E* isomer or *Z* isomer), 4.71 – 4.63 (m, 4 H, CH₂-OAc, *E* isomer or *Z* isomer, CH(CH₃)₂), 2.85 – 2.71 (m, 2H, CH₂-P), 2.00 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.53 (s, 18 H, CH₃-Boc), 1.47 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.32 – 1.17 (m, 12 H, CH(CH₃)₂).

✓ **[(E/Z)]-2-(((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)methyl)-4-(diisopropoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl acetate (**24**)**



Following general procedure D, from boc-compound **23** (322 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), a mixture of two diastereoisomers (*Z/E*, 1/1) **24** (149 mg, 92%) was obtained as a dark a dark brown oil. The *Z* and *E* diastereoisomers were separated by column chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (100% to 95/5) to give mixture of *Z* **24a** > 95% or by semi preparative Chromatography (cf. chapter 2, paragraph 2.3.2)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 5.90 – 5.56 (m, 5H, NH₂, CH=C), 5.24 (s, 1H, **H5**, *E* isomer) 5.23 (s, 1H, **H5**, *Z* isomer), 4.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *E* isomer), 4.74 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, *Z* isomer), 4.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, CH₂-OAc, *Z* isomer), 4.66 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 4.62 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂-OAc, *E* isomer), 2.78 (m, 2H, CH₂-P), 2.02 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.34 – 1.23 (m, 12H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170.6 (O-(C=O)-CH₃), 170.5 (O-(C=O)-CH₃), 170.0 (**C6**), 169.7 (**C6**), 166.1 (**C2**), 166.0 (**C2**), 162.9 (**C4**), 162.9 (**C4**), 135.56 (d, *J* = 12.6 Hz, CH=C), 135.42 (d, *J* = 12.3 Hz, CH=C), 123.78 (d, *J* = 10.8 Hz, CH=C), 123.59 (d, *J* = 10.7 Hz, CH=C), 77.0 (**H5**), 69.9 (CH(CH₃)₂), 66.3 (CH₂-O-DAPy, *Z* isomer), 65.4 (CH₂-OAc, *E* isomer), 60.4 (CH₂-O-DAPy, *E* isomer), 59.4 (CH₂-OAc, *Z* isomer), 27.0 (d, *J* = 140.3 Hz, CH₂-P), 24.20 (m, CH(CH₃)₂), 19.9(O-(C=O)-CH₃).

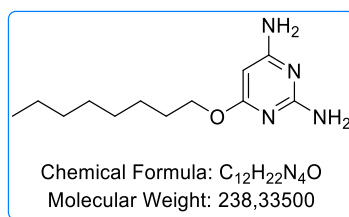
³¹P NMR (162 MHz, Acetone-d₆) δ 24.44 (*Z* or *E*), 24.19 (*Z* or *E*).

Pure *Z*

¹H NMR (250 MHz, Acetone) δ 5.83 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH=C), 5.53 (s, 2H, NH₂), 5.40 (s, 2H, NH₂), 5.23 (s, 1H, **H5**) 4.76 (dd, *J* = 4.1, 1.0 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy), 4.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂-OAc), 4.69 – 4.57 (m, 2H, CH-(CH₃)₂), 2.74 (dd, *J* = 22.5, 8.1 Hz, 2H, CH₂-P), 2.02 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.27 (t, *J* = 6.2 Hz, 6H, CH-(CH₃)₂).

HRMS-ESI (*m/z*) Calcd for C₁₇H₃₀N₄O₆P⁺ [M+H]⁺, 417.1897; found, 417.1904.

✓ 2,4 diamino-6-octyloxy-pyrimidine (31)



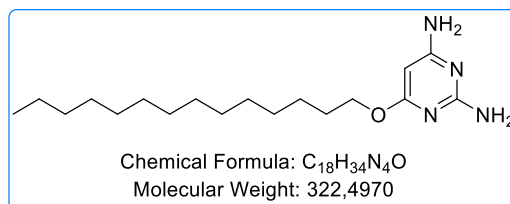
Following general procedure A, using 2,4 diamino-6-chloropyrimidine **7** (100 mg, 0.69 mmol, 1 eq.) as starting material and octanol (330 μ L, 2.08 mmol, 3 eq.), desired compound **31** (164 mg, 100%) was obtained after purification on flash chromatography eluting with DCM/MeOH (95/5) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.24 (s, 1H, H5), 4.07 (t, J = 8 Hz, 2H, CH₂-O), 1.70 (quint, J = 8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-O), 1.29 (m, 8H, 4 CH₂), 0.90 (t, J = 8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 172.53 (C6), 167.82 (C2 or C4), 164.24 (C2 or C4), 77.18 (C5), 67.45 (CH₂-O), 32.97 (CH₂-CH₂-O), 30.43 (CH₂), 30.39 (CH₂), 30.14 (CH₂), 27.09 (CH₂-CH₂-CH₂-O), 23.71 (CH₃-CH₂), 14.41 (CH₃-CH₂).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₂₃N₄O 239.1867, found 239.1866.

✓ 2,4 diamino-6-tetradecyloxy-pyrimidine (32)



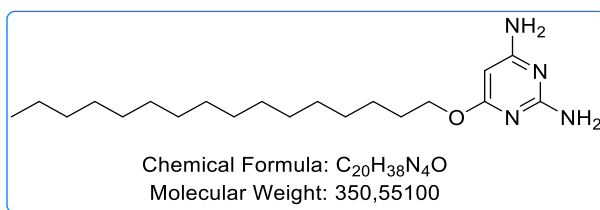
Following general procedure A, using 2,4 diamino-6-chloropyrimidine **7** (100 mg, 0.69 mmol, 1 eq.) as starting material and tetradecanol (445 mg, 2.08 mmol, 3 eq.), desired compound **32** (192mg, 87%) was obtained after purification by flash chromatography DCM/MeOH (95/5), as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.24 (s, 1H, H5), 4.07 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-O), 1.71 (quint, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-O), 1.31 (m, 20H, 10 CH₂), 0.90 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 172.52 (C6), 167.79 (C2 or C4), 164.23 (C2 or C4), 77.22 (C5), 67.45 (CH₂-O), 33.07 (CH₂), 30.80 (CH₂), 30.78 (CH₂), 30.76 (CH₂), 30.70 (CH₂), 30.47 (CH₂), 30.15 (CH₂-CH₂-O), 27.09 (CH₂-CH₂-CH₂-O), 23.73 (CH₃-CH₂), 14.44 (CH₃-CH₂).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₃₅N₄O 323.2805, found 323.2805.

✓ **2,4 diamino-6-hexadecyloxy-pyrimidine (33)**



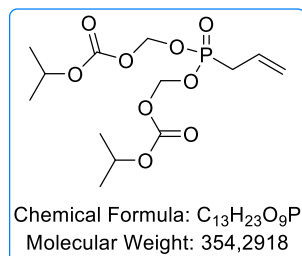
Following general procedure A, using 2,4 diamino-6-chloropyrimidine **7** (106 mg, 0,73 mmol, 1 eq.) as starting material and 1-hexadecanol (533 mg, 2,20 mmol, 3 eq.), desired compound **33** (194 mg, 76%) was obtained after flash column chromatography on silica gel (eluting Petroleum ether/ ethyl acetate 1/9), as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.24 (s, 1H, **H5**), 4.07 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, **CH₂-O**), 1.71 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H, **CH₂-CH₂-O**), 1.43 (m, 2H, **CH₂-CH₂-CH₂-O**), 1.29 (m, 24H, 12 **CH₂**), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, **CH₃**).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 172.52 (**C6**), 167.79 (**C2** or **C4**), 164.22 (**C2** or **C4**), 77.23 (**C5**), 67.45 (**CH₂-O**), 33.08 (**CH₂**), 30.79 (**CH₂**), 30.76 (**CH₂**), 30.71 (**CH₂**), 30.48 (**CH₂**), 30.16 (**CH₂-CH₂-O**), 27.09 (**CH₂-CH₂-CH₂-O**), 23.74 (**CH₃-CH₂**), 14.44 (**CH₃-CH₂**).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₃₉N₄O 351.3118, found 351.3122.

✓ **Bis(POC)-allyl phosphonate (58)**

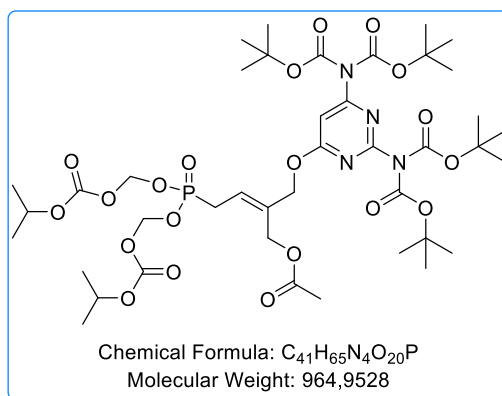


To an acetonitrile (25 mL) solution of dimethyl allylphosphonate **4** (3.00 g, 1.0 equiv., 19.98 mmol), anhydrous sodium iodide (7.49 g, 2.5 equiv., 49.96 mmol), chloromethylisopropyl-carbonate (6.69 mL, 2.5 equiv., 49.96 mmol) and molecular sieves were added. The mixture was refluxed at 90 °C during 72 h under N₂ atmosphere. After cooling, acetonitrile was evaporated, and molecular sieves were filtrated. The mixture was diluted with 220 mL of ethyl acetate, washed by 60 mL of water, 60 mL of aqueous solution of Na₂S₂O₃ and 60 mL of brine. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtrated, evaporated, and purified by silica gel column chromatography on silica gel (EtOAc/PE, 25/75) to give pure *bis*(POC) allylphosphonate **58** (5.34 g, 76%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.82-5.71 (m, 1H, **CH₂=CH**), 5.68 (dd, 2H, *J* = 11.6, 5.4 Hz, **O-CH₂-O**), 5.65 (dd, 2H, *J* = 11.6, 5.4 Hz, **O-CH₂-O**), 5.30-5.22 (m, 2H, **CH₂=CH**), 4.94 (sept., *J* = 6.2 Hz, 2H, **CH(CH₃)₂**), 2.74 (dd, *J* = 22.8, 7.4 Hz, 2H, **CH₂-P**), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 12H, **CH(CH₃)₂**).

CAS: 1258789-64-8.

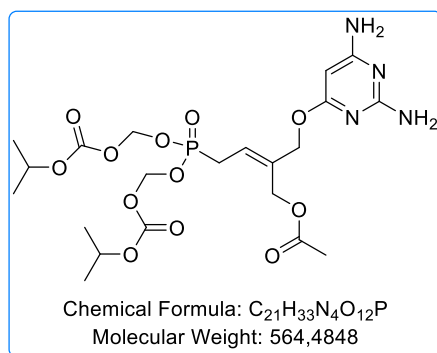
- ✓ [(E/Z)-4-[bis(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]-2-[[[2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)-amino]pyrimidin-4-yl]oxymethyl]but-2-enyl] acetate (**59**)



Following general procedure C, from boc-compound **10** (991 mg, 1.55 mmol, 1 eq.) and bis(POC) allylphosphonate **58** (1.10, 3.10 mmol, 2 eq.), the desired brown oil compound (853 mg, 0.88 mmol, 55%), was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (6/4) as a mixture of two diastereoisomers **59** (Z/E, 1/1).

¹H-NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ 7.04 (s, 1H, **H5**, E isomer), 7.02 (s, 1H, **H5**, Z isomer), 5.94-5.80 (m, 1H, **CH=C**), 5.72-5.61 (m, 4H, O-**CH**₂-O), 5.05 (d, J = 2.5 Hz, 2H, **CH**₂-ODAPy, E isomer), 4.96 (d, J = 4.1 Hz, 2H, **CH**₂-ODAPy, Z isomer), 4.91 (sept, J = 6.3 Hz, 2H, **CH**(CH₃)₂), 4.77 (d, J = 2.5 Hz, 2H, **CH**₂-OAc, Z isomer), 4.69 (d, J = 2.5 Hz, 2H, **CH**₂-OAc, E isomer), 3.02 (dd, J = 23.4, 8.0 Hz, 2H, **CH**₂-P), 2.00 (s, 3H, O-(C=O)-**CH**₃), 1.53 (s, 18H, **CH**₃-Boc), 1.47 (s, 18H, **CH**₃-Boc), 1.30 (d, J = 6.3 Hz, 12H, **CH**(CH₃)₂).

- ✓ [(Z)-4-[bis(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]-2-[[[2,6-diaminopyrimidin-4-yl]oxymethyl]but-2-enyl] acetate (**41**)



Following general procedure D, from boc-compound **59** (821 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) a mixture of two diastereoisomers (Z/E, 1/1) (408 mg, 0.72 mmol 85%), was obtained, as a colorless oil. The Z and E diastereoisomers were separated by column chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (98/2) to give mixture of Z **41** > 95%.

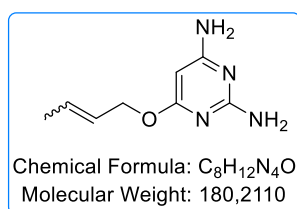
¹H-NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.67 (m, 9H, **CH=C**, O-**CH**₂-O, **NH**₂), 5.27 (s, 1H, **H5**), 4.94 (sept, J = 6.7 Hz 2H, **CH**(CH₃)₂), 4.77 (d, J = 4.6 Hz, 2H, **CH**₂-O-DAPy), 4.72 (d, J = 2.2 Hz, 2H, **CH**₂-OAc), 2.97 (dd, J = 23.3, 8.0 Hz, 2H, **CH**₂-P), 2.02 (s, 3H, O-(C=O)-**CH**₃), 1.31 (d, J = 6.2 Hz, 12H, **CH**(CH₃)₂).

¹³C-NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 170.49 (C6), 169.96 (O-(C=O)-CH₃), 165.80 (C4), 162.63 (C4), 153.12 (C=O_{POC}), 136.16 (d, *J* = 14.7 Hz, CH=C), 120.69 (d, *J* = 11.6 Hz, CH=C), 84.18 (d, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂-O), 77.11 (C5), 72.77 (CH(CH₃)₂), 66.29 (d, *J* = 2.5 Hz, CH₂-O-DAPy), 59.27 (d, *J* = 2.1 Hz, CH₂-OAc), 26.46 (d, *J* = 139.4 Hz, CH₂-P), 20.92 (CH(CH₃)₂), 19.83 (O-(C=O)-CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, Acetone-d₆) δ 26.51.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₄N₄O₁₂P: 565.1911, found: 565.1904.

✓ **6-(but-2-en-1-yloxy)pyrimidine-2,4-diamine (66)**



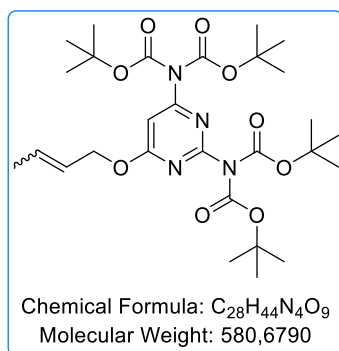
Following general procedure A, using 2,4 diamino-6-chloropyrimidine **7** (2 g, 13.8 mmol, 1 eq.) as starting material and crotyl alcohol, mixture of cis/trans isomers (3.6 mL, 41.4 mmol, 3 eq.), expected compound **66** (617 mg, 3.43 mmol, 25%) was obtained after purification by flash chromatography eluting with DCM/MeOH (98/2 to 95/5), as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.70 (m, 2H, CH=CH), 5.53 (bs, 2H, NH₂), 5.45 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (s, 1H, H₅), 4.56 (m, 2H, CH₂-O), 1.66 (m, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 171.50 (C6), 167.15 (C4 or C2), 164.15 (C4 or C2), 129.96 (CH=CH), 127.65 (CH=CH), 77.78 (C5), 66.26 (CH₂-O), 17.85 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₃N₄O 181.1084, found 181.1081.

✓ **Bis-*N,N*-di(*tert*-butoxycarbonyl-amino)- (6-(but-2-en-1-yloxy)pyrimidine-2,4-diyl) (67)**



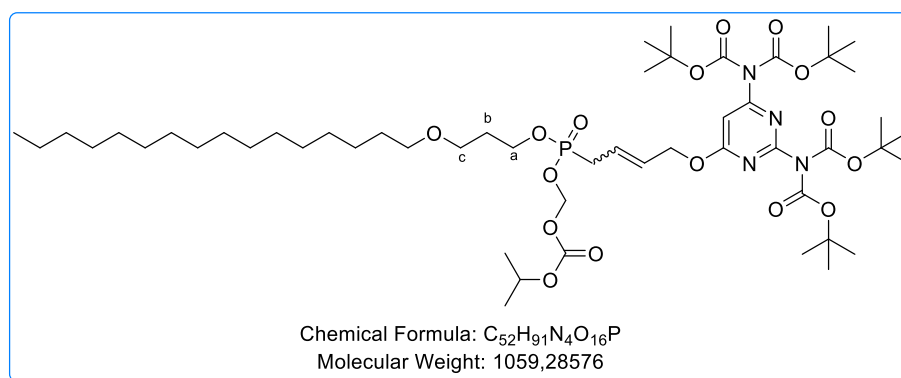
Following general procedure B, from compound **66** (617 mg, 3.42 mmol, 1 eq.) as starting material, desired product **67** (1.33 g, 67%) was obtained, as a colourless oil, after purification by flash column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate (10/0 to 9/1) as eluent.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.85 (s, 1H, **H5**), 5.81 (m, 1H, CH₃-CH=CH), 5.67 (m, 1H, CH₃-CH=CH), 4.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy), 1.69 (dd, *J* = 6.4, 1.5 Hz, 3H, CH₃), 1.47 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.40 (s, 18H, CH₃-Boc).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.51 (**C6**), 159.87 (**C4** or **C2**), 156.5 (**C4** or **C2**), 150.47 (C=O_{Boc}), 150.02 (C=O_{Boc}), 131.55 (CH=CH), 125.19 (CH=CH), 96.63 (**C5**), 84.07 (Cq_{Boc}), 83.03 (Cq_{Boc}), 67.78 (CH₂-O-DAPy), 27.87 (CH₃-Boc), 27.77 (CH₃-Boc), 17.84 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₄₅N₄O₉ 581.3181, found 581.3179.

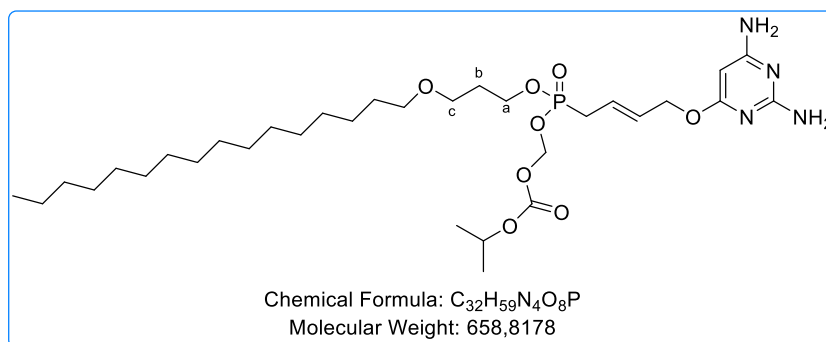
- ✓ (*E/Z*)-di-tert-butyl(6-((4-((3-(hexadecyloxy)propoxy) ((isopropoxycarbonyl)oxy)methoxy)phosphoryl)but-2-en-1-yl)oxy)pyrimidine-2,4-diy)bis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) (**68**)



Following general procedure C, using boc-coumpound **67** (1 g, 1.72 mmol, 1 eq.) as starting material and HDP/POC allylphosphonate **6** (1.79, 3.44 mmol, 2 eq.) the desired brown oil compound, was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (10/0 to 8/2) as a mixture of four diastereoisomers **68** (*Z* (P_R and P_S)/*E* (P_R and P_S) 2/8) (546 mg, 30%).

¹H NMR (250 MHz, Acetone) δ 7.01 (s, 1H, **H5**, *E* and *Z* isomer), 6.07 – 5.80 (m, 2H, CH=CH), 5.73 – 5.56 (m, 2H, O-CH₂-O), 4.91 (m, 3H, CH₂-O-DAPy, *Z* and *E* isomer, CH(CH₃)₂), 4.25 – 4.02 (m, 2H, **Ha**), 3.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **Hc**), 3.41 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.75 (dd, *J* = 22.5, 6.1 Hz, 2H, CH₂-P), 1.90 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H, **Hb**), 1.55 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.49 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.34-1.28 (m, 28H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃; 6H, CH(CH₃)₂), 0.89 (m, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

- ✓ **(E)-(((4-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)but-2-en-1-yl)(3-(hexadecyloxy)propoxy)phosphoryl)oxy)methyl isopropyl carbonate (42)**



Following general procedure D, using boc-compound **68** (546,2 mg, 0.51 mmol, 1 eq.) as starting material a mixture of four diastereoisomers (Z (P_R and P_S)/E (P_R and P_S in proportion 2/8) (271 mg, 83%) as a colorless oil. Z (**69**) and E (**42**) diastereoisomers were separated by column chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (98/2) to give mixture of E **42** (P_R and P_S) > 95%.

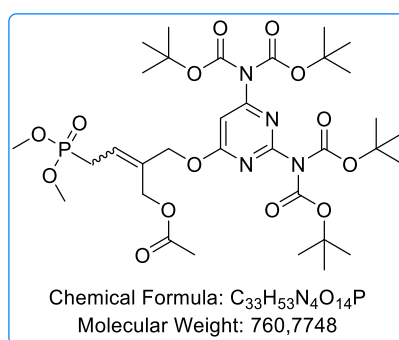
¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.81 (m, 2H, CH=C), 5.62 (m, 6H, O-CH₂-O, NH₂), 5.22 (s, 1H, H₅), 4.90 (sept., J = 6.2 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 4.68 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy), 4.13 (m, 2H, H_a), 3.48 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H_c), 3.39 (t, J = 6.5 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.70 (dd, J = 22.4, 6.9 Hz, 2H, CH₂-P), 1.87 (quint, J = 6.1 Hz, 2H, H_b), 1.54 (quint, J = 6.2 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.41–1.21 (m, 26 H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃; 6H, CH(CH₃)₂), 0.86 (m, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 170.50 (C₆), 166.12 (C₄), 162.99 (C₂), 153.19 (C=O_{POC}), 131.17 (d, J = 14.7 Hz, CH=C), 122.20 (d, J = 11.3 Hz, CH=C), 84.34 (d, J = 6.0 Hz, O-CH₂-O), 77.06 (C₅), 72.55 (CH(CH₃)₂), 70.60 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 66.23 (C_c), 64.69 (CH₂-O-DAPy), 62.93 (d, J = 7.0 Hz, H_a), 31.73 (CH₂), 30.82 (under acetone peak, 8 CH₂), 30.70 (d, J = 6.1 Hz, C_b), 29.65 (CH₂), 29.51 (CH₂), 29.49 (CH₂), 29.37 (CH₂), 29.17 (CH₂), 26.07 (CH₂), 22.42 (CH₂), 20.94 (CH₂), 13.45 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone-d₆) δ 26.44.

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺calcd for C₃₂H₆₀N₄O₈P 659.4149, found 659.4145.

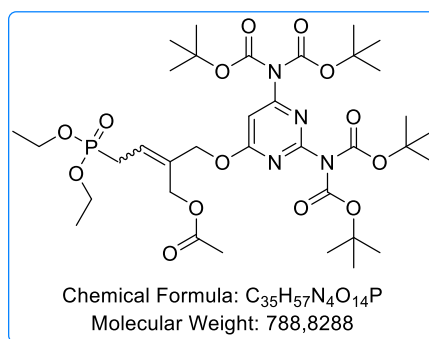
- ✓ **[(E/Z)-2-(((2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl)oxy)methyl)-4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl acetate (89)**



Following general procedure C, from boc compound **10** (500 mg, 0.78 mmol, 1 eq.) as starting material and dimethyl allylphosphonate **4** (235 mg, 1.56 mmol, 2 eq.), the desired brown oil compound (296 mg, 50%), was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (1/9) as a mixture of two diastereoisomers **89** (Z/E, 1/1).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 7.02 (s, 1 H, H₅, E or Z isomer), 7.01(s, 1 H, H₅, E or Z isomer), 5.96-5.85 (m, 1 H, CH=C), 5.05 (d, 2 H, J = 2.7 Hz, CH₂-O-DAPy, E isomer or Z isomer), 4.96 (d, 2 H, J = 3.9 Hz, CH₂-O-DAPy, E isomer or Z isomer), 4.78 (d, 2 H, J = 2.6 Hz, CH₂-OAc, E isomer or Z isomer), 4.69 (d, 2 H, J = 4.0 Hz, CH₂-OAc, E isomer or Z isomer), 3.73 (d, J = 1.8 Hz, 3H, CH₃-O-P), 3.70 (d, J = 1.8 Hz, 3H, CH₃-O-P), 2.92 – 2.76 (m, 2H, CH₂-P), 2.00 (s, 3 H, O-(C=O)-CH₃), 1.53 (s, 18 H, CH₃-Boc), 1.47 (s, 18 H, CH₃-Boc).

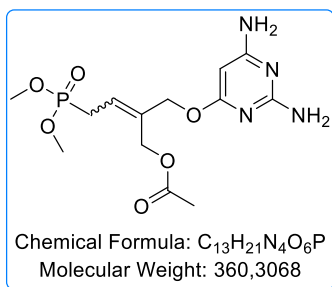
✓ **[(E/Z)]-2-(((2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl)oxy)methyl)-4-(diethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl acetate (90)**



Following general procedure C, from compound **10** (1 g, 1.5 mmol, 1 eq.) as starting material and diethyl allylphosphonate **93** (536.8 mg, 3 mmol, 2 eq.), the desired brown oil compound (548 mg, 53%), was obtained by flash column chromatography eluting by petroleum ether/ethyl acetate (1/1 to 0/1) as a mixture of two diastereoisomers **90** (Z/E, 1/1).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 7.01 (s, 1H, s, 1 H, H₅, E or Z isomer), 7.01 (s, 1 H, H₅, E or Z isomer), 5.99 – 5.84 (m, 1H, CH=C), 5.05 (d, J = 2.5 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, E or Z isomer), 4.96 (d, J = 3.8 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, E or Z isomer), 4.79 (d, J = 2.5 Hz, 2H, CH₂-OAc, E or Z isomer), 4.69 (d, J = 3.7 Hz, 1H, CH₂-OAc, E or Z isomer), 4.10 – 4.01 (m, 4 H, CH₃-CH₂-O-P), 2.89-2,78 (m, 2 H, CH₂-P), 2.00 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.53 (s, 18 H, CH₃-Boc), 1.49 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.27 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃-CH₂-O-P), 1.24 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃-CH₂-O-P).

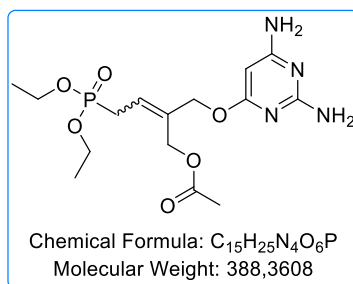
- ✓ **[[E/Z]-2-[[[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)methyl]-4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl]acetate (91)**



Following general procedure D, using boc-compound **89** (296, 0.39 mmol, 1 eq.) as starting material, a mixture of two diastereoisomers **91** (Z/E, 1/1) (123 mg, 0.34 mmol, 88%).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 5.82 – 5.72 (m, 1H, CH=C), 5.57 – 5.53 (m, 4 H, NH₂); 5.23 (s, 1H, H₅, E isomer), 5.21 (s, 1H, H₅, Z isomer), 4.83 (d, J = 2.2 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, E isomer), 4.74 (d, J = 4.0 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, Z isomer), 4.71 (d, J = 2.1 Hz, 2H, CH₂-OAc, Z isomer), 4.61 (d, J = 3.6 Hz, 2H, CH₂-OAc, E isomer), 3.69 (m, 6H, CH₃-O-P), 2.85 (m, 2H, CH₂-P), 2.00 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃).

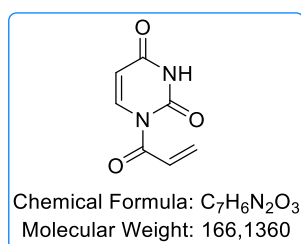
- ✓ **[[E/Z]-2-[[[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)methyl]-4-(diethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl]acetate (92)**



Following general procedure D, from boc-compound **90** (548 mg, 0.7 mmol, 1 eq.), a mixture of two diastereoisomers **92** (Z/E, 1/1) (244 mg, 90%) was obtained, as a dark brown oil.

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.81 (m, 1H, CH=C), 5.24 (s, 1H, H₅, E isomer), 5.23 (s, 1H, H₅, Z isomer), 4.82 (s, 1H), 4.82 (s, 2H, CH₂-O-DAPy, E isomer), 4.73 (d, J = 3.4 Hz, 2H, CH₂-O-DAPy, Z isomer), 4.71 (s, 2H, CH₂-OAc, Z isomer), 4.62 (d, J = 3.0 Hz, 2H, CH₂-OAc, E isomer), 4.11 (m, 4H, CH₃-CH₂-O-P), 2.97 – 2.82 (m, 2H, CH₂-P), 2.00 (s, 3H, O-(C=O)-CH₃), 1.25 (dd, J = 12.2, 6.6 Hz, 6H, CH₃-CH₂-O-P).

- ✓ **N1-acrylamide uracil (107)**



Following general procedure E, from uracil **101** (506 mg, 4.52 mmol, 1 eq.) and acryloyl chloride **105** (0.73 mL, 8.92 mmol, 2 eq.), the desired compound **107** was obtained (395 mg, 52 %) as white solid.

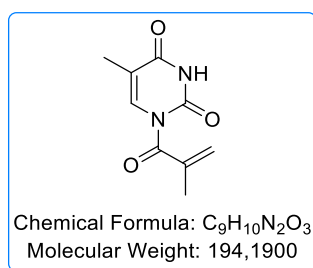
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.62 (bs, 1H, **NH**), 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, **H6**), 7.13 (dd, $J = 17.0, 10.4$ Hz, 1H, **CH₂=CH**), 6.40 (dd, $J = 17.0, 1.6$ Hz, 1H, **CH₂=CH**), 5.99 (dd, $J = 10.4, 1.6$ Hz, 1H, **CH₂=CH**), 5.83 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, **H5**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.53 (**C=O**), 163.01 (**C4**), 149.54 (**C2**), 138.46 (**C6**), 131.35 (**CH₂=CH**), 130.72 (**CH₂=CH**), 104.54 (**C5**).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_3$: 167.0451 found: 167.0450.

CAS : 1395070-39-9

✓ ***N*1-methacrylamide thymine (108)**



Following general procedure E, using thymine **102** (500 mg, 3.97 mmol, 1 eq.) and methacryloyl chloride **106** (0.77 mL, 7.94 mmol, 2 eq.), the expected compound **108** (423 mg, 55%) was obtained as white solid.

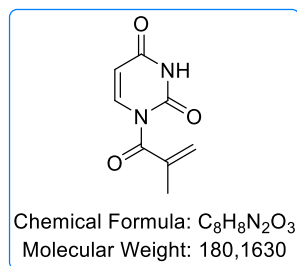
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (bs, 1H, **H3**), 7.72 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, **H6**), 5.73 (s, 1H, **CH₂=C-CH₃**), 5.67 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, **CH₂=C-CH₃**), 1.98 (s, 3H, **CH₂=C-CH₃**), 1.83 (s, 3H, **CH₃-thymine**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.30 (**C=O**), 164.44 (**C4**), 149.64 (**C2**), 140.13 (**CH₂=C-CH₃**), 135.63 (**C6**), 124.97 (**CH₂=C-CH₃**), 111.64 (**C5**), 18.39 (**CH₂=C-CH₃**), 12.39 (**CH₃-thymine**).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$: 195,0764 found: 195,0763.

CAS: 106890-73-7

✓ ***N*1-methacrylamide uracil (109)**

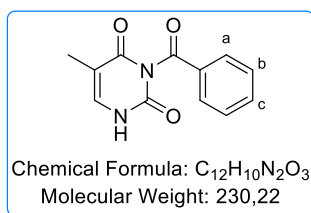


Following general procedure E, using uracil **101** (500 mg, 4.46 mmol, 1 eq.) and methacryloyl chloride **106** (0.87 mL, 8.92 mmol, 2 eq.) the desired compound **109** was obtained (421 mg, 52%) as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (bs, 1H, **NH**), 7.81 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **H6**), 5.77 (m, 3H, **H5**, $\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3$), 1.97 (s, 3H, $\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.15 (**C=O**), 163.70 (**C4**), 149.63 (**C2**), 140.51 (**C6**), 139.80 ($\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3$), 126.14 ($\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3$), 103.80 (**C5**), 18.29 ($\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3$).

✓ ***N*3-benzoylthymine (116)**



Following general procedure I: from thymine **102** (1 g, 7.94 mmol, 1eq.) the expected *N*3-benzoylthymine **116** (1.78 g, 98%) was obtained as a white solid.

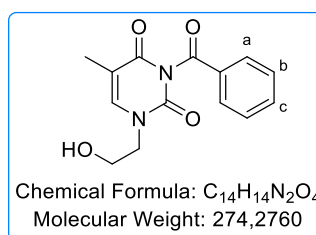
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (bs, 1H, **NH**), 7.97 – 7.89 (m, 2H, **Ha**), 7.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, **Hc**), 7.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, **Hb**), 7.53 (s, 1H, **H6**), 1.82 (s, 3H, CH_3 -thymine).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.63 (**C=O_{bz}**), 164.03 (**C4**), 150.46 (**C2**), 139.36 (**C6**), 135.76 (**Cc**), 131.90 (**Cq_{bz}**), 130.66 (**Ca**), 129.92 (**Cb**), 108.30 (**C5**), 12.15 (CH_3 -thymine).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$ 231.0764, found 231.0764.

CAS : 4330-20-5

✓ ***N*1-(2-hydroxyethyl)-*N*3-benzoylthymine (117)**



Following general procedure J: using of *N*3-benzoylthymine **116** (1 g, 4.34 mmol, 1eq.) as starting material, the expected *N*1-(2-hydroxyethyl)-*N*3-benzoylthymine **117** was obtained (770 mg, 2.8 mmol, 65%) after purification on flash chromatography using EP/AcOEt as eluant (1/1 to 2.5/7.5), as a white solid.

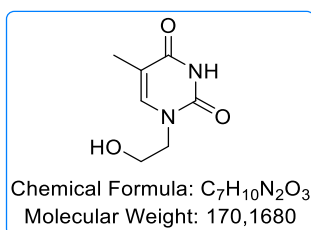
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, **Ha**), 7.78 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, **Hc**), 7.71 (s, 1H, **H6**), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, **Hb**), 5.02 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3.78 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3.62 (q, $J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 1.85 (s, 3H, CH_3 -thymine).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 169.83 (C=O_{bz}), 162.99 (C4), 149.47 (C2), 143.35 (C6), 135.34 (Cc), 131.28 (Cq_{bz}), 130.21 (Ca), 129.44 (Cb), 107.68 (C5), 58.39 (CH₂-CH₂-OH), 50.51 (CH₂-CH₂-OH), 11.77(CH₃-thymine).

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺calcd for C₁₄H₁₄N₂O₄ : 275.1027 found 275.1026.

CAS : 959083-63-7

✓ **N1-(2-hydroxyethyl)thymine (118)**



Following general procedure K: from *N1*-(2-hydroxyethyl)-*N3*-benzoylthymine **117** (548 mg, 2 mmol, 1eq.), the expected *N1*-(2-hydroxyethyl)thymine was obtained (300 mg, 1.76 mmol, 88%), as a white solid, after flash column chromatography using DCM/MeOH as eluant (95/5 to 93/7).

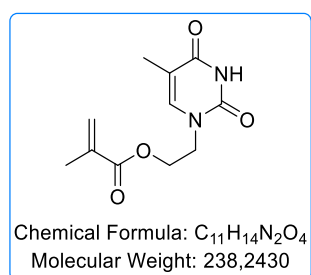
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.18 (bs, 1H, H3), 7.43 (s, 1H, H6), 4.87 (bs, 1H, CH₂-CH₂-OH), 3.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 3.56 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 1.75 (s, 3H, CH₃-thymine).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 164.87 (C4), 151.41 (C2), 142.91 (H6), 108.04 (C5), 59.10 (CH₂-CH₂-OH), 50.37 (CH₂-CH₂-OH), 12.38 (s, CH₃-thymine).

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺calcd for C₇H₁₁N₂O₃ : 171.0764 found 171.0764.

CAS : 22441-51-6

✓ **N1-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine (119)**



To a suspension of *N1*-(2-hydroxyethyl)-thymine **118** (200 mg, 1.18 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF, was added triethylamine (658 μL, 4.72 mmol, 4 eq.). The mixture was cooled at 0°C and methacryloyl chloride **106** (140 μL, 1.42 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise to the reaction. The mixture was stirred at 25°C for 18 h. The volatiles were evaporated, and the expected *N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]thymine **119** (153 mg, 55%) was obtained as a white powder by flash column chromatography on silica gel using petroleum ether/ ethyl acetate (1/1) as eluant.

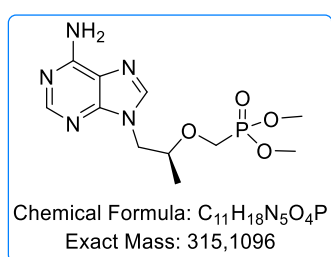
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.25 (s, 1H, NH), 7.52 (s, 1H, C6), 6.01 (s, 1H, C=CH₂), 5.68 (s, 1H, C=CH₂), 4.29 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 3.94 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.84 (s, 3H, CH₃-acrylate), 1.73 (s, 3H, CH₃-thymine).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 166.20 (C=O_{acrylate}), 164.22 (C4), 150.90 (C2), 141.70 (C6), 135.56 (C=CH₂), 126.07 (C=CH₂), 108.25 (C5), 61.84 (CH₂-CH₂-O), 46.23 (CH₂-CH₂-O), 17.86 (CH₃-acrylate), 11.77 (CH₃-thymine).

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺calcd for C₁₁H₁₅N₂O₄ : 239.1026 found 239.1030.

CAS : 20245-88-9

✓ Bis(methyl)-Tenofovir (126)



Following [general procedure L](#), using Tenofovir **88** (500 mg, 1.74 mmol, 1 eq.) as starting material and MeOH (2 mL), the expected bis(methyl)-Tenofovir **126** (411 mg, 75%) was obtained as colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.14 (s, 1H, H2), 8.05 (s, 1H, H8), 7.18 (bs, 2H, NH₂), 4.43 – 4.09 (m, 2H, CH₂-CH-CH₃), 4.01 – 3.76 (m, 3H, CH₂-P and CH₂-CH-CH₃), 3.57 (dd, J = 17.0, 10.7 Hz, 6H, P-OCH₃), 1.10 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₂-CH-CH₃).

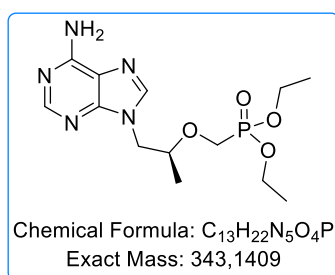
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 156.40 (C6), 152.85 (C2), 150.25 (C4), 141.79 (C8), 118.84(C5), 76.05 (d, J = 12.5 Hz, CH₂-CH-CH₃), 61.39 (d, J = 164.0 Hz, CH₂-P), 52.98 (dd, J = 14.3, 6.2 Hz, P-O-CH₃), 47.22 (CH₂-CH-CH₃), 17.20 (CH₂-CH-CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆) δ 23.79.

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺calcd for C₁₁H₁₉N₅O₄P : 316.1169 found 316.1169.

CAS: 1340601-82-2

✓ Bis(ethyl)-Tenofovir (127)



Following general procedure L, using Tenofovir **88** (500 mg, 1.74 mmol, 1 eq.) as starting material and MeOH (2.5 mL), the expected *bis*(ethyl)-Tenofovir **127** (429 mg, 72%) was obtained as colourless oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (s, 1H, **H2**), 8.24 (s, 1H; **H8**), 8.15 (bs, 2H, **NH₂**), 4.38-4.13 (m, 2H, **CH₂-CH-CH₃**), 4.03 – 3.64 (m, 7H, **CH₂-CH-CH₃**, P-O-**CH₂-CH₃**, **CH₂-P**), 1.13 (m, 9H, **CH₂-CH-CH₃**, P-O-**CH₂-CH₃**).

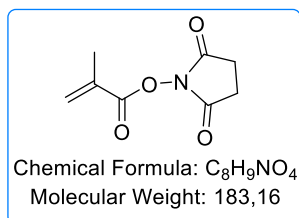
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 153.71 (**C6**), 149.78 (**C2**), 149.18 (**C4**), 143.29 (**C8**), 118.56 (**C5**), 75.82 (d, $J = 12.5$ Hz, **CH₂-CH-CH₃**), 62.10 (d, $J = 164$ Hz, **CH₂-P**), 62.10 (dd, $J = 10.5, 6.4$ Hz, P-O-**CH₂-CH₃**), , 47.61 (**CH₂-CH-CH₃**), 17.10 (**CH₂-CH-CH₃**), 16.66 (t, $J = 5.3$ Hz, P-O-**CH₂-CH₃**).

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, DMSO- d_6) δ 21.23.

HRMS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$: 344.1482 found 344.1485.

CAS: 180587-75-1

✓ **2,5-dioxopyrrolidin-1-yl methacrylate (130)**

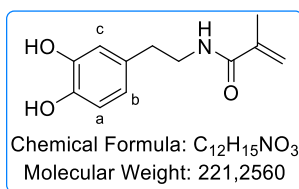


To a solution of MAA **114** (2 mL, 1 eq., 23,7 mmol) and NHS (3.22 g, 1.2 eq., 28 mmol) in THF (100 mL) was added dropwise a solution of DCC (5,84 g, 1.2 eq., 28 mmol) at 0°C. The mixture is stirring at room temperature for 6h. The filtrate was filtrate off and the crude was purified by flash chromatography on petroleum ether/ ethyl acetate (7/3) to afford the expected product **130** as white solid (3,56 g 82%).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 6.48 – 6.33 (m, 1H), 5.88 (qd, $J = 1.6, 0.8$ Hz, 1H), 2.85 (s, 4H, **CH₂**), 2.06 (dd, $J = 1.6, 1.0$ Hz, 9H).

CAS : 38862-25-8

✓ **Dopamine methacrylamide (131)**



A solution of MAA-NHS **130** (579 mg, 3,2 mmol, 1.2 eq.) in MeOH was degassed on argon flux for 10min and dopamine hydrochloride **128** (512 mg, 2,7 mmol, 1 eq.) was added to the solution and degassed again for 10 min. NaHCO_3 (267 mg, 3,2 mmol, 1.2 eq.) was added to the solution and stirred at room temperature for 6 h. After, all volatiles were removed under pressure. The crude was partitioned between ethyl acetate and H_2O and the organic layer was washed three times. The organic layer was

collected, and the crude was purified by flash chromatography on DCM/EtOH to give the expected compound **131** as a white powder (315 mg, 53%).

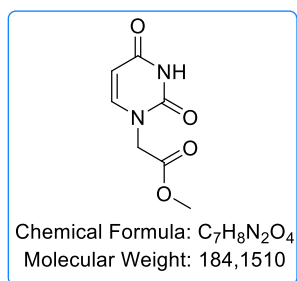
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 6.70 (d, J = 8.0, 1H, **Ha**), 6.67 (d, J = 1.8 Hz, 1H, **Hc**), 6.55 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H, **Hb**), 5.65 (s, 1H, CH₃-C=CH₂), 5.35 (s, 1H, CH₃-C=CH₂), 3.44 – 3.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.69 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.93 (s, 3H, CH₃-C=CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 169.84 (C=O), 144.88 (C^{Ar}), 143.38 (C^{Ar}), 140.08 (CH₃-C=CH₂), 130.72 (C^{Ar}), 119.67 (Cb), 118.78 (CH₃-C=CH₂), 115.52 (Cc), 114.96 (Ca), 41.16 (CH₂-CH₂-NH), 34.46 (CH₂-CH₂-NH), 17.34 (CH₃-C=CH₂).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺calcd for C₁₂H₁₆NO₃: 222.1125, found: 222.1121.

CAS : 471915-89-6

✓ ***N*1-methyl-uracil acetate (143)**



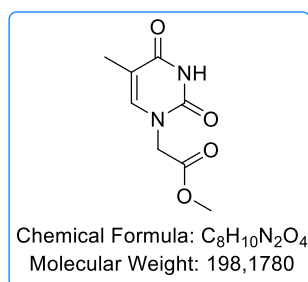
Following the general procedure F, with uracil **101** (448 mg, 4 mmol, 1 eq.) as starting material the expected *N*1-methyl-uracil acetate **143** was obtained (242 mg, 33%) as a white powder after purification on flash column chromatography (eluting PE/AcOEt, 6/4 to 5/5).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.38 (bs, 1H ; **NH**), 7.61 (d, J = 7.9 Hz, 1H ; **H6**), 5.61 (d, J = 7.9, 1H ; **H5**), 4.52 (s, 2H, CH₂-C(O)-O-CH₃), 3.69 (s, 3H, CH₂-C(O)-O-CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.10 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 164.16 (C4), 151.41 (C2), 146.28 (C6), 101.59 (C5), 52.75 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 48.97 (CH₂-C(O)-O-CH₃).

CAS : 5236-60-2

✓ ***N*1-methyl-thymine acetate (144)**



Following the general procedure E, with thymine **102** (504 mg, 4 mmol, 1 eq.) as starting material the expected *N1*-methyl-thymine acetate **144** was obtained (245 mg, 31%) as a white powder after purification on flash column chromatography (eluting PE/AcOEt, 5/5 to 3/7).

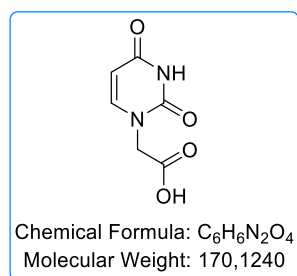
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.38 (bs, 1H ; NH), 7.50 (s, 1H ; H5), 4.48 (s, 2H, CH₂-C(O)-O-CH₃), 3.69 (s, 3H, CH₂-C(O)-O-CH₃), 1.76 (s, 3H ; CH₃-thymine).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 168.68 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 164.25 (C4) 150.89 (C2), 141.49 (C6), 108.57 (C5), 52.21 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 48.29 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 11.84 (CH₃-thymine).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺calcd for C₈H₁₀N₂O₄: 199.0713 found: 199.0714.

CAS : 134456-94-3

✓ ***N1*-(acetid acid) uracil (147)**



Method A: Following general procedure G, from *N1*-methyl-uracil acetate **143** (55 mg, 0,30 mmol, 1eq.) the expected compound **147** was obtained (48 mg, 94%) as a pink pale powder.

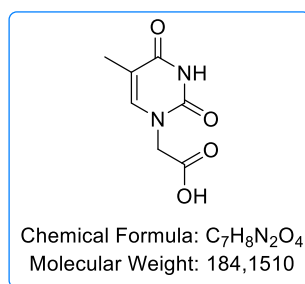
Method B: Following general procedure H, from uracil **101** (560 mg, 5 mmol, 1eq.) the desired compound **147** was obtained (407 mg, 44%), after recrystallization from distilled water, as a pink pale powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.31 (bs, 1H, NH), 7.59 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H6), 5.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H5), 4.39 (s, 2H, CH₂-C(O)-OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169.63 (CH₂-C(O)-OH), 163.87 (C4), 151.06 (C2), 146.19 (C6), 100.83 (C5), 48.76 (CH₂-C(O)-OH).

CAS: 4113-97-7

✓ ***N1*-(acetid acid) thymine (148)**



Method A: Following the general procedure G, from *N*₁-methyl-thymine acetate **144** (185 mg, 0,93 mmol, 1eq.) the expected compound **148** was obtained (167 mg, 97%) as a pink pale powder.

Method B: Following the general procedure H, from thymine **102** (1 g, 7.9 mmol, 1eq.) the desired compound **148** was obtained (674 mg, 46%), after recrystallization from distilled water, as a pink pale powder.

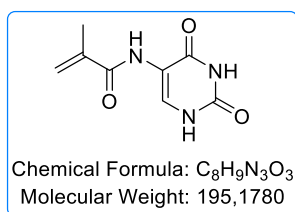
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.34 (bs, 1H, NH), 7.49 (s, 1H, H₆), 4.37 (s, 2H, CH₂), 1.76 (s, 3H, CH₃-thymine).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 170.11 (CH₂-C(O)-OH), 164.82 (C₄), 151.44 (C₂), 142.27 (C₆), 108.80 (C₅), 48.86 (CH₂-C(O)-OH), 12.35 (CH₃-thymine).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₇H₉N₂O₄ 185.0557, found 185.0558.

CAS: 20924-05-4

✓ **5-acrylamide-uracil (151)**



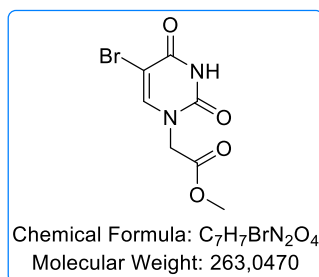
To a suspension of 5-aminouracil **150** (500 mg, 3.9 mmol, 1 eq.) in dry DCE (50 mL) was added BSA (2.4 mL, 9.75 mmol, 2.5 eq.) and the mixture was stirred at 110 °C until clear solution (2 h). Then, dry triethylamine (597 μL, 4,29 mmol, 1.1 eq.) was added and methacryloyl chloride **106** (427 μL, 4,29 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred at 90 °C for 16 h. the reaction was quenched with methanol and all volatiles was evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on flash column chromatography using EP/AcOEt (1/9) as eluant to give the expected compound **151** (434 mg, 52%) as orange powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.47 (bs, 1H, NH), 10.74 (bs, 1H, NH), 8.54 (bs, 1H, N⁵H), 7.90 (s, 1H, H₆), 5.81 (s, 1H, C=CH₂), 5.48 (s, 1H, C=CH₂), 1.92 (s, 3H, CH₃-acrylate).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 166.61 (C(O)_{acrylate}), 161.44 (C₄), 150.29 (C₂), 139.54 (C=CH₂), 132.02 (C₆), 121.28 (C=CH₂), 112.84 (C₅), 18.91 (CH₃-acrylate).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₇H₉N₂O₄ 196.0717 , found 196.0718.

✓ ***N*1-methyl-5-bromouracil acetate (154)**



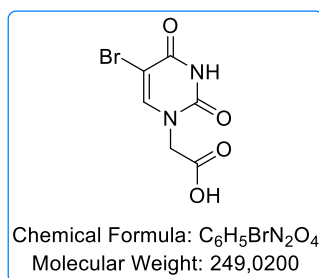
Following the general procedure F, with 5-bromouracil **153** (762 mg, 4 mmol, 1 eq.) as starting material the expected *N*1-methyl-5-bromouracil acetate **154** was obtained (347 mg, 33%) as a white powder after purification on flash column chromatography (eluting PE/AcOEt, 5/5).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.37 (bs, 1H, NH), 8.21 (s, 1H, H₆), 4.53 (s, 2H, CH₂-C(O)-O-CH₃), 3.70 (s, 3H, CH₂-C(O)-O-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 168.32 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 159.67 (C₄), 150.35 (C₂), 145.34 (C₆), 94.80 (C₅), 52.37 (CH₂-C(O)-O-CH₃), 48.57 (CH₂-C(O)-O-CH₃).

CAS : 149465-96-3

✓ ***N*1-acetid acid-5-bromouracil (155)**



Following the general procedure G, from *N*1-methyl-5-bromouracil acetate **154** (130 mg, 0.49 mmol, 1eq.) the expected compound **155** was obtained (117 mg, 95%) as a pink pale powder.

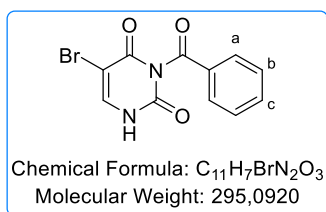
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.89 (bs, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, H₆), 4.41 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.22 (CH₂-C(O)-OH), 159.61 (C₄), 150.32 (C₂), 145.65 (C₆), 94.51 (C₅), 48.68 (CH₂-C(O)-OH).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₆H₆BrN₂O₄ 248.9505, found 248.9506.

CAS: 31385-63-4

✓ ***N*3-Benzoyl-5-bromouracil (160)**



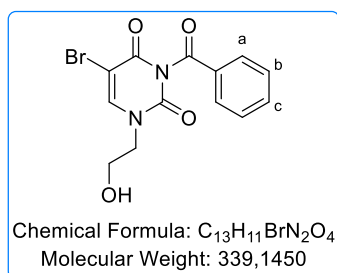
Following general procedure I: from 5-bromouracil **153** (1 g, 5.2 mmol, 1eq.) the expected *N*3-benzoyl-5-bromouracil **160** (550 mg, 36%) was obtained as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 12.02 (bs, 1H, **NH**), 8.18 (s, 1H, **H6**), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **Ha**), 7.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, **Hc**), 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, **Hb**).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6) δ 168.98 (**C=O_{bz}**), 158.87 (**C4**), 149.47 (**C2**), 143.32 (**C6**), 135.60 (**Cc**), 130.88 (**Cq_{bz}**), 130.46 (**Ca**), 129.48 (**Cb**), 93.86 (**C5**).

CAS: 206762-91-6

✓ ***N*1-(2-hydroxyethyl)-*N*3-benzoyl-5-bromouracil (161)**

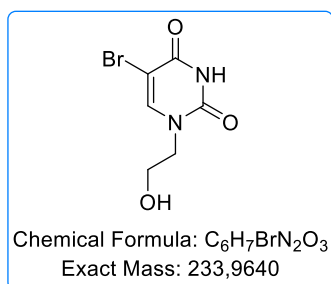


Following general procedure J: using of *N*3-benzoyl-5-bromouracil **160** (500 mg, 1.6 mmol, 1eq.) as starting material, the expected *N*1-(2-hydroxyethyl)-*N*3-benzoyl-5-bromouracil **161** was obtained (95 mg, 18%) after purification on flash chromatography using EP/AcOEt as eluant (1/1), as a white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.33 (s, 1H, **H6**), 7.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, **Ha**), 7.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, **Hc**), 7.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, **Hb**), 4.99 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH₂-CH₂-OH), 3.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 3.56 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH).

CAS: 2554978-66-2

✓ ***N*1-(2-hydroxyethyl)5-bromouracil (162)**



Following general procedure K, from *N1*-(2-hydroxyethyl)-*N3*-benzoylthymine **161** (86 mg, 0.26 mmol, 1eq.), the expected *N1*-(2-hydroxyethyl)-5-bromouracil was obtained (30 mg, 50%), as a white solid, after flash column chromatography using DCM/MeOH as eluant (100/0 to 96/4).

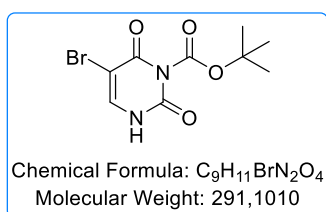
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.71 (bs, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, H₆), 4.90 (bs, 1H, CH₂-CH₂-OH), 3.73 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 3.56 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 159.79 (C₄), 150.37 (C₂), 146.20 (C₆), 93.83 (C₅), 58.32 (CH₂-CH₂-OH), 50.43 (CH₂-CH₂-OH).

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺calcd for C₆H₈BrN₂O₃ : 234.9713 found 234.9711.

CAS: 41575-25-1

✓ ***N3*-boc-5-bromouracil (164)**



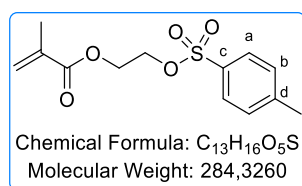
To a suspension of 5-bromouracil **153** (300 mg, 1.57 mmol, 1 eq.) in dry THF was added 4-dimethylaminopyridine (67 mg, 0.54 mmol, 0.35 eq.) and *di*-tert-butyl dicarbonate (1 g, 4.7 mmol, 3 eq.). After MW-irradiation for 5 min at 70 °C, the reaction mixture was concentrated under reduce pressure and the *N1-N3-bis*-boc-5-bromouracil **163** was used in the next step without further purification. The crude was diluted in 5 mL of DEM/EtOH (9/1) and SiO₂ was added (60%, w/w) . After MW-activation for 2 min at 70 °C, all volatiles were evaporated, and the crude was purified on on flash column chromatography, using EP/AcOEt (8/2) as eluant to afford the expected *N3*-boc-5-bromouracil **164** (142 mg, 31%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.13 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H₆), 1.60 (d, *J* = 1.7 Hz, 9H, H_{boc}).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 160.95 (C₄), 151.46 (C₂), 139.45 (C₆), 94.95 (C₅), 61.41 (C_q_{boc}), 29.27(CH₃-_{boc}).

CAS: 1838126-16-1

✓ **2-(tosyloxy)ethyl methacrylate (166)**



To a solution of 2-hydroxyethyl methacrylate **165** (1 mL, 8.2 mmol, 1 eq.) in dry DCM was added dry triethylamine (1.2 mL, 1eq.). Tosylate chloride was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred

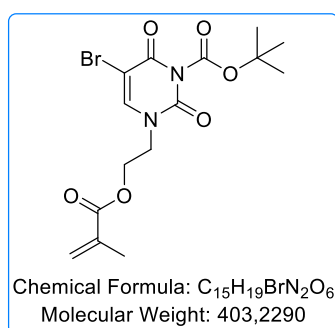
at room temperature for 16 h. All volatiles were evaporated under reduce pressure and the crude was purified on flash column chromatography, using EP/AcOEt (1/1) as eluant, to afford expected 2-(tosyloxy)ethyl methacrylate **166** (1.9 g 82%), as a colourless oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, **Ha**), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, **Hb**), 6.06 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$), 5.57 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$), 4.32 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, **CH₂**), 4.26 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, **CH₂**), 2.45 (s, 3H, **CH_{3-Ts}**), 1.95 (s, 3H, **CH_{3-acrylate}**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166.98 (**C=O_{acrylate}**), 145.16 (**Cd**), 135.72 (**C=CH₂**), 133.02 (**Cc**), 130.08 (**Hb**), 128.08 (**Ca**), 126.58 (**C=CH₂**), 67.76 (**CH₂**), 61.97 (**CH₂**), 21.78 (**CH_{3-Ts}**), 18.28 (**CH_{3-acrylate}**).

CAS: 16341-01-8

✓ ***N1*-[2-(méthacryloyloxy)éthyl]-*N3*-boc-5-bromouracil (167)**



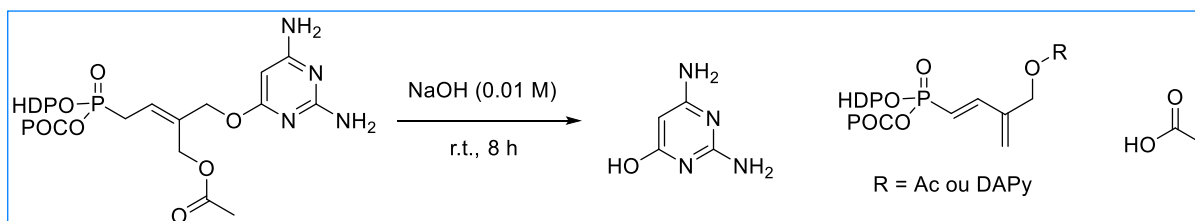
A solution of *N3*-Boc-5-bromouracil **164** (132 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) in DMF was cooled to 0 °C and sodium hydride (60% w,w, 20 mg, 0.45 mmol, 1.eq) was added carefully. The mixture was stirred at room temperature for 10 min. after, the mixture was cooled to 0 °C and 2-(tosyloxy)ethyl methacrylate **166** (162 mg, 0.57 mmol, 1.3 eq.) was added dropwise. The mixture is brought to room temperature and then heated to 80 °C for 16 h. Then, all volatiles were evaporated under reduce pressure and crude was purified on flash column chromatography, using EP/AcOEt (1/1) as eluant, to give desired *N1*-(2-hydroxyethyl)methacrylate-*N3*-boc-5-bromouracil **167** (80 mg, 44%), as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (s, 1H, **H6**), 6.11 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$), 5.63 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$), 4.37 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, **CH₂-CH₂-O**), 3.98 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, **CH₂-CH₂-O**), 1.95 (d, $J = 1.9$ Hz, 3H, **CH₃**), 1.70 (s, 9H, **H_{Boc}**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166.93 (**C=O_{boc}**), 161.02 (**C3**), 151.32 (**C2**), 141.22 (**C6**), 135.75 (**C=CH₂**), 126.78 (**C=CH₂**), 97.00 (**C4**), 64.19 (**Cq_{boc}**), 62.20 (**CH₂-CH₂-O**), 48.99 (**CH₂-CH₂-O**), 29.79 (**CH_{3-boc}**), 18.43 (**CH₃**).

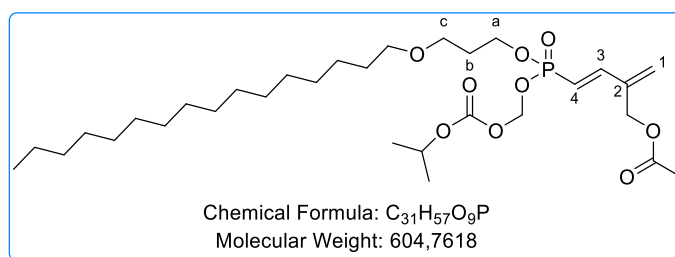
2. Degradation of LAVR-289 in basic conditions

Degradation procedure :



To a solution of LAVR-289 (14.4 mg, 0.02 mmol) in DMSO, was added a solution of NaOH (0.01 M) and the mixture was stirred for 8h. The solution was neutralised with HCl (0.01 M) and extracted 3 times with ethyl acetate. The organic layers were combined and dried over MgSO₄ and concentrated under vacuo. The mixture was diluted in MeOH and analysed by UV-HPLC, and several compounds was recovered.

✓ (E)-4-((3-(hexadecyloxy)propoxy)((isopropoxycarbonyl)oxy)methoxy)phosphoryl)-2-methylenebut-3-en-1-yl acetate (**21**)



Following degradation procedure, the compound **21** was obtained (< 3 mg).

¹H NMR (700 MHz, Acetone) : δ 7.14 (dd, *J* = 23.5, 17.7 Hz, 1H, **H4**), 5.98 (t, *J* = 17.8 Hz, 1H, **H3**), 5.74 – 5.59 (m, 4H, O-CH₂-O & **H1**), 4.90 (hept, *J* = 7 Hz, 1H, **CH**(CH₃)₂), 4.82 (s, 2H, **CH**₂-OAc), 4.14 (m, 2H, **Ha**), 3.51 (t, *J* = 7 Hz, 2H, **Hc**), 3.41 (t, *J* = 7 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 2.08 (s, 3H, O-(C=O)-**CH3**), 1.92 (quint, *J* = 7 Hz, 2H, **Hb**), 1.55 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H, O-CH₂**CH**₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.40 – 1.30 (m, 26H, O-CH₂CH₂(**CH**₂)₁₃CH₃; 6H, **CH**(**CH**₃)₂), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃**CH**₃).

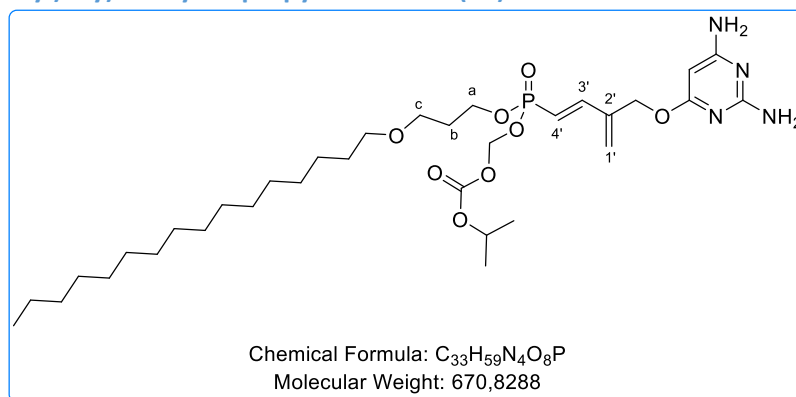
¹³C NMR (176 MHz, Acetone) δ : 170.56, (O-(C=O)-CH₃), 154.07 ((C=O)_{POC}), 148.00 (d, *J* = 6 Hz, **C4**), 141.10 (d, *J* = 24.1 Hz, **C2**), 125.14 (**C1**), 115.75 (d, *J* = 190.6 Hz, **C3**) 85.13 (d, *J* = 5.0 Hz, O-CH₂-O), 73.45 ((CH₃)₂-**CH**), 71.49 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 67.11 (**Cc**), 63.93 (d, *J* = 5.7 Hz, **Ca**), 63.29 (**CH**₂-OAc), 32.64 (**CH**₂), 31.58 (d, *J* = 6.2 Hz, **Cb**), 30.54, (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 29.12 (under acetone peak, (**CH**₂)₁₁), 26.96 (**CH**₂), 23.33 (**CH**₂), 21.81((**CH**₃)₂-CH), 20.71 (O-(C=O)-**CH**₃), 14.35 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃**CH**₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 17.98.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺calcd for C₃₁H₅₈O₉P 605.3813, found 605.3816.

HPLC : Column Kromasil® (250 x 4,6 mm, 5 μm), D = 1.5 mL/, T = 40 °C , mobile phase MeOH/H₂O (9/1, v/v), tr = 27 min

✓ (E)-(((3-(((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)methyl)buta-1,3-dien-1-yl)(3-(hexadecyloxy)propoxy)phosphoryl)oxy)methyl isopropyl carbonate (34)



Following **degradation procedure**, the compound **34** was obtained (< 2 mg).

¹H NMR (700 MHz, Acetone) δ 7.14 (dd, *J* = 23.6, 17.7 Hz, 1H, **H4'**), 5.93 (t, *J* = 17.8 Hz, 1H, **H3'**), 5.68-5.63 (4H, O-CH₂-O & **H1'**), 5.45 (bs, **NH₂**), 5.43 (bs, **NH₂**), 5.28 (s, 1H, **H5**), 4.90 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H, **CH(CH₃)₂**), 4.33 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, **CH₂-O-DAPy**), 4.13 (m, 2H, **Ha**), 3.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **Hc**), 3.43 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.91 (quint, *J* = 5.7 Hz, 2H, **Hb**), 1.54 (quint, *J* = 5.7 Hz, 2H, O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.42-1.19 (m, 26 H, O-CH₂CH₂(**CH₂**)₁₃CH₃); 6H, **CH(CH₃)₂**), 0.90 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

¹³C NMR (176 MHz, Acetone) δ 153.16 ((C=O)_{POC}), 147.93 (d, *J* = 5.6 Hz, **C4'**), 121.22 (**C1'**), 114.39 (d, *J* = 191.1 Hz, **C3'**), 84.18 (d, *J* = 5.2 Hz, O-CH₂-O), 77.06 (**C5**), 72.38 ((CH₃)₂-CH), (70.57 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 66.22 (**Cc**), 62.88 (d, *J* = 5.9 Hz, **Ca**), 60.84 (**CH₂-O-DAPy**), 31.59 (**CH₂**), 30.69 (d, *J* = 6.2 Hz, **Cb**), 29.63 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 28.95 (under acetone peak, (**CH₂**)₁₁), 26.06 (**CH₂**), 22.11 (**CH₂**), 20.91 (((CH₃)₂-CH), 13.35 (O-CH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 18.21 (s).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺calcd for C₃₃H₅₉N₄O₈P 671.4143, found 671.4150.

HPLC : Column Kromasil® (250 x 4,6 mm, 5 μm), D = 1.5 mL/, T = 40 °C , mobile phase MeOH/H₂O (9/1, v/v), tr = 15 min

3. Synthesis of imprinted polymer by precipitation polymerization

✓ General procedure in ACN/H₂O (9/1, v/v) mixture :

To a suspension of tenofovir (1 eq.) in water (10% of total volume) was added 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate or allyl amine (1 eq.) and the mixture was stirred until total solubilisation. Then acetonitrile (90% of total volume) and functional monomers were added in the mixture. The pre-complex of polymerisation was stirred at room temperature for 4-6 h. Then, the crosslinker and the initiator were introduced and immediately degassed for 15 min under argon atmosphere to remove dissolved oxygen. After, the round bottom flask was sealed, and the polymerization takes place in oil bath heated to the initiator activation temperature for 16 h. The resulting precipitated were recovered by centrifugation. Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner, but with the omission of Tenofovir.

✓ General procedure in ACN or H₂O mixture :

To a suspension of dummy-template of tenofovir (1 eq.) in solvent (1-2%/monomers), was added functional monomers. The pre-complex of polymerisation was stirred at room temperature for 4-6 h. Then, the crosslinker and the initiator (10% mol/monomers) were introduced and immediately degassed for 15 min under argon atmosphere to remove dissolved oxygen. After, the round bottom flask was sealed, and the polymerization takes place in oil bath heated to the initiator activation temperature for 16 h. The resulting precipitated were recovered by centrifugation. Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner, but with the omission of a template species.

4. Synthesis of PDA nanoparticles

Following the procedure²⁸⁶, ammonia aqueous solution (NH₄OH, 1,5 mL, 28-30%), was mixed with ethanol (40 mL) and deionized water (100 mL) under mild stirring at room temperature for 30 min. Dopamine hydrochloride (0.5 g) was added in the mixture. The colour of this solution immediately turned to pale brown and gradually changed to dark brown. The reaction was allowed to proceed for 30h. The solution was dialyzed for 3 days (cut off ~ 1000 kDa) and the mixture was lyophilized to obtain PDA nanoparticles as a dark powder.

For synthesis of L-PDA or poly(*N*-méthacrylamide)dopamine the same protocol is used but replacing dopamine with Levodopa or *N*-(méthacrylamide)dopamine, respectively.

5. Surface derivatization of polydopamine

➤ With *N1*-acetic acid-uracil derivatives

In a solution of *N1*-acetic acid-thymine or *N1*-acetic acid-uracil (1 eq.) and DCC (1.2 eq.) in DMSO was added at 0 °C, *N*-hydroxysuccinimide (1,2 eq.) and the mixture were stirred at 6 h at 25 °C. Few microliters are sampled for HPLC analysis.

Then, the mixture was added in a suspension of PDA in water. Nanoparticle concentration is 10 mg/mL in the H₂O/DMSO (4/1, v/v). The suspension was stirred overnight at 25 °C. Derived nanoparticles are obtained by centrifugation and washed two time with MeOH/H₂O (9/1, v/v) mixture to removed unreacted products. The amount of grafted thymine or uracil moieties is determined by HPLC analysis.

➤ With 5-bromouracil

To a suspension 5-bromouracil (10 mg, 52.6 μmol , 1eq.) in dry acetonitrile, BSA (32 μL , 0.132 mmol, 2.5 eq.) was added, and the mixture was stirred until the solubilisation (10 min). Then, the mixture was added in a suspension of PDA in ACN. Nanoparticle concentration is 10 mg/mL. The suspension was stirred overnight at 25 °C. Derived nanoparticles are obtained by centrifugation and washed two time with MeOH/H₂O (9/1, v/v) mixture to removed unreacted products. The amount of grafted 5-bromouracil is determined by HPLC analysis.

6. Core-shell synthesis

To a suspension of tenofovir (10 mg, 34,8 μmol , 1 eq.) in water (1 mL) was added 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (6 μL , 34,8 μmol eq.) and the mixture was stirred until total solubilisation. Then, acetonitrile (9 mL) was added to obtain a tenofovir concentration of 1 mg/mL. the appropriate volume was added to the PDA, an ACN/H₂O (9/1) solution is added to obtain the desired PDA concentration. Then, the suspension is stirred at room temperature for 4-6h to form the pre-polymerization complex. Then, the 3-(acryloyloxy)-2-hydroxypropyl méthacrylate was added and the initiator were introduced and immediately degassed for 15 min under argon atmosphere to remove dissolved oxygen. After, the round bottom flask was sealed, and the polymerization takes place in oil bath heated to the initiator activation temperature for 16 h. The resulting precipitated were recovered by centrifugation. Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner, but with the omission of Tenofovir.

7. Extraction and quantification of tenofovir or dummy-template

Extraction of tenofovir was performed by consecutive ultrasound washings, using a mixture of MeOH and acetic acid (9/1, v/v) for 1 h at 50 °C. The washing solution is replaced every hour by a fresh one. The recovered Tenofovir was quantified with an HPLC system (mobile phase H₂O (0,1% H₃PO₄ and 0,1% NH₄OH)/MeOH, 95/5, v/v) in order to follow the extraction and to know how much Tenofovir remained trapped in the polymer. Then, polymers were washed with MeOH/H₂O (9/1, v/v,) to removed residual acetic acid.

For the dummy template, the process is the same except that water is used instead of acetic acid.

Non-imprinted polymers were washed in the same manner.

8. Rebinding of tenofovir

Batch adsorption experiments were used to estimate the binding capacity of the imprinted polymer. In an Eppendorf, 2-10 mg of MIP and NIP particles were thoroughly mixed with 1 mL of Tenofovir solution in a mixture of ACN/H₂O (1/1, v/v) at different concentrations and then thermostated at 25 °C during 16 h under continuous shaking (500 RPM). After binding process was completed, Eppendorf were centrifuged for 10 min at 10 000 RPM and the clear supernatant was withdrawn. The free concentration of Tenofovir after rebinding was determined by HPLC-UV method described in part 2, Three replicate extractions and measurement were performed for each concentration.

9. Kinetic study of tenofovir release

The kinetic study of Tenofovir release from polymers were conducted as described: 10 mg of load polymer particles were added in dialysis bag (Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2, MW cut off 3.5-5 kDa, 1 mL) with 1 mL of PBS buffer (pH 7.4). The dialysis system was suspended in a release volume of 6 mL PBS buffer (pH 7.4) at 25 °C and 37 °C. At scheduled intervals, 50 µL of the release medium was collected for HPLC assay. The same volume of fresh PBS buffer at the same temperature was added immediately to maintain a constant release volume.

10. Préparation of pH solutions

10.1. Stock solution

- ✓ Solution 1: Acetic acid (1M)

28.8 mL of acetic acid are diluted on water in 50 mL flask.

- ✓ Solution 2: Phosphoric acid (1 M)

33.7 mL of phosphoric acid are diluted on water in 500 mL flask.

- ✓ Solution 3: Boric acid (0.1 M)

3.09 mg of boric acid are dissolved on water in 500 mL flask.

- ✓ Britton-Robinson buffer

6.25 mL of solution 2 and solution 1 and 67.5 mL of solution 3 are diluted in 500 mL flask.

- ✓ Sodium hydroxide solution (0.1 M)

4g of NaOH are dissolved on water in 100 mL flask and 100 µL of this solution was diluted in 100 mL of water in a flask.

10.2. Solution at different pH values

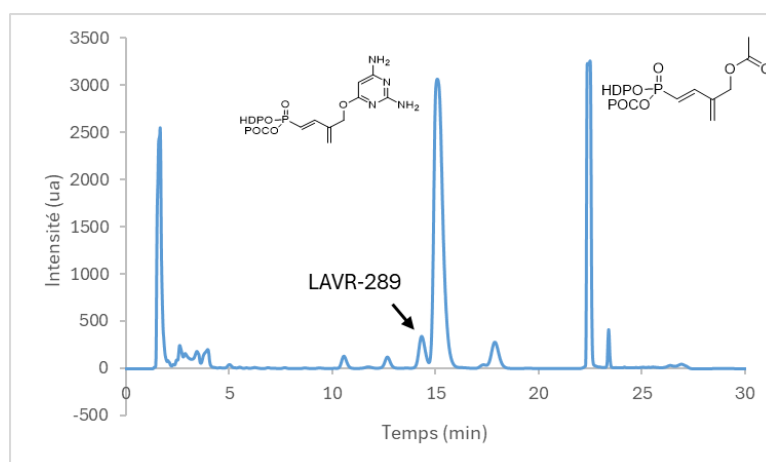
In 20 mL flask, a x mL of sodium hydroxide solution is added and completed with Britton-Robinson buffer. pH of each solution is measured with a pH-meter. Details of the preparation are given in the table below.

Tableau 56 : preparation of different pH solutions

Solutions	V _{NaOH} (mL)	V _{buffer} (mL)	pH
1	0	20	2.34
2	2	18	3.01
3	3	17	4.03
4	4	16	4.83
5	5	15	5.56
6	6	14	6.71
7	7	13	7.36
8	8	12	8.40
9	9	11	9.22
10	10	10	10.21

Annexes

Annexe 1 : Chromatogramme de surcharge de la dégradation du LAVR-289 en milieu basique



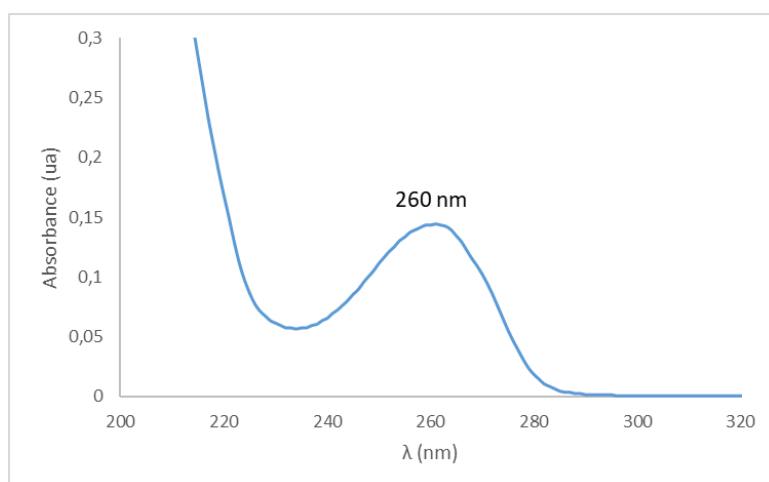
Condition d'analyse : Colonne Kromasil® (250 x 4,6 mm, 5 µm), D = 1,5 mL/min, T = 40 °C, phase mobile : H₂O/MeOH (10/90, v/v).

Annexe 2 : Résultats des analyses pour la détermination du Log P

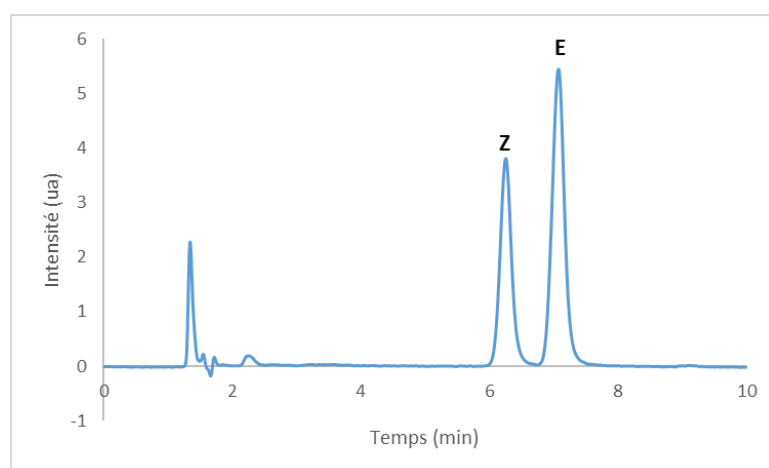
Composés	CAS	Tr _{moyenne} (min)	k	Log k	Log P ³⁰⁵
Uracile	66-22-8	0,44			
Paracétamol	103-90-2	0,47	0,06	-1,25	0,5
Lutéoline	491-70-3	0,50	0,12	-0,93	1,4
Ténofovir Disoproxil	201341-05-1	0,53	0,19	-0,72	1,6
Adéfovir dipivoxil	142340-99-6	0,57	0,28	-0,55	1,8
Phénol	108-95-2	0,60	0,34	-0,46	1,5
Estrone	53-16-7	0,81	0,84	-0,08	3,1
8-Hydroxyjulolidine	41175-50-2	0,88	0,98	-0,01	2,5
Noscapine	128-62-1	1,10	1,48	0,17	2,7
Toluène	108-88-3	1,24	1,79	0,25	2,7
Progestérone	57-83-0	1,52	2,44	0,39	3,9
Chrysophanol	481-74-3	2,21	3,98	0,60	3,5
Anthracène	120-12-7	2,61	4,89	0,69	4,4
4-octylphénol	1806-26-4	3,49	6,85	0,84	5,3
Butylhydroxytoluène	128-37-0	4,25	8,59	0,93	4
4-nonylphénol	104-40-5	5,03	10,34	1,01	5,9
Hexylbenzène	1077-16-3	5,93	12,37	1,09	5,5
Heptylbenzène	1078-71-3	8,77	18,77	1,27	6,1
Octylbenzène	2189-60-8	13,07	28,48	1,45	6,6
Nonylbenzène	1081-77-2	19,80	43,66	1,64	7,1
Decylbenzène	104-72-3	30,23	67,20	1,83	7,7
Stigmastérol	83-48-7	33,17	73,83	1,87	8,6
Undécylbenzène	6742-54-7	46,20	103,21	2,01	8,2
Dodécylbenzène	123-01-3	70,20	157,34	2,20	8,8
Cholestérol	57-88-5	86,88	194,97	2,29	8,7

³⁰⁵ PubChem®. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 2022-09-12).

Annexe 3 : Spectre UV du ténofovir à une concentration de $1,01 \times 10^{-5}$ M dans l'eau

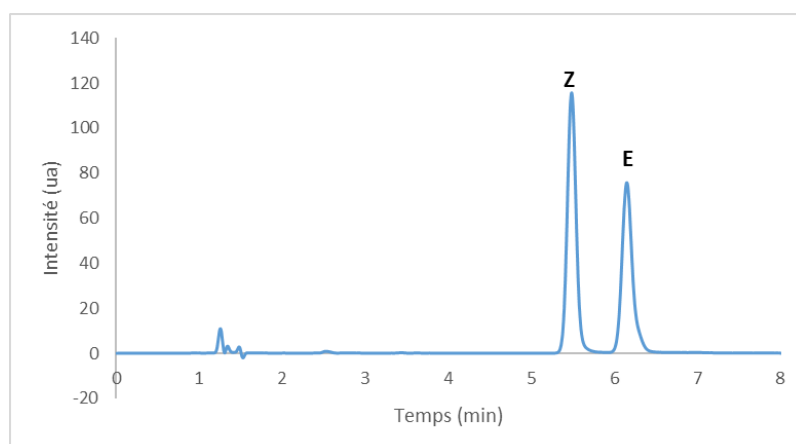


Annexe 4 : Séparation HPLC-UV Z et E du bis(Me)-LAVR 91 à 267 nm



Condition d'analyse : Colonne Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μ m) D = 0,3 mL/min, T = 40 °C, phase mobile : H₂O/ACN (85/15, v/v).

Annexe 5 : Séparation HPLC-UV Z et E du bis(Et)-LAVR 92 à 267 nm



Condition d'analyse : Colonne Bonus RP (2,1 x 150 mm, 2,7 μ m) D = 0,3 mL/min, T = 40 °C, phase mobile : H₂O/ACN (80/20, v/v).

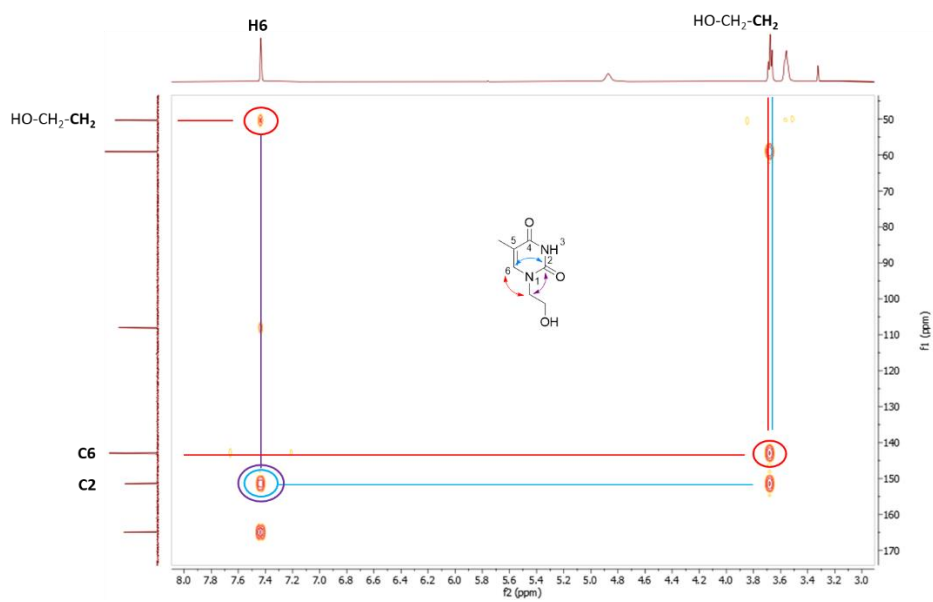
Annexe 6 : Résultats des analyses HPLC-UV des 3 gammes de ténofovir

C _{Tenofovir} [®] (mM)	Aire J1-matin	Aire J1-après midi	Aire J2
2,00	728,70	730,10	731,10
	729,20	729,60	730,60
	728,50	728,80	729,30
1,00	363,30	364,10	364,80
	364,80	363,90	364,30
	363,80	363,40	363,90
0,5	181,10	182,10	182,30
	180,70	181,50	182,20
	182,30	181,20	181,40
0,1	35,90	36,40	36,70
	36,10	36,20	36,40
	36,10	35,90	35,70
0,0698	25,50	25,80	25,70
	25,10	25,50	25,60
	25,80	25,40	25,20
0,04	14,50	14,70	14,70
	14,40	14,50	14,60
	14,60	14,50	14,30
0,01	3,65	3,66	3,65
	3,68	3,64	3,61
	3,71	3,57	3,59
0,007	2,58	2,55	2,55
	2,48	2,54	2,51
	2,57	2,44	2,48
0,004	1,42	1,48	1,49
	1,47	1,42	1,44
	1,42	1,42	1,43

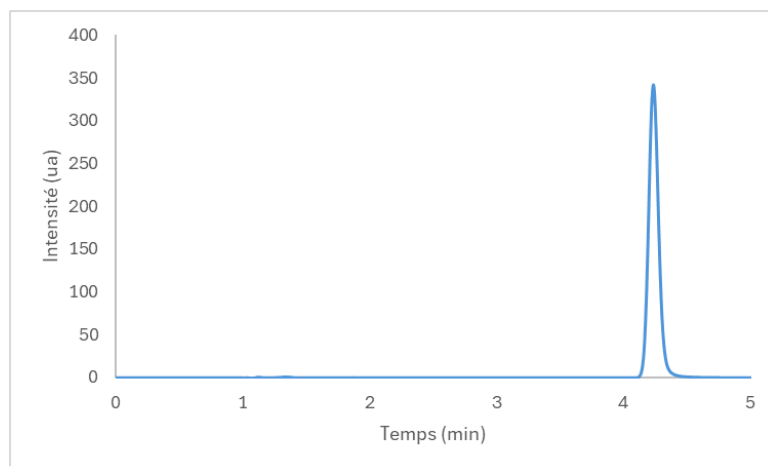
Annexe 7 : Résultats des analyses HPLC-UV des 4 points de validations

C _{Tenofovir} [®] (mM)	VAL 1	VAL 2	VAL 3
0,06	21,8	21,1	20,8
	21,7	21,7	21,5
	22,4	20,9	21,6
0,18	63,8	64,1	64,8
	64,7	63,7	63,7
	65,2	64,9	64,6
0,42	154,5	155,2	152,1
	152,5	155,9	153,3
	153,9	156,1	151,9
1,26	461,8	463,6	468,5
	461,1	466,3	465,3
	462,6	464,5	467,5

Annexe 8 : Spectre HMBC du *N*1-(2-hydroxyéthyl)thymine 118

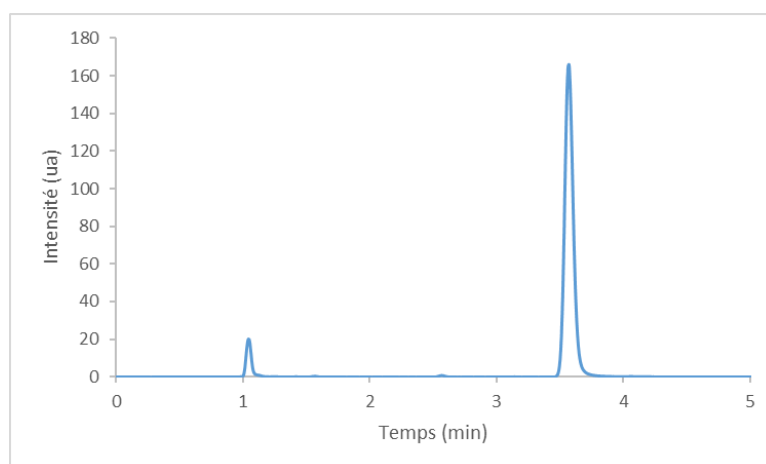


Annexe 9 : Chromatogramme du *bis*(POC)Ténofovir 86 (260 nm)



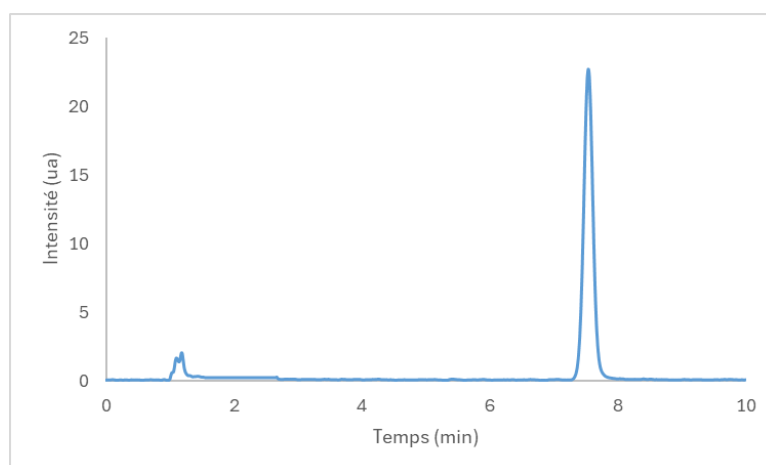
Condition d'analyse : Colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μ m) D = 0,8 mL/min, T = 35 $^{\circ}$ C, phase mobile : H₂O/MeOH (45,55 v/v).

Annexe 10 : Chromatogramme du *bis*(Et)Ténofovir 127 (260 nm)



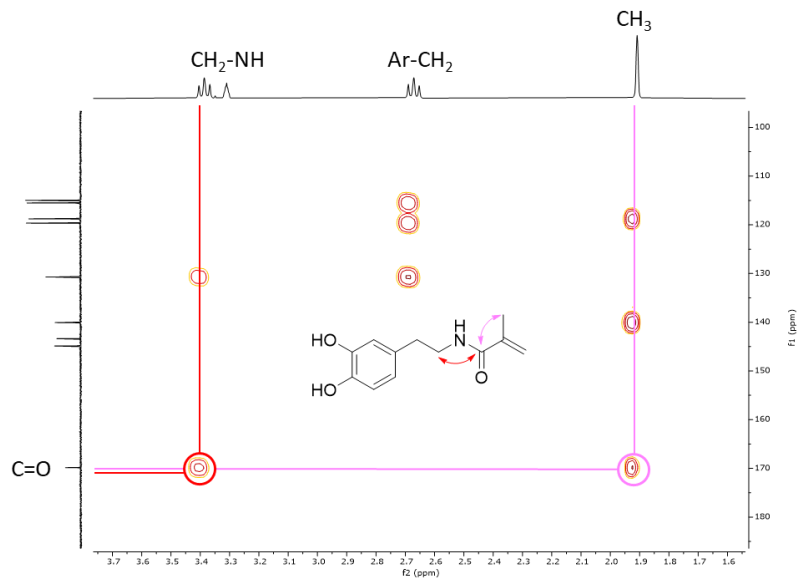
Condition d'analyse : Colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μ m) D = 0,8 mL/min, T = 35 °C, phase mobile : H₂O/MeOH (70,30 v/v).

Annexe 11 : Chromatogramme du *bis*(Me)Ténofovir 126 (260 nm)

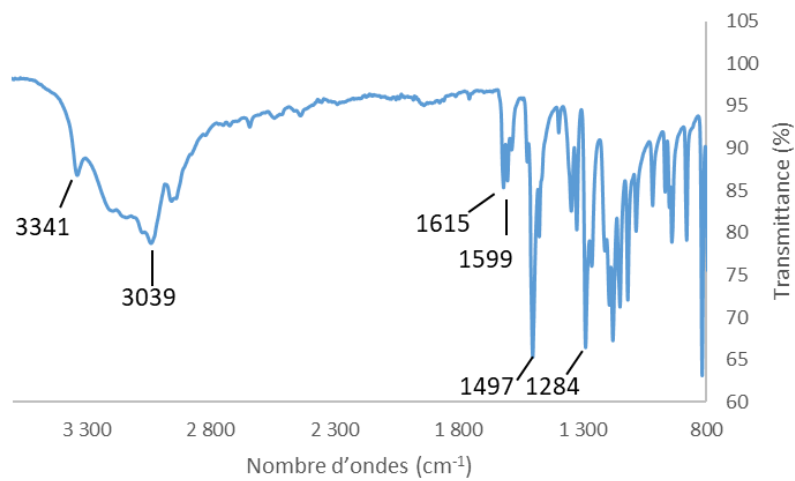


Condition d'analyse : Colonne Eclipse plus C18 (4,6 x 75 mm, 1,8 μ m) D = 0,8 mL/min, T = 35 °C, phase mobile : H₂O/MeOH (80,20 v/v).

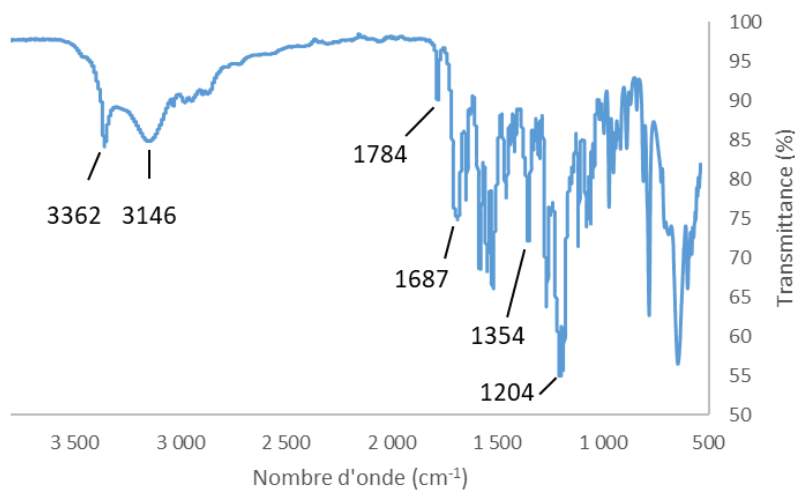
Annexe 12 : Spectre HMBC de la *N*-méthacrylamide dopamine 131



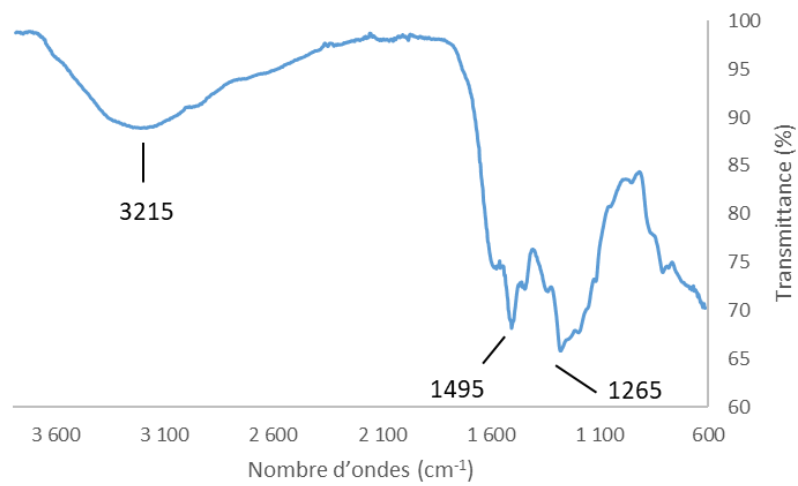
Annexe 13 : Spectre infrarouge de la dopamine hydrochloride 128



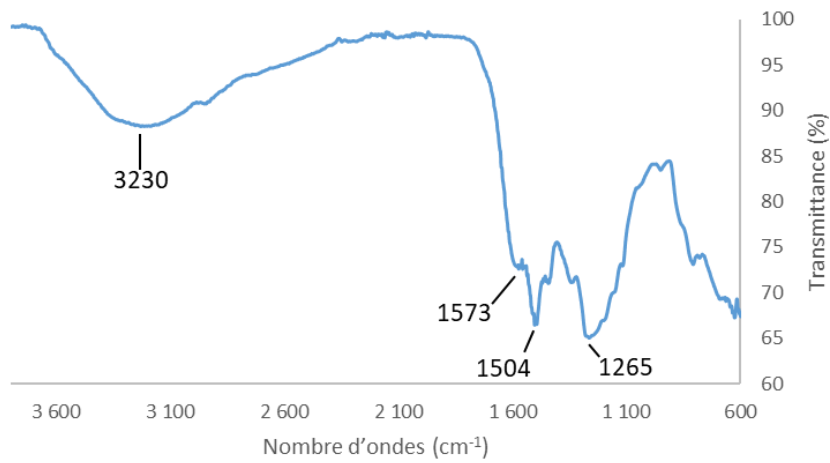
Annexe 14 : Spectre infrarouge de la *N*-méthacrylamide dopamine 131



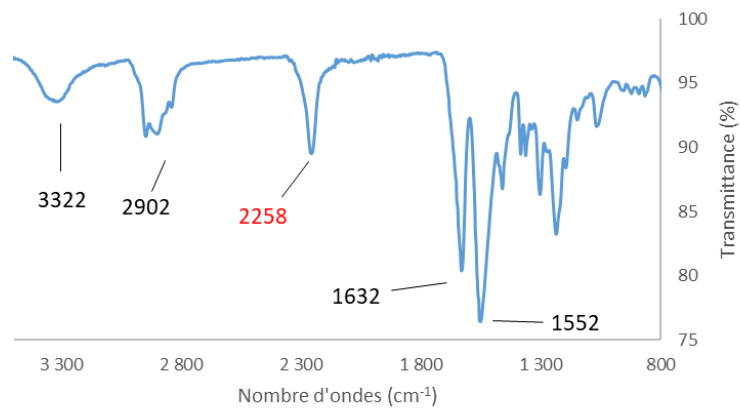
Annexe 15 : Spectre infrarouge de la polydopamine



Annexe 16 : Spectre infrarouge du copolymère de dopamine



Annexe 17 : Spectre infrarouge de la polyurée



Articles et communications

Publications :

Mathieu, T.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A. Molecularly Imprinted Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery System for Tenofovir, an Acyclic Nucleoside Phosphonate Antiviral. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 965.

Brouillard, M.; Mathieu, T.; Guillot, S.; Méducin, F.; Roy, V.; Marcheteau, E.; Gallardo, F.; Caire-Maurisier, F.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A. Innovative Lyotropic Liquid Crystalline Nanoemulsions of LAVR-289, a Highly Lipophilic Antiviral: Internal Mesophase Impact on its Biological Activity. *Int. J. Pharm.* **2024**, 124683.

Communications :

- Orales

Mathieu, T.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A. Development of core-shell imprinted nano-carriers based on polydopamine core for controlled release of Tenofovir®. American Chemical Society 2023, March 26-30, **2023** – Indianapolis (USA).

- Posters

Brouillard, M.; Mathieu, T.; Favetta, P.; Guillot, S.; Méducin, F.; Marcheteau, E.; Gallardo, F.; Agrofoglio, L. A. Exploration of nanoemulsion as drug delivery system of LAVR-289, a lipophilic acyclic nucleoside phosphonate prodrug. American Chemical Society 2023, March 17-21, **2024** – New Orleans (USA).

Mathieu, T.; Favetta, P.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Analytical methods development for the measurement of physico-chemical parameters of a new antiviral in pre-clinical stage. American Chemical Society 2023, March 26-30, **2023** – Indianapolis (USA).

Agrofoglio, L.A.; Mathieu, T.; Favetta P. Analytical methods development for the measurement of physico-chemical parameters of a new antiviral in pre-clinical phase. 36th International Conference on Antiviral Research (ICAR2023), March 13-17, **2023** – Lyon (France).

Abuduaini, T.; Solmont, K.; Bessières, M.; Mathieu, T.; Favetta, P.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Gallardo, F.; Roy, V.; Agrofoglio, L.A. Design, synthesis and biological evaluation of LAVR-289, a new broad-spectrum antiviral ANP. 35th International Conference on Antiviral Research (ICAR2023), March 21-25, **2022** – Seattle, (USA).

Mathieu, T.; Favetta, P.; El Koulali, Y.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Détermination de paramètres physico-chimiques et stabilités d'un nouvel antiviral à large spectre dans un cadre d'étude pré-clinique. 33^e Colloque Biotechnocentre, October 7-8, **2021** – Chaumont-sur-Tharonne (France).

- Vulgarisations

Mathieu, T. *Encapsulez-Tous* [podcast]. Radio campus Orléans, 18 juillet, **2023**, 7 min 08.

Thomas MATHIEU

Etude de deux ANPs Antiviraux : Caractéristiques physico-chimiques du LAVR-289 et formulations innovantes du Ténofovir

Ce rapport de thèse s'inscrit dans une des étapes du développement préclinique d'un médicament candidat, qui consiste en la détermination de diverses caractéristiques physico-chimiques du composé et en l'exploration de sa formulation. La molécule en phase préclinique est le LAVR-289, un nouvel antiviral à large spectre, appartenant à la famille des acyclonucléosides phosphonates, développée sous forme de prodrogue.

Nous avons, dans un premier temps, déterminé différents paramètres du LAVR-289 tels que le pKa, le Log P ou la concentration d'agrégation critique par spectrophotométrie UV-visible, chromatographie liquide à polarité de phases inversées et spectrofluorimétrie, respectivement. Nous avons également développé une méthode de suivi analytique par HPLC-UV afin de déterminer la pureté des lots de synthèse du LAVR-289. Grâce à cette méthode analytique, les stabilités chimiques aux solvants et aux pH ainsi que la stabilité enzymatique plasmatique de cette molécule ont été déterminées. Des analyses en LC-HR-MS ont permis d'obtenir la structure de produits de dégradation ainsi que certains métabolites.

Dans un deuxième temps, nous avons synthétisé de nouveaux cargos polymériques basés sur la technologie des empreintes moléculaires afin de libérer de façon contrôlée des acyclonucléosides phosphonates. Cette étude exploratoire a été menée sur le Ténofovir, un antiviral utilisé dans le traitement des infections au VIH et VHB. Ces nanomatériaux ont été développés par polymérisation par précipitation ou par création de systèmes cœur-coquille après dérivation de surface de nanoparticules, biodégradables et biocompatibles, synthétisées au laboratoire. Ces polymères ont été créés à partir de monomères issus de la fonctionnalisation de bases pyrimidiques. Ces matériaux ont montré une cinétique de relargage du Ténofovir plus lente que la forme non imprimée dépendante de la température.

Mots clés : Développement analytique, Polymères à empreintes Moléculaires, Acyclonucléoside phosphonate, Nouvel antiviral à large spectre, Libération contrôlée, Paramètres physico-chimiques.

Study of two Antiviral ANPs: Physico-chemical characteristics of LAVR-289 and innovative formulation of Tenofovir

This thesis is part of one of the stages in the preclinical development of a drug candidate, which consists in determining various physico-chemical characteristics of the compound and exploring its formulation. The molecule in preclinical phase is LAVR-289, a novel broad-spectrum antiviral belonging to the acyclonucleoside phosphonate family, developed in prodrug form.

We began by determining various parameters of LAVR-289 such as pKa, Log P and critical aggregation concentration by UV-visible spectrophotometry, reversed phase liquid chromatography and spectrofluorimetry, respectively. We also developed a HPLC-UV analytical method to determine the purity of LAVR-289 synthesis batches. This analytical method was used to determine the chemical stability of this molecule with respect to solvents and pH, as well as its plasma enzymatic stability. LC-HR-MS analyses were used to obtain the structure of degradation products and some metabolites.

In the second part, we have synthesised new polymeric nanocarriers based on molecular imprinting technology for the controlled release of acyclic nucleoside phosphonates. This exploratory study was carried out on Tenofovir, an antiviral used in the treatment of HIV and HBV infections. These nanomaterials were developed by precipitation polymerisation or by creating core-shell systems after surface derivatisation of biodegradable and biocompatible nanoparticles synthesised in the laboratory. These polymers were created from monomers derived from the functionalisation of pyrimidine bases. These materials showed slower temperature-dependent release kinetics of Tenofovir than the no imprinted form.

Keywords : Analytical development, Molecularly Imprinted Polymers, Acyclic Nucleoside Phosphonate, New broad-spectrum antiviral, Controlled release, Physicochemical parameters



ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 – UFR Sciences – BP 6759 – rue de
Chartres
45067 Orléans cedex 2

