



HAL
open science

Conception, synthèse et formulation de nanoémulsions de nucléolipides pour les maladies neurodégénératives

Mathias Brouillard

► **To cite this version:**

Mathias Brouillard. Conception, synthèse et formulation de nanoémulsions de nucléolipides pour les maladies neurodégénératives. Autre. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0278 . tel-04769809

HAL Id: tel-04769809

<https://theses.hal.science/tel-04769809v1>

Submitted on 6 Nov 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ET TECHNOLOGIES POUR LE VIVANT

Par Mathias BROUILLARD

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET FORMULATION DE
NANOEMULSIONS DE NUCLEOLIPIDES POUR LES MALADIES
NEURODEGENERATIVES**

Sous la co-direction du : Pr. Sylvie CRAUSTE-MANCIET (PU-PH)
et du Dr. Valérie DESVERGNES (CR CNRS)

Soutenue le 25 Octobre 2022

Membres du jury :

Pr. GUILLON, Jean
Pr. MARCHAND, Pascal
Dr. ROY, Vincent
Pr. CHARRUEAU, Christine
Dr. CHIERICI, Sabine
Dr. DEHAY, Benjamin
Pr. CRAUSTE-MANCIET Sylvie
Dr. DESVERGNES Valérie

Professeur, Université de Bordeaux
Professeur, Université de Nantes
MCF, Université d'Orléans
Professeur, Université de Paris Cité
MCF, Université de Grenoble Alpes
Chargé de recherche à l'Inserm
PU-PH, CHU, Université de Bordeaux
Chargée de recherche, CNRS

Président de jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Directrice de thèse
Directrice de thèse

CHEMBIOPHARM

ARNA

Ce travail a été effectué sous la direction du Pr. Sylvie Crauste-Manciet et du Dr. Valérie Desvergnès, au sein de l'équipe ChemBioPharm, unité ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux.

Ces travaux ont été rendus possible par le financement ministériel de l'école doctorale ED40 Sciences Chimiques de Bordeaux.

Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.

- Rabelais

You lose, you learn.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Pascal Marchand et le Docteur Vincent Roy pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse et au Professeur Christine Charrueau, au Docteur Sabine Chierici et au Professeur Jean Guillon pour avoir accepté de prendre part à ce jury en qualité d'examineurs. Merci au Docteur Benjamin Dehay pour avoir accepté mon invitation à participer à ce jury en qualité de membre invité et pour avoir pris part à ce projet de recherche en apportant son expertise biologique.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Valérie Desvergnès pour m'avoir soutenu tout au long de ces trois années de thèse, pour l'énergie et l'implication sans faille dont elle a fait preuve pour me guider. Dès la préparation pour l'audition de l'école doctorale, tu as cru en mes capacités. Je garde en tête ce coup de téléphone que tu m'as passé pour m'annoncer que j'avais décroché la bourse. Merci pour ta confiance, tes conseils et pour ta bienveillance. Travailler avec toi a été un immense plaisir. Je remercie profondément le Professeur Sylvie Crauste-Manciet pour son enseignement, son soutien et pour m'avoir donné une vision plus étendue des sciences. Merci à vous deux pour votre passion de transmettre le savoir, votre écoute, toutes vos qualités aussi bien scientifiques qu'humaines et bien évidemment pour vos expressions si particulières.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Sabine Chierici pour l'accueil qu'elle m'a réservé durant les deux semaines que j'ai passé dans son laboratoire à Grenoble. Merci pour ta disponibilité, ta patience et ton implication à me faire découvrir aussi bien les peptides que la ville. Le temps passé à tes côtés m'a été d'une grande richesse.

Un merci tout particulier au Professeur Jean Guillon pour m'avoir hébergé dans ses locaux le temps d'expérimentations HPLC. Merci au Docteur Sandra Rubio pour m'avoir aidé à dompter ses appareils. J'associe à ces remerciements le Docteur Anis Alouini et Solène Savrimoutou pour leur bonne humeur et leur humour.

Je remercie également Gabriel Coulombe et Marie Joyeux pour leur intérêt et leur volonté sans réserve d'aider à développer ce projet. Votre contribution et vos qualités personnelles ont apporté une énergie nouvelle à la vie du laboratoire. J'ai une pensée pour les stagiaires Charline et Reihana avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler mais qui ont su apporter leur bonne humeur quotidienne.

Merci à mes voisins de bureau : Guillaume, Arthur et notamment Bérangère pour ses conseils portant sur les nanoémulsions et pour avoir été ma cat-sitter.

Je souhaite adresser de profonds remerciements à Anceline. Tu es sincèrement LA découverte de ces années de thèse. Ta présence a illuminé le quotidien au laboratoire. Merci pour ta gentillesse, pour ton humour, ton soutien et d'être qui tu es. Te côtoyer est toujours un plaisir et le temps passé à tes côtés est constamment rafraichissant.

Merci à Camille pour ces dix ans d'amitié, Marine et Anne pour le divertissement quotidien que sont nos conversations. Le confinement aurait été bien long sans les énigmes à la logique si particulière. Johanna, discuter avec toi est toujours un plaisir. Roxane, Gabrielle, malgré la distance les moments passés ensemble sont toujours rafraichissants.

Enfin, un immense merci à ma famille et notamment mes parents pour leur soutien indéfectible et pour avoir cru en moi depuis tant d'années ; ma grande sœur modèle Chloé, Hoël et Lou, vous êtes une source d'inspiration. Et merci Chimie !

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	1
<i>Chapitre I : La maladie de Parkinson : physiopathologie et défi thérapeutique</i>	5
1. La maladie de Parkinson	7
I. La maladie de Parkinson : définition et description	7
1. Historique et contexte.....	7
2. La dopamine.....	8
3. Symptômes de la maladie de Parkinson	11
II. Physiopathologie de la maladie de Parkinson	13
1. Altération des processus de dégradation.....	14
2. Le lysosome	17
3. L'α-synucléine	18
4. Dysfonctionnements parallèles associés	20
III. Approches thérapeutiques	22
1. Traitements symptomatiques pour la maladie de Parkinson	22
2. Approches thérapeutiques en recherche	27
2. La Barrière Hémato-Encéphalique: barrière physique et métabolique du système nerveux central ____	31
I. Mise en évidence de la Barrière Hémato Encéphalique	31
II. Rôle de la Barrière Hémato Encéphalique	31
III. Organisation de la BHE	32
IV. Estimer le passage de la BHE	35
1. Caractéristiques des molécules franchissant la BHE	35
2. Application du criblage virtuel.....	36
V. Approches pour optimiser le passage de la BHE	37
VI. Les modèles <i>in vitro</i> de la BHE	39
3. Altérations du lysosome, dysfonctions associées et approches thérapeutiques ciblant le pH de l'organite	41
I. Altérations pathologiques du lysosome	41
II. Stratégies visant à augmenter le pH lysosomal	43
III. Stratégies visant à abaisser le pH lysosomal	44
<i>Chapitre II : Formulation et évaluation biologique de nanoémulsions acidifiantes</i>	49
I. Les nanotechnologies : des systèmes de délivrance de molécules thérapeutiques	51
1. Historique et définition.....	51
2. Bénéfices des nanosystèmes.....	52

3.	Les différentes classes de nanosystèmes à usage thérapeutique.....	53
4.	Sélection du nanosystème de choix	59
II.	Les nanoémulsions : intérêt thérapeutique et avantages	61
1.	Définition des émulsions	61
2.	Stabilité des émulsions	64
3.	Composition des nanoémulsions	66
4.	Les procédés de fabrication	68
5.	Caractérisation des nanoémulsions.....	74
Chapitre III : Synthèse, formulation et évaluation biologique de nucléolipides acidifiants à visée anti-Parkinsonienne		79
1.	Les dérivés d'acides nucléiques : molécules d'intérêt thérapeutique	81
I.	Définition et description	81
II.	Intérêt thérapeutique des acides nucléiques	82
III.	Les nucléolipides : des hybrides combinant les avantages des acides nucléiques et des lipides	86
1.	Nucléolipides naturels	86
2.	Lipidisation de molécules connues pour moduler leur activité biologique	87
3.	Conception de nucléolipides comme agents de transfection.....	91
4.	Cas des oligonucléotides-lipides	92
2.	Travaux préliminaires et preuves de concept	94
I.	Travaux préliminaires sur la réactivité de la thymidine silylée	94
II.	Synthèse, formulation et évaluation de nucléolipides fluorescents comme preuve de concept	102
3.	Synthèse des nucléolipides acides	106
I.	Synthèse des intermédiaires nucléolipidiques benzyles	106
I.	Approche synthétique à des dérivés monoacides	109
II.	Conception, synthèse, formulation et évaluation biologique du premier nucléolipide acide : cas de l'acide oxalique	110
1.	Approche synthétique.....	110
2.	Formulation des nanoémulsions	112
3.	Évaluation biologique	115
4.	Solubilité du nucléolipide dans l'huile	117
5.	Modulation de la chaîne lipidique	118
III.	Cas de l'acide oxaloacétique	119
IV.	Cas de l'acide succinique	120
1.	Approche synthétique.....	120
2.	Solubilité des nucléolipides dans l'huile.....	122
3.	Formulation des nanoémulsions	123
4.	Dosage des composés nucléolipidiques acides	124
5.	Évaluation biologique	125
4.	Approche synthétiques à des dérivés multimériques	131

I. Origine de l'approche : analogie avec la multivalence	131
II. La chimie click pour la formation de liaisons triazoles	133
1. La CuAAC	133
2. La RuAAC	135
3. Cycloaddition sans cuivre	135
III. Première approche synthétique pour l'obtention d'un multimère	136
1. Synthèse du cœur carboné des composés multimériques	136
2. Conception et synthèse de nucléolipide tétramérique	137
3. Solubilité et formulation du multimère dans l'huile	142
IV. Approche alternative pour la synthèse de composés multimériques	143
V. Synthèse de multimères acides masqués	146
1. Conception et synthèse	146
2. Solubilité et formulation en nanoémulsions	148
3. Évaluation biologique	149
5. Synthèse des résultats et conclusion	152

Chapitre IV : Application de notre approche à la synthèse de nucléoside-peptides à visée anti-Alzheimer **155**

1. La maladie d'Alzheimer	157
I. Définition et description	157
1. Historique et contexte	157
2. Symptômes de la maladie d'Alzheimer	159
II. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	160
1. Mécanismes pathogéniques : l'hypothèse amyloïde	160
2. Les peptides A β	162
3. Vers une remise en cause de la théorie amyloïde ?	164
4. La protéine tau	165
5. Neuro-inflammation	167
6. Dysfonctionnements associés	168
III. Approches thérapeutiques actuelles	168
2. La maladie d'Alzheimer et le peptide KLVFFA	170
I. Molécules organiques inhibitrices de la formation des fibres A β	170
II. Inhibiteurs peptidiques	173
III. Cas particulier du peptide KLVFFA	177
3. Conception et synthèse de nucléolipides-KLVFFA	179
I. Etat de l'art sur les nucléosides-peptides d'intérêt biologique	179
1. Nucléosides-peptides naturels	179
2. Nucléosides-peptides synthétiques	180
II. Stratégie envisagée	184

III.	Synthèse des conjugués nucléosides KLVFFA	185
1.	Synthèse du peptide KLVFFA	186
2.	Synthèse des nucléosides.....	188
3.	Conjugaison : accès aux nucléosides KLVFFA.....	189
4.	Synthèse des résultats et conclusion	195
	<i>Conclusion et perspectives</i>	<i>197</i>
	<i>Experimental procedures</i>	<i>203</i>

Table des figures

FIGURE 1 ILLUSTRATION DE LA PERTE DE NEURONES DOPAMINERGIQUES AU NIVEAU DE LA SUBSTANCE NOIRE. <i>ADAPTE DE DERKINDEREN ET AL.</i>	8
FIGURE 2 BIOSYNTHESE DE LA DOPAMINE ET NEUROTRANSMISSION SYNAPTIQUE.	9
FIGURE 3 VOIE DOPAMINERGIQUE NIGRO-STRIATALE ET COMPLICATIONS ASSOCIEES A SA DEGENERESCENCE. <i>ADAPTE DE DERKINDEREN ET AL.¹⁰</i>	10
FIGURE 4 PROCESSUS DE DEGRADATION INTRACELLULAIRE IMPLIQUANT LE PROTEASOME.	15
FIGURE 5 VOIES DE DEGRADATION INTRACELLULAIRE PAR LES LYSOSOMES. EXEMPLE AVEC L'A-SYNUCLEINE. <i>ADAPTE DE MARTINEZ-VICENTE ET COL.¹⁹</i>	16
FIGURE 6 AGREGATION TOXIQUE PROTEIQUE DUE A UNE ALTERATION DU pH LYSOSOMAL. EXEMPLE DE D'A-SYNUCLEINE.	18
FIGURE 7 PRINCIPAUX MECANISMES DYSFUNCTIONNELS AU SEIN D'UNE CELLULE NEURONALE PARKINSONIENNE.	22
FIGURE 8 MECANISMES DES APPROCHES VISANT A REGULER LES SYMPTOMES DU AU DEFICIT DOPAMINERGIQUE DANS LA MALADIE DE PARKINSON. ADAPTE D'AMINOFF	24
FIGURE 9 STRUCTURES CHIMIQUES D'INHIBITEURS ENZYMATIQUES.	25
FIGURE 10 STRUCTURES CHIMIQUES D'AGONISTES DOPAMINERGIQUES.	26
FIGURE 11 CYCLE DE VIE DU MEDICAMENT.	28
FIGURE 12 ORGANISATION DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE. ADAPTE DE JAMIESON ET AL.⁵⁶	32
FIGURE 13 REPRESENTATION DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET DES MODES DE PASSAGE POSSIBLES. ADAPTE D'ABBOTT ET AL.⁵⁷	35
FIGURE 14 MODELES IN VITRO DE LA BHE.	40
FIGURE 15 ROLE CENTRAL DU LYSOSOME DANS DES PATHOLOGIES REPANDUES.	42
FIGURE 16 MOLECULES POUVANT AUGMENTER LE pH LYSOSOMAL.	44
FIGURE 17 NANOPARTICULE PHOTO-ACTIVABLE POUR ACIDIFIER LE LYSOSOME.	45
FIGURE 18 CLIVAGE DU PLGA.	46
FIGURE 19 RESULTATS DES EVALUATIONS DE NE-PLGA POUR ACIDIFIER LE LYSOSOME.	48
FIGURE 20 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 4 GENERATIONS DE NANOSYSTEMES.	52
FIGURE 21 SYSTEME DE CLASSIFICATION BIOPHARMACEUTIQUE. ADAPTE D'AMIDON ET AL.¹⁰²	53
FIGURE 22 REPRESENTATION DES NANOSYSTEMES LES PLUS COURANTS.	54
FIGURE 23 ENCAPSULATIONS DE MOLECULES AU SEIN DE DENDRIMERES.	55
FIGURE 24 UTILISATION DES QD POUR LA QUANTIFICATION DE PEPTIDE AB DANS L'OBJECTIF DE DIAGNOSTIQUER LA MALADIE D'ALZHEIMER. ADAPTE DE TANG ET AL.¹⁰⁴	56
FIGURE 25 ETUDE DE L'EFFET DE LA MORPHOLOGIE DE NANOPARTICULES D'OR SUR LEUR INTERNALISATION CELLULAIRE.	58
FIGURE 26 DIVERSITE DE TAILLE DES NANOFORMULATIONS.	59
FIGURE 27 SYSTEME DE CLASSIFICATION NANOTOXICOLOGIQUE. ADAPTE DE KECK ET MULLER.¹¹³	60
FIGURE 28 MICRO ET NANOEMULSIONS SIMPLES ET DOUBLES POSSIBLES.	63

FIGURE 29 LOI DE STOKES.	64
FIGURE 30 PHENOMENES DE DESTABILISATION DES NANOEMULSIONS DE MANIERE REVERSIBLE ET IRREVERSIBLE. ADAPTE DE McCLEMENTS. ¹²⁶	66
FIGURE 31 STRUCTURE D'UN TENSIOACTIF.	67
FIGURE 32 BALANCE HLB DES TENSIOACTIFS ASSOCIEE A LEURS PROPRIETES. ADAPTE DE GRIFFIN. ¹²⁸	68
FIGURE 33 PROCESSUS D'EMULSIFICATION SPONTANEE. ADAPTE DE SABERI ET AL.	69
FIGURE 34 PRINCIPE DE LA FORMULATION DE NANOEMULSION PAR LA METHODE PIT. ADAPTE DE SOLANS ET SOLE. ¹³⁴	70
FIGURE 35 PRINCIPE DE LA FORMULATION PAR LA METHODE PIC. ADAPTE DE SOLANS ET SOLE. ¹³⁴	71
FIGURE 36 PROCEDES DE FORMULATION A MEMBRANE. À PARTIR DE LA PHASE DISPERSEE (A GAUCHE) OU A PARTIR D'UNE EMULSION DEJA CONSTITUEE (A DROITE). ADAPTE DE PIACENTINI ET AL. ¹³⁸	72
FIGURE 37 PROCESSUS DE SONICATION PERMETTANT LA REDUCTION DE TAILLE DES GOUTTES D'HUILE PAR CAVITATION. ADAPTE DE GUPTA ET AL. ¹²⁴	73
FIGURE 38 METHODE D'HOMOGENEISATION A VALVE A HAUTE PRESSION. ADAPTE DE McCLEMENTS ET AL. ¹⁴⁴	73
FIGURE 39 PRINCIPE DE LA REDUCTION DE TAILLE DES GLOBULES PAR MICROFLUIDISEUR. ADAPTE DE McCLEMENTS ET AL. ¹⁴⁴	74
FIGURE 40 REPRESENTATION DU POTENTIEL Z POUR UNE NANOEMULSION L/H CHARGEE NEGATIVEMENT.	77
FIGURE 41 REPRESENTATION DES NUCLEOSIDES (A.) ET DE L'APPARIEMENT INTERBASE POSSIBLE (B.)	82
FIGURE 42 MODIFICATIONS CHIMIQUES ENVISAGEABLES POUR LA SYNTHESE D'ANALOGUES NUCLEOSIDIQUES. ADAPTE DE JORDHEIM ET AL. ¹⁵⁵	83
FIGURE 43 DERIVES NUCLEOSIDIQUES ANTIVIRAUX ET ANTICANCEREUX.	84
FIGURE 44 STRATEGIES UTILISANT LES OLIGONUCLEOTIDES.	85
FIGURE 45 NUCLEOLIPIDES NATURELS A ACTIVITE BIOLOGIQUE.	87
FIGURE 46 CONJUGAISON LIPIDIQUE SUR UN ANALOGUE NUCLEOSIDIQUE. EXEMPLE DE LA DIDANOSINE...	88
FIGURE 47 CONJUGAISON LIPIDIQUE SUR UN ANALOGUE NUCLEOSIDIQUE. EXEMPLE DE LA GEMCITABINE.	89
FIGURE 48 MODIFICATION LIPIDIQUE D'UN NUCLEOSIDE POUR PROMOUVOIR L'ABSORPTION CEREBRALE.	90
FIGURE 49 SYNTHESE MULTI-ETAPES DE LA DOTAU.	91
FIGURE 50 EXEMPLE DE STRUCTURES CHIMIQUES DES OLIGONUCLEOTIDES PORTANT UNE PARTIE LIPIDIQUE EN 3' (GAUCHE) OU EN 5' (DROITE) AVEC UNE DES SEQUENCE ETUDIEE.	93
FIGURE 51 REACTION DE BENZYLATION AU MICRO-ONDE AYANT ENGENDRE UNE MIGRATION DE GROUPEMENTS SILYLES.	94
FIGURE 52 REACTIONS D'ALLYLATION DANS DES CONDITIONS AU MICRO-ONDE, LORS DESQUELLES DES SOUS-PRODUITS INATTENDUS ONT ETE OBTENUS.	95
FIGURE 53 EXEMPLES DE MIGRATION DE GROUPEMENTS SILYLES DEJA RAPPORTES. A. MIGRATION 2'-3' SUR UN RIBOSE ¹⁸¹ . B. MIGRATION 1,5 SUR UN FRUCTOSE DURANT UNE O-BENZYLATION ¹⁸⁰	96
FIGURE 54 SPECTRES RMN ¹H 300 MHZ, CDCl₃ : MISE EN EVIDENCE DES MIGRATIONS DE GROUPEMENT SILYLE DE LA POSITION 3' VERS LA POSITION 5' DANS LE DMF (NAH, PENDANT 2 MINUTES).	97

FIGURE 55 EFFET DE LA TEMPERATURE ET DU SOLVANT SUR LA MIGRATION DE GROUPEMENT SILYLE DE LA POSITION 3' VERS 5'.	98
FIGURE 56 PROPOSITION D'UN INTERMEDIAIRE REACTIONNEL LORS DU PROCESSUS DE MIGRATION DE GROUPEMENTS PROTECTEURS SILYLES.	99
FIGURE 57 MIGRATION DE GROUPEMENT SILYLE DE LA POSITION 5' VERS 3'.	100
FIGURE 58 COORDINATION DU DMF AVEC LE SILICIUM LORS DE LA FORMATION DE L'INTERMEDIAIRE.	100
FIGURE 59 TRANSESTERIFICATION DANS DES CONDITIONS MICRO-ONDES.	101
FIGURE 60 PROPOSITION D'UN INTERMEDIAIRE REACTIONNEL LORS DU PROCESSUS DE TRANSESTERIFICATION.	101
FIGURE 61 INTERNALISATION CELLULAIRE DE NANOEMULSIONS DE NUCLEOLIPIDES.	103
FIGURE 62 REPRESENTATION DES ANALOGUES NUCLEOLIPIDIQUES CIBLES.	104
FIGURE 63 SCHEMA RETROSYNTHETIQUE GENERAL DES NUCLEOLIPIDES ACIDES.	105
FIGURE 64 SYNTHÈSE DE L'INTERMEDIAIRE NUCLEOSIDIQUE.	107
FIGURE 65 LIAISONS MAJORITAIREMENT UTILISEES ENTRE UN NUCLEOSIDE ET UN LIPIDE.	107
FIGURE 66 MECANISME DE L'ESTERIFICATION SELON LES CONDITIONS DE COUPLAGE DE STEGLICH.	108
FIGURE 67 SYNTHÈSE DES INTERMEDIAIRES NUCLEOLIPIDIQUES.	109
FIGURE 68 ESSAIS DE FONCTIONNALISATION DE LA POSITION 5' PAR SUBSTITUTION AVEC DES MONOACIDES.	110
FIGURE 69 CLIVAGE DE LA PRODRUGUE NUCLEOLIPIDIQUE.	111
FIGURE 70 ESSAIS D'ESTERIFICATION DE L'ACIDE OXALIQUE.	111
FIGURE 71 COUPLAGE DU CHLORURE D'OXALYLE SUR LE NUCLEOLIPIDE.	112
FIGURE 72 REPRESENTATION DU PROCEDE DE FABRICATION DES NANOEMULSION L/H.	113
FIGURE 73 EVALUATION IN VITRO DE LA VIABILITE CELLULAIRE.	116
FIGURE 74 EVALUATION IN VITRO DE L'ACIDIFICATION DU PH LYSOSOMAL.	117
FIGURE 75 APPROCHE SYNTHETIQUE POUR L'OBTENTION DES NUCLEOLIPIDES - ACIDE OXALIQUE DONT LA CHAÎNE LIPIDIQUE EST MODULEE.	118
FIGURE 76 ESTERIFICATION POUR FONCTIONNALISER LA POSITION 5' AVEC L'ACIDE OXALOACETIQUE.	120
FIGURE 77 SYNTHÈSE DES PRODRUGUES PORTANT L'ACIDE SUCCINIQUE, PAR REACTION D'OUVERTURE DE CYCLE DE L'ANHYDRIDE.	121
FIGURE 78 COURBES DE DOSAGE ACIDO-BASIQUE DES NUCLEOLIPIDES ACIDES FORMULES AU SEIN DE NANOEMULSIONS A 1% M/M.	125
FIGURE 79 VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES M17 CONTROLES (SHSCR-1) ET DELETEES DU GENE ATP13A2 (SH403-1), EN L'ABSENCE (UT) OU EN PRESENCE DES NANOEMULSIONS CHARGEES 43 ET 44 APRES 24H.	126
FIGURE 80 SCHEMA DES PRODUITS DE DEGRADATION DU NUCLEOLIPIDE-ACIDE PAR SUITE DU CLIVAGE DES ESTERS PAR LES ENZYMES.	127
FIGURE 81 VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES M17 CONTROLES (SHSCR-1) ET DELETEES DU GENE ATP13A2 (SH403-1), EN L'ABSENCE (UT) OU EN PRESENCE DES NANOEMULSIONS CHARGEES EN NUCLEOLIPIDES 5'-OH, APRES 24H.	128

FIGURE 82 EVALUATION DU PH LYSOSOMAL DES NANOEMULSIONS DE NUCLEOLIPIDES D'ACIDES SUCCINIQUE..	129
.....	
FIGURE 83 EVALUATION DU PH LYSOSOMAL DES NANOEMULSIONS DE NUCLEOLIPIDES 5'-OH..	130
FIGURE 84 APPROCHE SYNTHETIQUE DES DENDRIMERES.	132
FIGURE 85 REACTION DE CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE THERMIQUE DE HUISGEN.....	133
FIGURE 86 MECANISME SIMPLIFIE DE LA 1,3-CYCLOADDITION CATALYSEE AU CU(I), PROPOSE PAR HIMO <i>ET</i> AL.....	134
FIGURE 87 EXEMPLES DE LIGANDS UTILISES POUR STABILISER LE CUIVRE LORS DE LA CUAAC.....	135
FIGURE 88 CYCLOADDITION 1,5 PAR RUAAC.....	135
FIGURE 89 REACTION SPAAC POUR LA FORMATION D'UN TRIAZOLE.....	136
FIGURE 90 VOIES DE SYNTHESE POUR L'OBTENTION DU COEUR CARBONE TETRAAZOTURE DE PENTAERYTHRITYLE.....	137
FIGURE 91 PREMIERE VOIE DE SYNTHESE DU MULTIMERE.....	138
FIGURE 92 SYNTHESE DU PREMIER COMPOSE MULTIMERIQUE.....	138
FIGURE 93 SCHEMA RETROSYNTHETIQUE DE LA SYNTHESE DU PREMIER DERIVE MULTIMERIQUE.....	139
FIGURE 94 VOIE DE SYNTHESE DES NUCLEOLIPIDES POUR L'OBTENTION DES MULTIMERES.....	139
FIGURE 95 SYNTHESE DU PREMIER COMPOSE MULTIMERIQUE D'ANALOGUE DE NUCLEOSIDE.....	140
FIGURE 96 CUAAC ASSISTEE PAR MICRO-ONDES POUR L'OBTENTION DU PARTENAIRE MULTIMERIQUE....	141
FIGURE 97 SYNTHESE DES MULTIMERES PRODRUGUES PAR COUPLAGE DES SUCCINATES SUR LES ALCOOLS LIBRES DU TETRAMERES VIA L'OUVERTURE DES ANHYDRIDES SUCCINIQUES.....	142
FIGURE 98 PROTOCOLE SIMPLIFIE DE LA FORMULATION DU COMPOSE 62 AU SEIN D'UNE NANOEMULSION L/H.....	143
.....	
FIGURE 99 AZIDATION DU DIBROMOBUTANE.....	144
FIGURE 100 VOIE DE SYNTHESE DES PARTENAIRES NUCLEOLIPIDIQUES AZIDES.....	144
FIGURE 101 PROPARGYLATION DU PENTAERYTHRITOL.....	145
FIGURE 102 APPROCHE SYNTHETIQUE POUR L'OBTENTION D'UN MULTIMERE PLUS FLEXIBLE.....	145
FIGURE 103 SCHEMA DE RETROSYNTHESE DES MULTIMERES DONT LES ACIDES SONT PROTEGES POUR UN POTENTIEL EFFET ACIDIFIANT RETARDE.....	146
FIGURE 104 REACTION FINALE POUR L'OBTENTION DES MULTIMERES DE CHOIX.....	147
FIGURE 105 VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES M17 CONTROLES (SHSCR-1) ET DELETEES DU GENE ATP13A2 (SH403-1), EN L'ABSENCE (UT) OU EN PRESENCE DES NANOEMULSIONS CHARGES EN MULTIMERES 71 ET 72 A 3% (M/M) APRES 24H.....	150
FIGURE 106 PH LYSOSMAL MESURE A LA SUITE DE L'EXPOSITION DES CELLULES PAR LES COMPOSES MULTIMERIQUES.....	151
FIGURE 107 COMPOSES NUCLEOLIPIDIQUES ACIDES EVALUES <i>IN VITRO</i>	152
FIGURE 108 MISE EN EVIDENCE DE LA NEURODEGENERESCENCE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER. ADAPTE DE WANG <i>ET AL.</i> ²²⁶	159
FIGURE 109 PROGRESSION DE LA NEURODEGENERESCENCE ET CONSEQUENCES SUR LES FONCTIONS NEURONALES ASSOCIEES.....	160

FIGURE 110 CASCADE AMYLOÏDE, HYPOTHESE PRINCIPALE DU DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.	161
FIGURE 111 PROTEOLYSE DE L'APP PAR LA VOIE NON AMYLOÏDE ET AMYLOÏDE. ADAPTE DE CORONEL ET AL. ²³⁴	163
FIGURE 112 IMPLICATION DE LA PROTEINE TAU DANS LE PROCESSUS PHYSIOLOGIQUE ET DYSFONCTION PATHOLOGIQUE. ADAPTE DE BRUNDEN ET AL.	166
FIGURE 113 EVOLUTION DE LA FIBRILLATION <i>IN VITRO</i> DU PEPTIDE AB SANS INHIBITEUR (BLEU) ET AVEC INHIBITEUR (ROUGE). ADAPTE DE DUFOUR, E.	171
FIGURE 114 EVALUATION DE L'INHIBITION DE LA FIBRILLATION DU PEPTIDE AB PAR LE SUIVI DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE DE LA THT. ADAPTE DE DUFOUR, E. ²⁷⁴	172
FIGURE 115 EXEMPLES DE PETITES MOLECULES ORGANIQUES ETUDIEES POUR L'INHIBITION DE LA FIBRILLATION AMYLOÏDE.	173
FIGURE 116 SEQUENCE DU PEPTIDE AB.	173
FIGURE 117 STRUCTURE DES PEPTIDES QKLVFF ET IAB5.	175
FIGURE 118 COMPOSE DEVELOPPE PAR FINDEIS ET AL. ²⁸³	176
FIGURE 119 STRUCTURE DES MOLECULES PEPTIDIQUES INHIBITRICE DE LA FIBRILLATION D'AB.	177
FIGURE 120 REPRESENTATION DU CHASSIS MOLECULAIRE CYCLODECAPEPTIDIQUE FONCTIONNALISE PAR LE PEPTIDE KLVFFA.	178
FIGURE 121 SELECTION DE NUCLEOSIDES-PEPTIDES NATURELS.	180
FIGURE 122 NUCLEOSIDE-PEPTIDE LIE PAR UN PONT DISULFURE.	181
FIGURE 123 NUCLEOSIDE PEPTIDE LIE PAR UNE LIAISON AMIDE.	182
FIGURE 124 INTERACTION D'UN ACIDE NUCLEIQUE PEPTIDE AVEC UN ADN. D'APRES WU ET AL.	183
FIGURE 125 NUCLEOLIPIDE PEPTIDE POUR ACCROITRE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE PEPTIDIQUE.	184
FIGURE 126 APPROCHE ETUDIEE POUR VEHICULER JUSQU'AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL UN NUCLEOLIPIDE-PEPTIDE INHIBITEUR DES FIBRES AB.	185
FIGURE 127 SCHEMA RETROSYNTHETIQUE DES CONJUGUES NUCLEOSIDES KLVFFA.	185
FIGURE 128 CYCLE DE SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE.	186
FIGURE 129 AZIDATION DE L'ACIDE IODOACETIQUE.	187
FIGURE 130 SCHEMA DE SYNTHESE DU PEPTIDE KLVFFA.	187
FIGURE 131 N-PROPARGYLATION DE LA THYMIDINE.	188
FIGURE 132 VOIE DE SYNTHESE DU NUCLEOSIDE MONOLIPIDIQUE PROPARGYLE.	189
FIGURE 133 SYNTHESE DU NUCLEOSIDE BISLIPIDIQUE PROPARGYLE.	189
FIGURE 134 SPECTRE D'HPLC RESULTANT DE LA REACTION CLICK EFFICACE.	191
FIGURE 135 REACTION DE CHIMIE CLICK CUAAC ENTRE LE COMPOSE NUCLEOLIPIDE 77 ET LE PEPTIDE.	191
FIGURE 136 SPECTRES DE RMN DU PROTON ET PROFIL DE MASSE (ESI) DU COMPOSE 79.	192
FIGURE 137 REACTION DE CHIMIE CLICK CUAAC ENTRE LE NUCLEOSIDE BISLIPIDIQUE ET LE PEPTIDE AZIDE.	194
FIGURE 138 REACTION DE CHIMIE CLICK CUAAC ENTRE LE COMPOSE NUCLEOSIDE 48 ET LE PEPTIDE.	194

Table des tableaux

TABLEAU 1 PRINCIPALES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET PROTEINE AGREGEE CARACTERISTIQUE. <i>ADAPTE DE SKOVRONSKY ET AL.</i>	6
TABLEAU 2 EVOLUTION DES STADES CLINIQUES ET DES SYMPTOMES ASSOCIES.	13
TABLEAU 3 REPARTITION DES ESSAIS CLINIQUES PORTANT SUR LA MALADIE DE PARKINSON, DE 2020 A 2022.	29
TABLEAU 4 CONSTANTES DIELECTRIQUES ET DIPOLAIRES DES TROIS SOLVANTS DE REACTION ETUDIES.	99
TABLEAU 5 INTERNALISATION CELLULAIRE ET VIABILITE CELLULAIRE DES COMPOSES EVALUES.	104
TABLEAU 6 COMPOSITION DES NANOEMULSIONS CONTROLES.	114
TABLEAU 8 CARACTERISTIQUES DES NANOEMULSIONS CHARGEES EN NUCLEOLIPIDE ACIDE OXALIQUE ET D'UNE NANOEMULSION CONTROLE NON CHARGEE.	115
TABLEAU 9 CONDITIONS DES ESTERIFICATIONS DE STEGLICH POUR L'OBTENTION DU DERIVE OXALOACETIQUE.	120
TABLEAU 10 ESTIMATION INFORMATIQUE DE LA LIPOPHILIE DES NUCLEOLIPIDES EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE LEUR CHAINE CARBONNEE.	123
TABLEAU 7 COMPOSITION EN ACIDES GRAS DU MIGLYOL® 812N.	123
TABLEAU 11 COMPOSITIONS DES NANOEMULSIONS CHARGEES AVEC LES NUCLEOLIPIDES ACIDES.	124
TABLEAU 12 CARACTERISTIQUES DES NANOEMULSIONS CHARGEES EN NUCLEOLIPIDES ACIDES.	124
TABLEAU 13 CARACTERISTIQUES DES NANOEMULSIONS CHARGEES EN COMPOSES NON ACIDES.	128
TABLEAU 14 CONDITIONS DE REACTION CLICK AU MICRO-ONDE POUR OBTENIR LE PARTENAIRE MULTIMERIQUE.	141
TABLEAU 15 ESSAIS DE CUAAC ENTRE LE COEUR PROPARGYLE ET LES NUCLEOLIPIDES AZOTURES.	145
TABLEAU 16 NOMBRES D'EQUIVALENTS UTILISES POUR L'ESTERIFICATION EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE CHAINE DU NUCLEOLIPIDE.	147
TABLEAU 17 COMPOSITIONS DES NANOEMULSIONS CHARGEES AVEC LES COMPOSES MULTIMERIQUES.	148
TABLEAU 18 CARACTERISTIQUES DES NANOEMULSIONS CHARGEES EN COMPOSES MULTIMERIQUES.	149
TABLEAU 19 COMPARAISON DU PH DES NANOEMULSIONS DES NUCLEOLIPIDES MONOMERIQUES ET MULTIMERIQUES CHARGEES A 3% M/M.	149
TABLEAU 20 COMPARAISON DES EVALUATIONS BIOLOGIQUES DES NANOEMULSIONS DE PLGA DE REFERENCE, DU NUCLEOLIPIDE C16 ACIDE OXALIQUE A 1% (M/M) ET DES NUCLEOLIPIDES D'ACIDES SUCCINIQUES A 3% (M/M).	153
TABLEAU 21 ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA GEMCITABINE ET DE SES ANALOGUES SUR TROIS LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES A 48H.	181
TABLEAU 22 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE REACTION POUR LA FORMATION DU TRIAZOLE.	193

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
AMC	Autophagie Médié par les protéines Chaperonnes
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATP	Adénosine TriPhosphate
ADN	Acide Désoxyribonucléique
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> – Protéine précurseur de l'amyloïde
APTS	Acide Para-ToluèneSulfonique
Ar	Aromatique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
siARN	<i>Small Interferent ARN</i> – Petit ARN Interférent
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i> – Système de classification Biopharmaceutique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COMT	Catéchol-O-méthyltransferase
CuAAC	<i>Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition</i> – Cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée au cuivre (I)
DAT	<i>Dopamine Transporter</i> – Transporteur de la dopamine
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropyléthylamine
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Diffusion Dynamique de la Lumière
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
DOTAU	Tosylate de <i>N</i> -[5'-(2',3'-dioleoyl)uridine]- <i>N',N',N'</i> -triméthylammonium

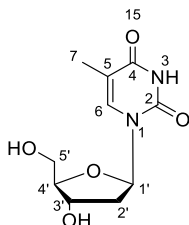
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
eq	équivalent
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i> - Ionisation par électronébuliseur
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
GA	Acide Glycolique
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
h	heure
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HCQ	Hydroxychloroquine
HLB	<i>Hydrophile-Lipophile Balance</i> – Balance Hydrophile-Lipophile
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> - Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPP	<i>High Pressure Processing</i> – Homogénéisateur à Haute Pression
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> – Spectrométrie de masse haute résolution
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i> - Concentration Inhibitrice Médiane
IR	InfraRouge
<i>J</i>	Constante de couplage
LA	Acide Lactique
LD ₅₀	<i>Lethal Dose, 50%</i> - Dose létale médiane
L-Dopa	Levo-DOPA
MAO	Monoamine oxydase
min	minutes
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NaAsc	Ascorbate de Sodium
NCS	<i>Nanotoxicological Classification System</i> – Système de Classification Nanotoxicologique
NDGA	Acide Nordihydroguaiaretique
NE	Nanoémulsion
NL	Nucléolipide

NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-Aspartate
NP	Nanoparticule
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> – Analyse de Suivi des Nanoparticules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PdI	<i>Polydispersity Index</i> – Indice de Polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
PIC	<i>Phase Inversion Composition</i> – Composition d’Inversion de Phase
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i> – Température d’Inversion de Phase
pKa	Potentiel d’acidité d’un couple
PLGA	Poly (acide lactique-coglycolique)
ppm	Partie par million
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> - Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
QD	Quantum Dot
<i>qs</i>	<i>quantum satis</i> – quantité suffisante
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Dérivé réactif de l’Oxygène
<i>Rt</i>	<i>Retention time</i> – Temps de rétention
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> – Synthèse Peptidique sur Support Solide
TA	Température Ambiante
TBAF	<i>Tetra-n-butylammonium fluoride</i> – Fluorure de Tetrabutylammonium
TBDMS	tert-butyldiméthylsilyle
TBDPS	tert-butyldiphénylsilyle
<i>t</i> -BuOH	tert-butanol
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> – Microscopie Electronique à Transmission
TFA	Acide Trifluoroacétique
TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
TIPS	Triisopropylsilyle

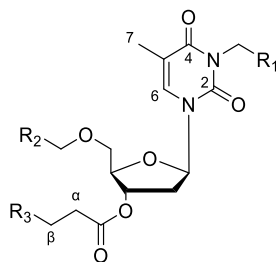
TIS	Triisopropylsilane
THF	Tetrahydrofurane
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
ThS	Thioflavine S
ThT	Thioflavine T
UPS	<i>Ubiquitine Proteasome System</i> – Système Ubiquitine Protéasome
UV	UltraViolet
μw	Micro-onde
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – Facteur de Croissance de l'endothélium Vasculaire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i> – Transporteur vésiculaire des monoamines

Conventions et nomenclatures

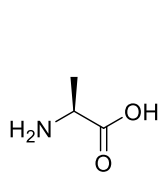
La convention utilisée pour la nomenclature et la numérotation de la thymidine et des analogues nucléosidiques dérivés est détaillée ci-dessous.



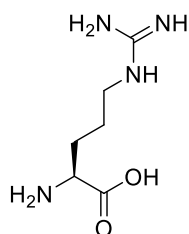
L'insertion d'un lipide conduira à l'appellation α et β de ses atomes les plus proches de l'ester. La substitution de l'amine libre $N3$ et de l'alcool primaire $5'$ conduira à une numérotation qui sera précisée en partie expérimentale.



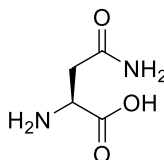
Liste des acides aminés naturels en série L



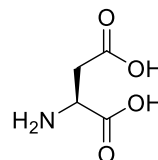
Alanine
(Ala/A)



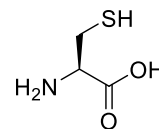
Arginine
(Arg/R)



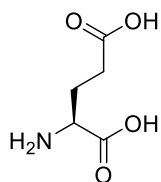
Asparagine
(Asn/N)



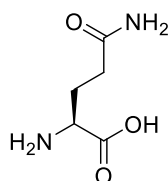
Acide aspartique
(Asp/D)



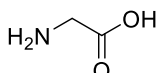
Cystéine
(Cys/C)



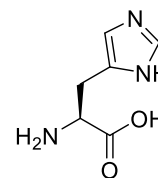
Acide glutamique
(Glu/E)



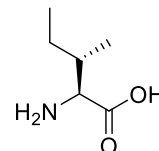
Glutamine
(Gln/Q)



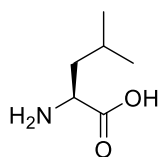
Glycine
(Gly/G)



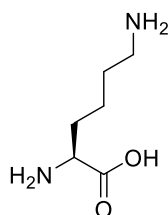
Histidine
(His/H)



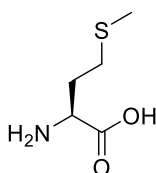
Isoleucine
(Ile/I)



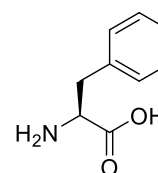
Leucine
(Leu/L)



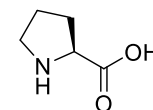
Lysine
(Lys/K)



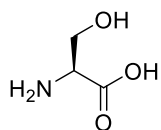
Méthionine
(Met/M)



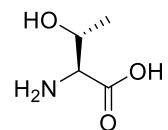
Phénylalanine
(Phe/F)



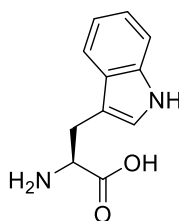
Proline
(Pro/P)



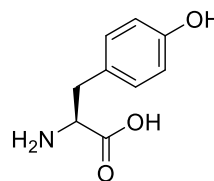
Sérine
(Ser/S)



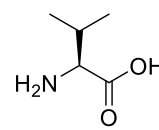
Thréonine
(Thr/T)



Tryptophane
(Trp/W)



Tyrosine
(Tyr/Y)



Valine
(Val/V)

Introduction générale

Le terme de maladies neurodégénératives regroupe différentes pathologies dont la fréquence augmente avec le vieillissement de la population et sous l'influence de facteurs environnementaux variés. Les estimations comptent plus de 60 millions de personnes concernées par la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson à travers le monde, ce qui en fait les maladies neurodégénératives les plus représentées. À ce jour, aucun traitement curatif efficace n'est commercialisé, ce qui fait de la lutte contre ces maladies, un enjeu de santé publique et sociétal majeur. Le développement d'une approche thérapeutique efficace est notamment freiné par la difficulté à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour pénétrer le système nerveux central.

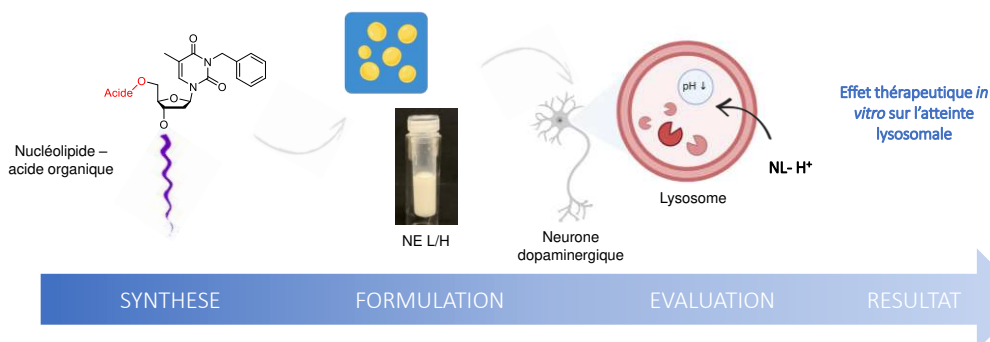
Le premier chapitre bibliographique de ce manuscrit portera sur la maladie de Parkinson qui représente 200 000 cas en France pour une incidence de 25 000 cas par an, et qui est liée à la dégradation et la disparition progressive des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire du cerveau. Son étiologie, la physiopathologie, les traitements actuels avec leurs limitations et le défi que représente le passage de la BHE seront discutés. L'altération de la fonction lysosomale, et notamment de son pH, sont aujourd'hui admis comme un facteur clé de la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson. Le pH de ces organites intracellulaires

Introduction générale

est anormalement élevé dans les neurones dopaminergiques dysfonctionnels. La restauration de l'acidité des lysosomes représente une stratégie prometteuse pour une action thérapeutique mais seuls quelques agents ciblant spécifiquement le pH lysosomal ont été rapportés à ce jour. Notre approche se situant dans ce contexte, le rôle du lysosome dans le développement de la pathologie sera également présenté.

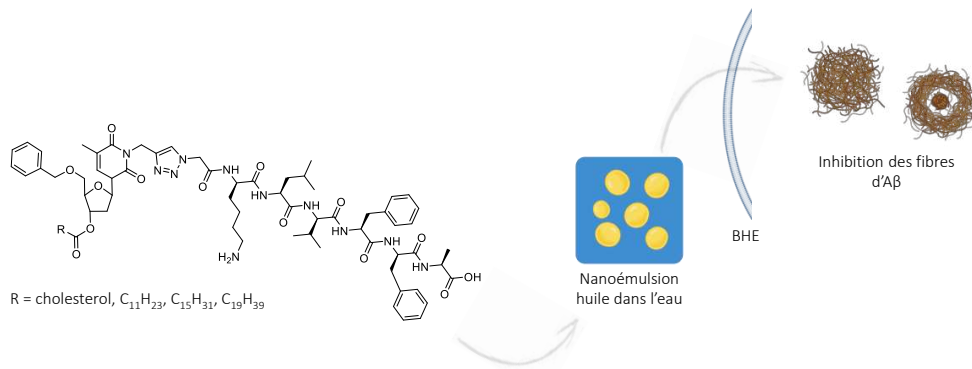
Ces travaux de thèse ont porté sur le développement de molécules prodrogues nucléolipidiques, pouvant être formulées au sein de nanoémulsions (lipophile dans hydrophile L/H dans eau) afin de les protéger et les véhiculer au travers des membranes. Le chapitre 2 introduira donc les différents nanosystèmes existants et leur intérêt pour le franchissement des barrières biologiques. Le choix des nanoémulsions pour véhiculer des substances actives jusqu'au système nerveux central sera explicité.

Au cours de ce travail et dans notre approche visant à concevoir des molécules capables d'acidifier le lysosome, des monomères nucléolipides et des analogues multimères ont été conçus comme des prodrogues bioinspirées et biodégradables, portant une ou plusieurs entités d'acide succinique biocompatible comme substance active. Le chapitre 3 rapportera la synthèse de ces nucléolipides prodrogues, leur formulation au sein de nanoémulsions L/H et leur évaluation biologique *in vitro* sur cellules humaines modèles de la maladie de parkinson par le Dr. Benjamin Dehay, neurobiologiste, spécialiste de la maladie de Parkinson (Institut des Maladies Neurodégénératives, Bordeaux).



Le chapitre 4 rapportera une approche analogue, visant à synthétiser des hybrides nucléolipides-peptides dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. L'étiologie, les mécanismes

biologiques mis en jeu et un état de l'art sont présentés. La synthèse de nucléolipides-peptides conçus comme des inhibiteurs de la fibrillation amyloïde sera également discutée.



Chapitre I

La maladie de Parkinson : physiopathologie et défi thérapeutique

Les troubles neurologiques sont des maladies qui touchent le système nerveux, que ce soit le cerveau, la moelle épinière ou encore les nerfs et terminaisons nerveuses. Dans ces troubles sont regroupées de nombreuses maladies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'épilepsie, les migraines et céphalées, les troubles psychiatriques et du comportement. Il existe de nombreux processus impliqués dans le déclenchement et l'évolution de ces troubles, bien que tous ne soient pas connus. D'après l'OMS, des centaines de millions de personnes souffrent de ces troubles neurologiques. Ce chiffre est aussi important en raison de la forte prévalence de la migraine, des accidents vasculaires cérébraux, ou bien de l'épilepsie. Cela représente ainsi 1 personne sur 4 touchée par une pathologie du système nerveux.

Dans ces troubles neurologiques plusieurs pathologies sont regroupées sous le terme de maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou bien encore la maladie d'Huntington y sont retrouvées. Ces pathologies, bien que variées et aux nombreuses conséquences, ont toutes pour point commun

la neurodégénérescence, caractérisée par la perte progressive de fonction ou de structure de certains neurones jusqu'à leur mort cellulaire.

Ces différentes affections sont similaires du point de vue de l'évolution du processus pathologique et de leur localisation au sein du système nerveux central. Toutefois, les neurones touchés ainsi que les protéines impliquées diffèrent.

Tableau 1 | Principales maladies neurodégénératives et protéine agrégée caractéristique. Adapté de Skovronsky et al.¹

Maladie	Localisation	Protéine agrégée
Alzheimer	Extra-cellulaire	Amyloïde β
	Intracytoplasmique	Tau
	Intracytoplasmique	α -synucléine
Parkinson	Intracytoplasmique	α -synucléine
SLA	Intracytoplasmique	Superoxyde dismutase-1
Démence à corps de Lewy	Intracytoplasmique	α -synucléine

L'épidémiologie montre que la fréquence de ces maladies est en constante hausse en raison du vieillissement de la population et de l'élévation du niveau de développement des pays. Actuellement en France, il est estimé que plus d'un million de personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer et qu'environ 160 000 personnes sont traitées pour la maladie de Parkinson², ce qui en fait la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue³. Il est d'ailleurs essentiel de souligner que ces chiffres peuvent être faussés en raison de l'absence de diagnostic et donc de traitement. Ce nombre peut paraître faible au vu de la population globale mais les estimations projettent que la prévalence de la maladie va considérablement augmenter⁴.

¹ Skovronsky, D. M., Lee, V. M-Y., Trojanowski, J.Q. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, 1, 151-170.

² <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives>, 27/06/2019 [consulté le 10/12/2021]

³ Kalia, L.V., Lang, A.E. Parkinson's disease. *Lancet*, **2015**, 386, 896-912.

⁴ Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., and Tanner, C.M. *Neurology*, **2007**, 68, 5, 384-386.

1. La maladie de Parkinson

I. La maladie de Parkinson : définition et description

1. Historique et contexte

James Parkinson est le premier médecin à décrire la maladie de Parkinson, en 1817, qu'il nomme alors « paralysie agitante ». Il s'agit d'une maladie neurodégénérative, chronique et évolutive incurable, liée à l'âge. Sa prévalence augmente ainsi, passant de 1% pour les personnes de 65 ans à 4% chez les plus de 85 ans⁵. Cette maladie est très majoritairement sporadique et idiopathique ; les formes génétiques ne représentant que moins de 10 % des cas recensés⁶ et les transmissions héréditaires étant considérées comme négligeables.

Elle n'a pas de cause ni d'origine parfaitement connues mais il est aujourd'hui admis que des facteurs environnementaux contribuent au développement de la maladie. On retrouve essentiellement la mise en cause des pesticides. En effet, l'exposition aux pesticides a été notamment corrélée à une augmentation des risques de développement de la maladie, dès 1983⁷ et confirmé depuis⁸. Pour exemple, la roténone, qui est désormais interdite en Europe, entrait dans la composition de nombreux pesticides et insecticides. Il a été montré que cette molécule engendre un stress oxydatif très important au niveau cérébral, déclenchant la maladie de Parkinson lorsque des rats y sont exposés de manière chronique⁹. D'autres facteurs de risques ont été relevés, parmi lesquels le fait d'être un homme, de vivre en milieu rural ou encore le fait d'avoir eu des commotions cérébrales.

Si le processus physiopathologique, découlant des facteurs de risques, n'est pas élucidé à ce jour, il est désormais admis que la maladie est liée à la dégénérescence d'un type spécifique de neurones : les neurones dopaminergiques du *locus niger*, c'est-à-dire de la substance noire du tronc cérébral (**Figure 1**). La dégénérescence de ces neurones participe aux symptômes de la maladie.

⁵ de Lau, L.M.L., Breteler, M.M.B. *Lancet Neurol.* **2006**, 5, 525-535.

⁶ Deng, H., Wang, P., Jankovic, J. *Ageing Res. Rev.* **2018**, 42, 72-85.

⁷ Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I. *Science.* **1983**, 219, 4587, 979-80.

⁸ Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.P., Delebotte, B., Alperovitch, A., Tzourio, C. *Ann Neurol.* **2009**, 66, 4, 494-504.

⁹ Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., and Greenamyre, J.T. *Nat. Neurosci.* **2000**, 3, 12, 1301-1306.

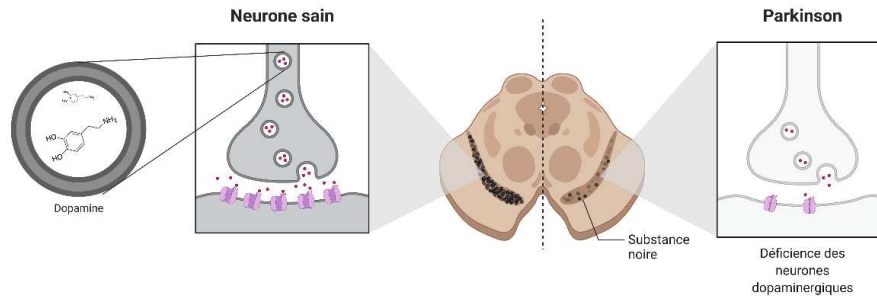


Figure 1 | Illustration de la perte de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire.
Adapté de Derkinderen et al.¹⁰

2. La dopamine

2.1. Biosynthèse de la dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur catécholaminergique impliqué dans le contrôle des mouvements corporels. Plus généralement, la dopamine joue le rôle de neurotransmetteur au niveau du système nerveux central, et le rôle d'autacoïde au niveau périphérique (neuromédiateur au niveau digestif, régulateur des flux hydriques au niveau cellulaire...). Le taux de dopamine est un facteur essentiel au bon fonctionnement neuronal. En effet, des études ont montré qu'un déficit en dopamine était relié à la maladie de Parkinson, tandis qu'un excès est associé à la schizophrénie.

Obtenu à partir de la tyrosine la molécule subit l'action de diverses enzymes pour aboutir à sa forme finale. La biosynthèse de la dopamine est illustrée en **Figure 2**. Sous l'action de la tyrosine hydroxylase, la tyrosine est transformée en DOPA. La DOPA est le précurseur de la dopamine, issue d'une décarboxylation sous l'action de la DOPA décarboxylase. Ce système de synthèse s'auto-entretient de telle sorte à avoir suffisamment de dopamine tout en évitant son excès : l'activité de la tyrosine hydroxylase est régulée *in vivo* par la quantité de dopamine présente. En outre, un système de dégradation permet, quant à lui, l'élimination de la dopamine *in situ* par action des catéchol-O-méthyltransférases (COMT) et des monoamine oxydases (MAO) du cerveau. Les systèmes enzymatiques régulant la dopamine permettent ainsi de conserver l'homéostasie.

¹⁰ Derkinderen, P., Damier, P. *La maladie de Parkinson*, 3th ed ; Elsevier, Masson, 2015.

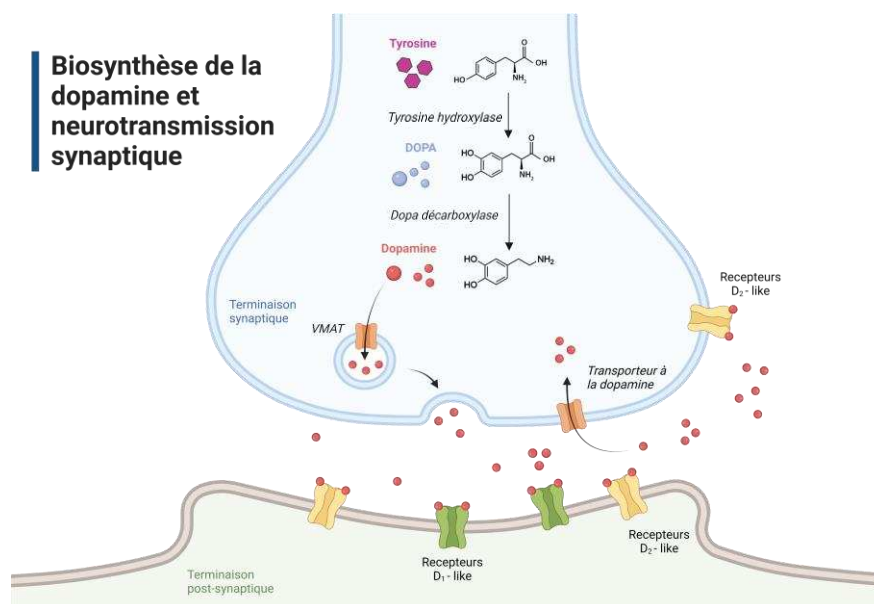


Figure 2 | Biosynthèse de la dopamine et neurotransmission synaptique.

2.2. Neurotransmission synaptique de la dopamine

La dopamine ainsi synthétisée au sein du neurone, va être prise en charge par les Transporteurs Vésiculaires des Monoamines (VMAT) pour intégrer des vésicules synaptiques. Ces vésicules vont ensuite relarguer les neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique. La dopamine libérée va alors être reconnue par les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), présents au niveau transmembranaire de la terminaison post-synaptique¹¹. Les protéines G liées aux récepteurs reposent sur la conversion du GTP en GDP pour agir tel un interrupteur. Les réactions biochimiques cellulaires découlant sont donc soit déclenchées soit inhibées. Plusieurs sous-types de récepteurs sont retrouvés, réunis sous l'appellation D₁-like (D₁ et D₅) ou D₂-like (D₂, D₃ et D₄), suivant la protéine G associée et leur effet. L'activation des récepteurs post-synaptiques engendrera l'expression des comportements moteurs. Au niveau pré-synaptique, certains de ces RCPG sont également retrouvés, ainsi que des transporteurs à dopamine (DAT), permettant une récupération de la dopamine synaptique. Les RCPG pré-synaptiques, D₂-like, auront un effet de régulation de la synthèse et de l'excrétion de la dopamine. La recapture de la dopamine par les transporteurs pré-synaptiques opère également un rétrocontrôle des niveaux dopaminergiques (**Figure 2**).

¹¹ Bordet, R. *Rev. Neurol.* **2004**, 160, 8-9, 862-870.

Les enzymes de dégradation poursuivent leur rôle de recyclage du neurotransmetteur au niveau de la terminaison synaptique et de la fente synaptique.

Pour contrer la diminution pathologique des niveaux de dopamine et donc de la stimulation post-synaptique, il peut être envisagée d'agir au niveau des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la dopamine ou de stimuler les récepteurs post-synaptiques à la dopamine. L'inhibition des enzymes de dégradation de la biosynthèse pourrait compenser la diminution des quantités de dopamine synthétisées. Quant à la stimulation des récepteurs post-synaptiques, elle permettrait d'assurer la transmission neuronale défaillante.

2.3. Voies dopaminergiques centrales

Au sein du système nerveux, il existe trois grandes voies dopaminergiques centrales détaillées ci-dessous. Elles sont corrélées à diverses zones cérébrales contrôlant les fonctions motrices ou émotionnelles (**Figure 3**).

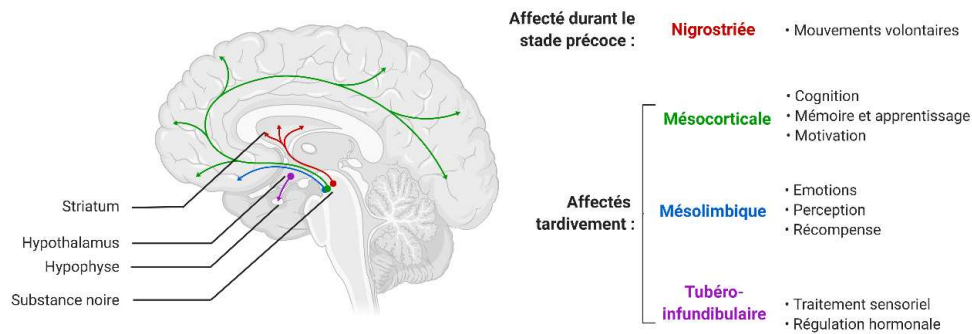


Figure 3 | Voie dopaminergique nigro-striatale et complications associées à sa dégénérescence.
Adapté de Derkinderen et al.¹⁰

- **La voie nigrostriée :** Cette voie part de la substance noire et s'étend vers le striatum pour libérer la dopamine *via* ses axones. Cette voie essentielle, qui regroupe 80% des neurones dopaminergiques, contrôle les fonctions motrices, c'est-à-dire les mouvements volontaires. C'est dans cette zone que l'on observe une neurodégénérescence au début de la maladie de Parkinson.
- **La voie tubéro-infundibulaire :** Cette voie est constituée de neurones ayant leurs corps cellulaires au niveau de l'hypothalamus et leurs axones vers l'hypophyse (une glande sécrétant de nombreuses hormones). Cette voie est essentielle pour la motivation du comportement et de la mémoire.

- **La voie méso-corticolimbique :** Les neurones de cette voie ont le corps cellulaire au niveau du mésencéphale et les axones allant à la fois vers le cortex frontal et vers le système limbique (hippocampe, amygdale). Cette voie est impliquée dans les émotions, l'anxiété, le plaisir et certaines fonctions cognitives comme l'intelligence ou la capacité d'apprentissage. Une altération de ces neurones est impliquée dans les psychoses et les addictions.

Bien que la voie nigrostriée soit la première impactée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques, les autres voies de la dopamine deviennent également dysfonctionnelles avec l'évolution de la maladie. La dopamine est donc une hormone indispensable dans les échanges neurologiques et le moindre dysfonctionnement se traduit par l'apparition de symptômes caractéristiques.

Dans la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques viennent donc à dégénérer et les échanges se retrouvent alors inhibés, impactant tout d'abord les fonctions motrices, puis les fonctions non motrices au cours du développement de la maladie.

3. Symptômes de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson débute donc par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. La dopamine étant une hormone impliquée dans les échanges nerveux, un déficit engendre des symptômes à plusieurs niveaux. Cependant, il est désormais établi que les symptômes de la maladie apparaissent tardivement ; les mécanismes sous-jacents pouvant débiter, une dizaine d'année avant le premier signe clinique¹². D'après l'Inserm, les symptômes apparaissent lorsque 50 à 70% des neurones dopaminergiques ont été détruits. Le syndrome parkinsonien est majoritairement caractérisé par une triade de symptômes moteurs, regroupé sous le nom de syndrome extrapyramidal. Cette triade regroupe : L'akinésie (associée à la bradykinésie), l'hypertonie et le tremblement^{13,14}.

¹² Postuma, R. B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oerthel, W., Ziemssen, T. *Mov. Disord.* **2012**, 27, 5, 617-626.

¹³ Pollak, P. *La maladie de Parkinson*. Eds. Odile Jacob : Paris, 2004.

¹⁴ Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B.R., Adler, C.H., and Günther Deuschl. *Mov. Disord.* **2015**, 30, 12, 1591- 1599.

- **L'akinésie et bradykinésie :** Il s'agit ici des symptômes les plus fréquents. L'akinésie, élément le plus typique, engendre une difficulté à initier le mouvement spontané tandis que la bradykinésie amène une lenteur à l'exécution du mouvement. Ces symptômes apparaissent dès le début de la maladie notamment lors de l'initiation de mouvements impliquant plusieurs membres ou une séquence gestuelle. L'akinésie est notamment responsable des difficultés à écrire et à articuler.
- **La rigidité :** ou raideur des mouvements, est une hypertonie musculaire amenant des douleurs. La posture traduit ce symptôme : le corps est vouté, crispé et présente une flexion du corps et de la tête dû à la rigidité des muscles fléchisseurs
- **Les tremblements :** Il s'agit du symptôme qui est collectivement associé à la maladie de Parkinson. Pourtant environ 20% des patients ne seront pas concernés par cette gêne. Le plus souvent, les tremblements parkinsoniens touchent un seul côté du corps (du côté le moins rigide), bien qu'ils puissent se généraliser aux deux côtés au bout de quelques années, tout en restant accentués du côté initial.

Cette triade prédominante varie d'un patient à l'autre et peut être diversement ressentie. De plus, ces symptômes peuvent évoluer vers un trouble de la posture, de la marche, engendrer des chutes ou encore une dysphagie. De nombreux symptômes non moteurs peuvent s'ajouter impactant la vie des malades et conduisant à leur dépendance. Le plus fréquemment, une fatigue est ressentie dès le début de la maladie et handicape la vie courante. Des symptômes gastro-intestinaux, des troubles du sommeil et des troubles intellectuels (de la mémoire principalement) sont communément recensés. Des troubles psychiatriques (dépression, anxiété...), des douleurs peuvent également apparaître au cours du développement de la maladie, bien que leur fréquence soit difficile à établir. Plus rarement, des troubles urinaires, sexuels, de l'odorat, des troubles visuels, voire une démence peuvent compléter les symptômes principaux.

Les symptômes moteurs ont pour origine l'altération des neurones dopaminergiques. La diminution des taux de dopamine induit une augmentation des taux d'adénosine, de glutamate. L'excès de ces neurotransmetteurs ralentit les processus physiologiques au niveau du cortex moteur, participant aux symptômes de rigidité et d'akinésie. Conjointement, il est observé une altération des neurones non dopaminergiques, impactant les voies de neurotransmetteurs tels l'acétylcholine, la noradrénaline, la sérotonine... Une dégradation de ces voies induit, en association avec la diminution de la dopamine, les symptômes non moteurs.

Au vu de l'évolution de la maladie et de la dégénérescence des neurones dans le temps, il est dès lors possible de mettre en exergue plusieurs stades d'évolution de la maladie¹⁵. L'évolution se fait lentement, de signes annonciateurs à la phase tardive et aux symptômes touchant l'axe du corps, comme détaillé en **Tableau 2**¹⁶. Les signes annonciateurs seuls ne permettent cependant pas de diagnostiquer la maladie.

Tableau 2 | Evolution des stades cliniques et des symptômes associés.

Stade d'évolution	Symptômes
Stade 1	Signes annonciateurs : Perte d'odorat, constipation Trouble du sommeil paradoxal
Stade 2	Evolution : Bradykinésie Rigidité Tremblements au repos
Stade 3	« Phase de lune de miel » : Équilibre thérapeutique durant lequel les symptômes n'impactent plus la vie du patient
Stade 4	Phase d'échappement thérapeutique : Fluctuations motrices Dyskinésie Hypotension orthostatique
Stade 5	Phase tardive : Symptômes axiaux Démence Chutes

II. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

De nombreux mécanismes physiopathologiques sont impliqués dans la maladie de Parkinson. Le processus de développement de la maladie n'est pas encore complètement élucidé, mais certains dysfonctionnements à ce jour admis sont décrits dans les paragraphes suivants. En particulier, nous évoquerons successivement chacun de ces acteurs que sont le lysosome, organe cellulaire au rôle crucial, l' α -synucléine, protéine essentielle, ainsi que les

¹⁵ Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2011**, 70, 11, 960–969.

¹⁶ Lang, A. E., Lozano, A. M. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339, 1044-1053.

processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués : le système ubiquitine protéasome et l'autophagie en particulier.

1. Altération des processus de dégradation

Dans les maladies neurodégénératives, une mauvaise configuration protéique et un dysfonctionnement des processus de dégradation associés sont particulièrement retrouvés. Un arrêt du processus autophagique conduit dans la maladie de Parkinson, comme dans la maladie d'Alzheimer, à l'accumulation de protéines non dégradées menant à leur accumulation au sein du neurone, à leur propagation de cellules à cellules¹⁷, mais également à une accumulation des mitochondries dysfonctionnelles¹⁸. Pour la maladie de Parkinson, l' α -synucléine est la protéine en cause.

La physiologie cellulaire implique une organisation précise. Les protéines adoptent une structure tridimensionnelle spécifique pour assurer leurs rôles intracellulaires. Si le rôle protéique n'est plus assuré, la protéine doit être dégradée et recyclée. De cette façon, afin d'assurer un taux raisonnable et non toxique, plusieurs systèmes complémentaires assurent la dégradation et donc la régulation de la protéine¹⁹ : le système ubiquitine protéasome (UPS) et le système de l'autophagie. De manière générale, ce système prend en charge la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires, et le système autophagique, recycle les protéines extracellulaires ainsi que les complexes protéiques et les organites.

1.1. Le système ubiquitine protéasome

Le système ubiquitine protéasome (UPS) joue un rôle central dans les processus de dégradation²⁰. Une partie des protéines est dégradée par cette voie, rendant l'UPS primordial pour la régulation de l'homéostasie protéique. Tout d'abord, un marquage de la protéine à dégrader est effectué par la liaison covalente avec des chaînes d'ubiquitines (l'ubiquitination). Ce marquage permet la reconnaissance par le protéasome et la dégradation de la protéine ainsi marquée (**Figure 4**). La paralysie de cette voie de dégradation, conduit à l'agrégation de l' α -

¹⁷ Minakaki, G., Menges, S., Kittel, A., Emmanouilidou, E. et al. *Autophagy*. **2018**, 14, 1, 98-119.

¹⁸ Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., Okamoto, K. *EMBO J*. **2021**, 40.

¹⁹ Martinez-Vicente, M., Vila, M. *Exp Neurol*. **2013**, 247, 308–313.

²⁰ Lecker, S. H., Goldberg, A. L., Mitch, W. E. *J. Am. Soc. Nephrol*. **2006**, 17, 1807-1819.

synucléine²¹. Par ailleurs, le mauvais repliement de l' α -synucléine conduit également au dysfonctionnement de l'UPS, entretenant dès lors le cycle pathologique.

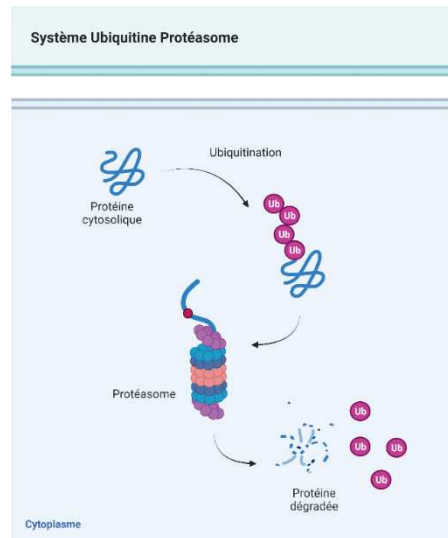


Figure 4 | Processus de dégradation intracellulaire impliquant le protéasome.

1.2. Les mécanismes d'autophagie

Il existe différents mécanismes d'autophagie par les lysosomes, détaillés ci-dessous (**Figure 5**). Les lysosomes sont des organites cellulaires cytoplasmiques contenant des enzymes de dégradation. Ils peuvent digérer tous les composants cellulaires (acides nucléiques, sucres, protéines, lipides, mitochondries...). Les macromolécules biologiques y sont apportées, par macroautophagie, autophagie médiée par les protéines chaperons et microautophagie, afin d'y être recyclées.

- **La macroautophagie** aussi appelée autophagie, implique la formation d'une vacuole d'autophagie (aussi appelée autophagosome), c'est-à-dire une structure cytoplasmique entourée d'une membrane. En se formant, ces vacuoles qui contiennent souvent des organites cellulaires, emprisonnent les éléments à dégrader. La dégradation non spécifique de son contenu nécessite la fusion de

²¹ Xie, W., Li, X., Li, C., Zhu, W., Jankovic, J., Le, W. *J. Neurochem.* **2010**, 115, 188-199.

l'autophagosome formé avec le lysosome²² (complexe appelé autolysosome). Du fait de la non-sélectivité de l'encapsulation, la macroautophagie est le processus principal de dégradation protéique intracytoplasmique.

- **La microautophagie**, par opposition à la macroautophagie, est également un processus de dégradation non sélectif. Dans ce mécanisme, les composants extracellulaires sont internalisés par la formation d'une invagination de la membrane cellulaire²³. La vésicule ainsi formée, les constituants peuvent être acheminés vers le lysosome pour être dégradés. De cette façon, l' α -synucléine liée aux membranes lipidiques peut être dégradée au sein du lysosome²⁴.
- **L'autophagie médiée par les protéines chaperons (CMA)**, est une voie de dégradation sélective²⁵. Elle nécessite, au niveau cytoplasmique, une reconnaissance de séquence par une protéine chaperonne cytosolique (hsc70). La protéine reconnue est alors acheminée jusqu'au lysosome où elle sera dégradée. Au cours de la maladie de Parkinson, l' α -synucléine est retrouvée mutée, altérée ce qui bloque le processus de CMA au sein du lysosome favorisant l'accumulation protéique.

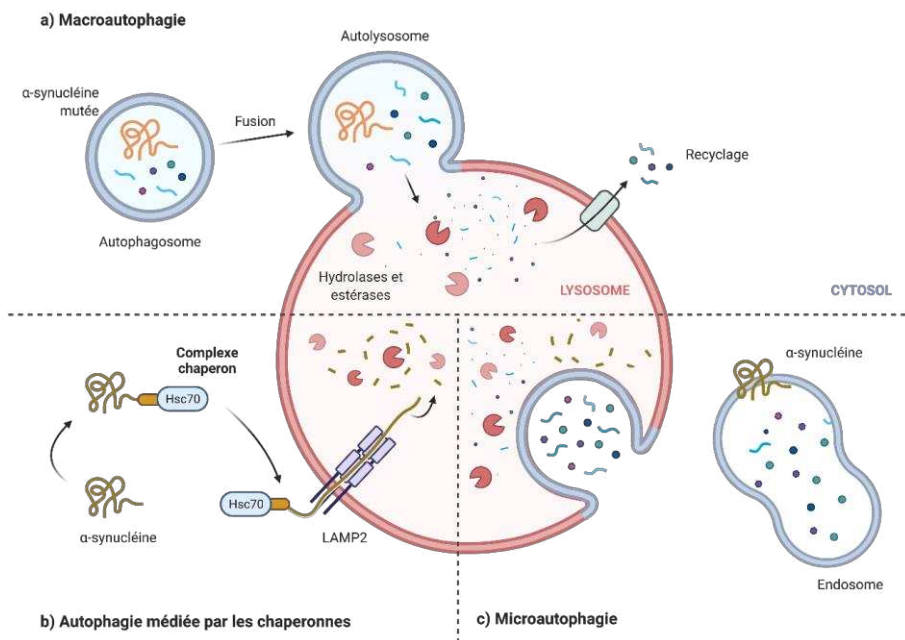


Figure 5 | Voies de dégradation intracellulaire par les lysosomes. Exemple avec l' α -synucléine. Adapté de Martinez-Vicente et col.¹⁹

²² Winslow, A. R., Cheng, C-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena A., Gordon, D. E., Peden, A. A., Lichtenberg, M., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Brown, S., O’Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. *J. Cell Biol.* **2010**, 190, 6, 1023-1037.

²³ Huotari, J., Helenius, A. *EMBO J.* **2011**, 30, 17, 3481-3500.

²⁴ Tofaris, G. K., Kim, H. T., Houriez, R., Jung, J-W., Kim, K. P., Goldberg, A. L. *PNAS.* **2011**, 108, 41, 17004-17009.

²⁵ Cuervo, A. M., Wong, E. *Cell. Res.* **2014**, 24, 1, 92-104.

Les processus de dégradation intracellulaires sont fondamentaux pour assurer entre autres le recyclage des protéines dysfonctionnelles, ou altérées. Dans le cas des maladies neurodégénératives, il s'avère que la dégradation de certaines protéines n'est plus optimale et ceci est notamment lié à un dysfonctionnement du lysosome. Nous tenterons d'en expliciter les raisons dans le paragraphe suivant.

2. Le lysosome

Les lysosomes sont des organites cellulaires acides ayant un pH physiologique compris entre 3.5 et 5. Indispensables au bon fonctionnement cellulaire, ils interviennent notamment dans la dégradation des composants intracellulaires non fonctionnels, comme les organelles endommagées, les lipides, les protéines mal repliées ou accumulées. Ils contiennent plus de 60 hydrolases²⁶ responsables de la clairance des protéines à durée de vie longue. Le pH acide de ces vésicules est crucial pour médier l'action de dégradation des enzymes protéolytiques.

Dans la maladie de Parkinson, les lysosomes jouent un rôle central²⁷. Chez un modèle de souris, ainsi que sur des cellules humaines et du tissu *post-mortem* de patients malades, une diminution du nombre de lysosomes a été mise en évidence par l'étude du taux de Lamp1 (une protéine membranaire associée aux lysosomes). Conjointement, une diminution de la clairance des autophagosomes ainsi qu'une augmentation de la mort des cellules neuronales dopaminergiques ont été observées. Ces éléments semblent donc interconnectés. Un déficit en lysosome entraîne inévitablement un déficit de la clairance. Par ailleurs, la nouvelle perméabilité membranaire des lysosomes entraîne une sortie des composants (comme les cathepsines B et D, protéases essentielles à la fonction lysosomale) du lumen de l'organite vers le cytosol de la cellule, phénomènes reliés à la mort cellulaire.

Une variation de l'acidité du pH lysosomal entraîne inévitablement un déficit de l'action des hydrolases et donc du retraitement des composants intracellulaires, qui ne sont plus pris en charge dans le cas de la maladie de Parkinson. L'altération du pH lysosomal des cellules neuronales dopaminergiques entraîne l'accumulation de protéines mal repliées, notamment

²⁶ Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., and Ballabio, A. *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.* **2013**, 14, 283–296.

²⁷ Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. *J. Neurosci.* **2010**, 30,37, 12535–12544.

l'accumulation de l' α -synucléine. Le déficit de sa clairance participe et favorise à son agrégation en oligomères, puis sous forme de fibres. Les dépôts ainsi formés au sein des cellules neuronales, constituent les corps de Lewy toxiques. Cette toxicité mène à la mort cellulaire et donc à la neurodégénérescence (**Figure 6**).

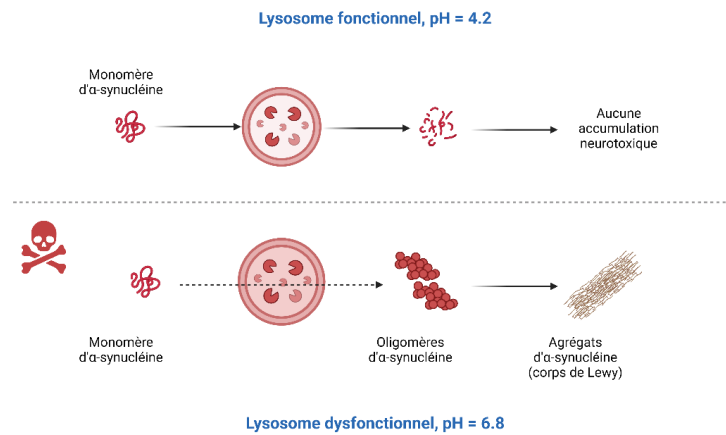


Figure 6 | Agrégation toxique protéique due à une altération du pH lysosomal. Exemple de d' α -synucléine.

3. L' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine abondante et ubiquitaire, majoritairement retrouvée au niveau cérébral, aussi bien dans le milieu intracellulaire, qu'extracellulaire. Bien que son rôle précis ne soit pas élucidé, son implication dans le processus du développement de la maladie est aujourd'hui reconnue. Elle semble être impliquée majoritairement dans la transmission neuronale et dans la régulation des niveaux de dopamine et son accumulation toxique mène à la dégénérescence des neurones dopaminergiques²⁸. Injectée en petite quantité à des souris et des singes, cette protéine déclenche la pathologie, prouvant qu'elle a un lien avec la maladie. Les lésions engendrées sont alors susceptibles de se transmettre de cellule en cellule entre les régions interconnectées du cerveau²⁹. De plus, lorsque la maladie se répète au sein d'une même famille, il a été mis en évidence que le gène muté commun est celui correspondant au génome de la protéine.

²⁸ Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., Fariñas, I., Obeso, J.A., Bezard, E., and Vila, M. *Ann Neurol.* **2014**, 75, 3, 351–362.

²⁹ Kim, W. S., Kagedal, K., and Halliday, G. M. *Alzheimer's Res Ther.* **2014**, 6, 1, 1–9.

Indispensable au bon fonctionnement cérébral, elle peut néanmoins devenir conflictuelle lorsqu'elle est retrouvée en quantité trop importante. Sa surabondance peut être expliquée par une inhibition de sa clairance. En effet, si son abondance est supérieure à la normale (ce que l'on observe dans l'affection de Parkinson), son agrégation va être favorisée sous forme d'oligomères, pour former ensuite des fibres insolubles formant les corps de Lewy, amas protéiques toxiques^{30,31}. Les corps de Lewy sont des structures sphériques de 5 à 25 µm, découvert au niveau cérébral.

Les mutations génétiques relevées apparaissent toutes dans la région du gène influant sur les affinités et les interactions de cette protéine pour les membranes et conduisent à la traduction d'une protéine dysfonctionnelle. La modification d'un seul résidu sur les 140 de la séquence génétique peut entraîner une anomalie dans les propriétés de la protéine³². Tandis que certaines de ces mutations conduisent à une augmentation de la vitesse d'agrégation de l' α -synucléine, d'autres semblent la ralentir. Dans la maladie de Parkinson, celles qui sont impliquées augmentent la cinétique d'agrégation. Elles ont pour effet l'accumulation de la protéine conduisant à sa toxicité.

L' α -synucléine mutée présente dès lors une altération de sa clairance : seule la macroautophagie est capable de la dégrader. De plus, sous sa forme altérée, la protéine impacte le processus AMC, l'inhibant et favorisant l'accumulation protéique^{33,34}. Le mauvais repliement de l' α -synucléine conduit également au dysfonctionnement de l'UPS³⁵. En sus de l'augmentation de la cinétique d'agrégation, l'augmentation du pH lysosomal inhibe l'action des enzymes de dégradation. Le processus d'oligomérisation n'est alors plus contrôlé, ce qui mène au dysfonctionnement cellulaire. Le défaut de régulation de l'homéostasie protéique impacte dès lors la santé cellulaire et la viabilité neuronale³⁶. Par ailleurs, la variabilité des

³⁰ Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M. *Nature*. **1997**, 388, 839-840.

³¹ Wong, Y. C., and Krainc, D. *Nat Med*. **2017**, 23, 2, 1–13.

³² Flagmeier, P., Meisl, G., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., Buell, A. K., and Galvagnion, C. *PNAS*. **2016**, 113, 37, 10328–10333.

³³ Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., Sulzer, D. *Science*. **2004**, 305, 5688, 1292-1295.

³⁴ Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., et al. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 2, 777-788.

³⁵ McKinnon, C., De Snoo, M. L., Gondard, E., Neudorfer, C., Chau, H., Ngana, S. G., O'Hara, D. M., Brotchie, J. M., Koprach, J. B., Lozano, A. M., Kalia, L. V., Kalia, S. K. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, 8, 17.

³⁶ Taylor, R. C., Berendzen, K. M., Dillin, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15, 3, 211-217.

agrégats possibles selon le repliement de la protéine expliquerait les différences cliniques observées.

4. Dysfonctionnements parallèles associés

Plusieurs processus dysfonctionnels, en plus de l'inhibition de la clairance de l' α -synucléine, ont été mis en évidence au sein des cellules neuronales parkinsoniennes. Intimement reliés, ils découlent les uns des autres et s'auto-entretiennent (**Figure 7**). De plus, le mauvais fonctionnement cellulaire conduit également à une atteinte du neurone voisin. Les processus altérés sont énumérés ici :

- **Dysfonction mitochondriale**³⁷. Elle est due à divers facteurs, dont l'agrégation de l' α -synucléine et des mutations génétiques³⁸. En effet, en se liant aux membranes des mitochondries, les amas protéiques conduisent à la destruction de ces organites intracellulaires³⁹. Une atteinte du fonctionnement mitochondrial contribue très probablement à la vulnérabilité accrue des neurones dopaminergiques. Les mitochondries sont des organites intracellulaires indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Elles produisent l'énergie cellulaire, l'ATP en entraînant la libération de radicaux libres. Dans la maladie de Parkinson, il est observé une augmentation de la production des radicaux libres et une diminution de la production d'énergie. Les radicaux libres, issus de processus pathologiques et biologiques, infligent de graves dommages aux éléments cellulaires⁴⁰. Le déséquilibre des voies du métabolisme énergétique, de la régulation des canaux calciques, et de la régulation de la mort cellulaire, peut par ailleurs expliquer la forte activité oxydative au sein des neurones dopaminergiques.
- **Accroissement du stress oxydant**, résultant de la dysfonction mitochondriale. L'augmentation de la production de radicaux libres, par les mitochondries engendre un déséquilibre toxique pour les cellules neuronales, et principalement des neurones dopaminergiques de la substance noire qui présentent un faible pouvoir anti-oxydant en

³⁷ Winklhofer, K. E., Haas, C. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, 1802, 29-44.

³⁸ Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., ... *Science.* **2004**, 304, 1158-1160.

³⁹ Hannestad, J. K., Rocha, S., Agnarsson, B., Zhdanov, V. P., Wittung-Stafshede, P., Höök, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2020**, 117, 25, 14178-14186.

⁴⁰ Zhou, C., Huang, Y., Przedborski, S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, 1147, 93-104.

plus d'une activité respiratoire intense. De plus, le métabolisme de la dopamine libère une grande quantité de radicaux libres. De cette façon, dans le cadre de la maladie de Parkinson, le stress oxydant peut engendrer une défaillance du système de l'autophagie et une déficience de la fonction lysosomale⁴¹.

- **Stress du réticulum endoplasmique**⁴². Résultant de la non-élimination des protéines mal repliées, un stress sévère du réticulum endoplasmique contribue à un effet cellulaire délétère : apoptose et mort cellulaire.
- **Neuroinflammation**⁴³. Observée chez les patients atteints par la maladie, elle est soupçonnée d'accentuer le processus pathologique de l'affection. Son implication dans le processus pathologique n'est cependant pas déterminée. Qu'elle soit la cause des défaillances recensées ou bien une des conséquences, il est admis qu'elle participe à la neurodégénérescence.
- **Dysfonction du transport axonal**⁴⁴. Une insuffisance d'énergie (en raison de la dysfonction mitochondriale) et la présence d'agrégats protéiques conduisent à une entrave du flux axoplasmique et à un mauvais transport macromoléculaire neuronal. Cependant, il n'est pas clairement établi si le défaut de transport axonal est une conséquence de la neurodégénérescence ou bien une cause de la déstabilisation de l'homéostasie neuronale⁴⁵.

⁴¹ Audano, M., Schneider, A., Mitro, N. *J. Neurochem.* **2018**, 147, 291-309.

⁴² Zeng, X-S., Geng, W-S., Jia, J-J., Chen, L., Zhang, P-P. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, 10, 109.

⁴³ Caggiu, E., Arru, G., Hosseini, S., Niegowska, M., Sechi, G., Zarbo, I. R., Sechi, L. A. *Front. Neurol.* **2019**, 10, 122.

⁴⁴ Morfini, G.A., Burns, M., Binder, L. I., Kanaan, N. M., LaPointe, N., Bosco, D. A., Brown Jr, R. H., Brown, H., Tiwari, A., Hayward, L., Edgar, J., Nave, K-A., Garberrn, J., Atagi, Y., Song, Y., Pigino, G., Brady, S. T. *J. Neurosci.* **2009**, 29, 41, 12776-12786.

⁴⁵ Sleigh, J. N., Rossor, A. M., Fellows, A. D., Tosolini, A. P., Schiavo, G. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, 15, 691-703.

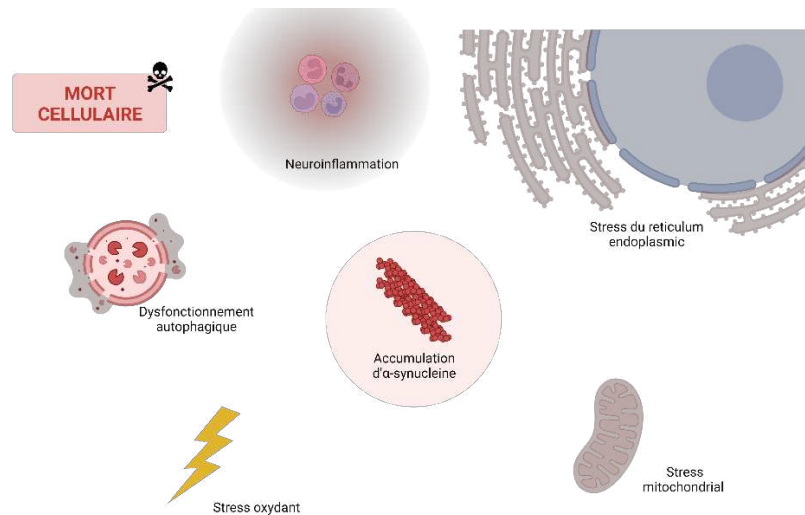


Figure 7 | Principaux mécanismes dysfonctionnels au sein d'une cellule neuronale parkinsonienne.

Tous les mécanismes décrits ci-dessus sont intimement liés et s'auto-entretiennent, rendant difficile l'élucidation de la chronologie précise de la propagation de la maladie de Parkinson. L'agrégation protéique et plus particulièrement celle de l' α -synucléine est un point commun ce qui fait de l'inhibition de la propagation protéique une cible thérapeutique de choix.

III. Approches thérapeutiques

1. Traitements symptomatiques pour la maladie de Parkinson

À ce jour il n'existe aucun traitement curatif de la maladie de Parkinson en raison de nombreux freins à leur développement. Ces difficultés seront discutées plus loin. Les molécules commercialisées ont un effet uniquement symptomatique, c'est-à-dire qu'elles n'ont aucun effet sur le développement de la maladie qui se poursuivra malgré tout de manière sous-jacente. Le but de ces traitements est de contrer le déficit en dopamine au niveau neuronal, afin de soulager les symptômes, dans un souci d'amélioration du confort de la vie personnelle et sociale des malades. La stratégie principale repose sur la stimulation de la synthèse en dopamine pour contrebalancer la diminution des échanges au niveau synaptique, et pallier la perte des récepteurs dopaminergiques. La seconde approche consiste à inhiber des enzymes responsables de la dégradation de la dopamine pour ainsi conserver une concentration suffisante de neurotransmetteur.

1.1. Les traitements de première intention

- La dopathérapie

Le traitement de choix depuis les années 1970 est l'administration par voie orale de L-DOPA⁴⁶. L'apport de L-DOPA, bioprécurseur de la dopamine capable de passer la barrière hémato-encéphalique (contrairement à la dopamine) permet la délivrance du neurotransmetteur à son site d'action cérébral. Au niveau cérébral la L-DOPA est décarboxylée en dopamine sous l'action de la DOPA décarboxylase. La décarboxylation de la L-DOPA peut également avoir lieu en périphérie, en raison de la présence des enzymes de synthèse. Si la dopathérapie est administrée seule, il y aura donc une transformation rapide en périphérie engendrant une perte massive d'effet thérapeutique et une hausse considérable des effets secondaires périphériques : vomissements et nausées liés à la stimulation de *l'aera postrema*. Pour cette raison la L-DOPA n'est jamais administrée seule mais en association avec un inhibiteur de DOPA décarboxylase (**Figure 8**). Ces molécules (comme la carbidopa ou la bensérazide) ne traversent pas la BHE et agissent ainsi uniquement en périphérie de manière à inhiber les effets secondaires. Il est également possible d'associer à la dopathérapie, un inhibiteur de la COMT afin d'obtenir un effet synergique à l'apport de L-DOPA.

Ce traitement réduit considérablement les troubles moteurs dû à la maladie tout en engendrant un minimum d'effets secondaires. L'équilibre thérapeutique trouvé correspond à la phase de lune de miel de la pathologie.

⁴⁶ Olanow, C.W.O. *Mov. Disord.* **2019**, 34, 6, 812-815.

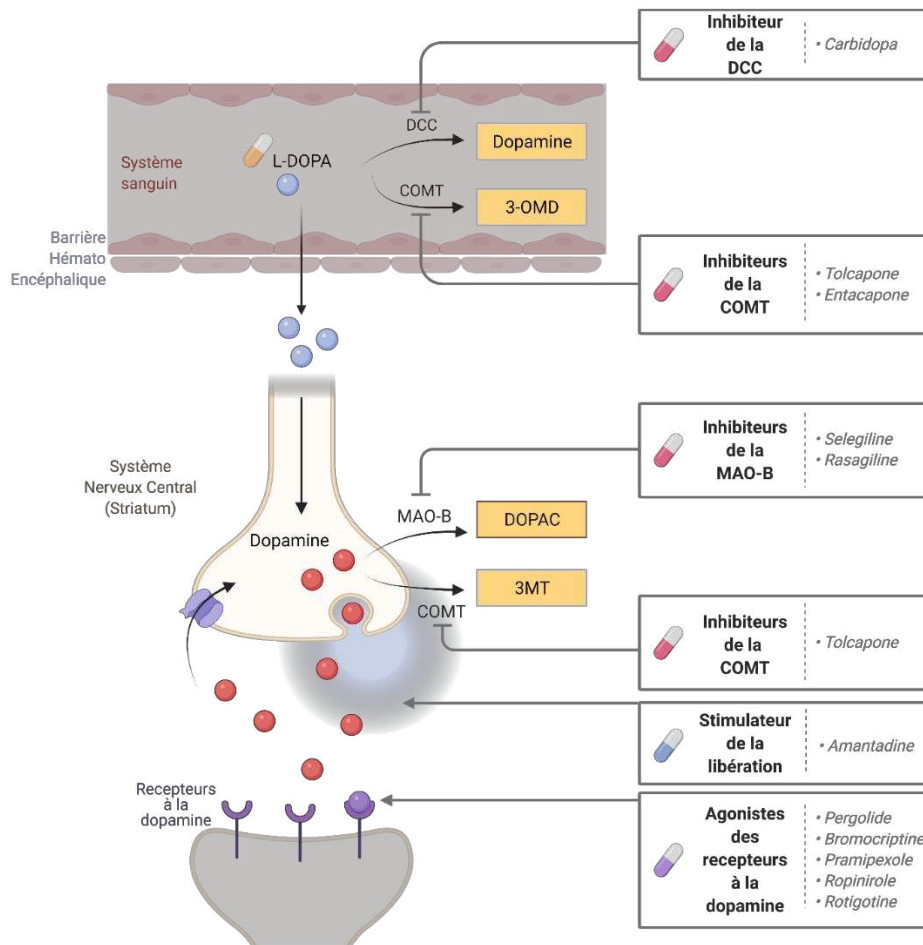


Figure 8 | Mécanismes des approches visant à réguler les symptômes dû au déficit dopaminergique dans la maladie de Parkinson. Adapté d'Aminoff⁴⁷

- Les inhibiteurs enzymatiques

Des inhibiteurs enzymatiques peuvent donc être associés à la dopathérapie, afin d'en améliorer les effets thérapeutiques, en inhibant les enzymes de dégradation de la L-Dopa. Quelques structures chimiques sont présentées en **Figure 9**. Trois classes d'inhibiteurs sont capables de franchir la BHE : les I-MAO-B, les I-COMT et un inhibiteur de la DCC. Les I-MAO-B ont pour effet d'empêcher sélectivement le fonctionnement de la MonoAmine Oxidase B en modifiant le site actif de l'enzyme et inhibant ainsi le complexe enzyme-dopamine. Par conséquent la dégradation centrale de la dopamine est réduite. Cette classe thérapeutique peut être envisagée comme traitement chez les patients présentant une maladie peu accentuée. Il

⁴⁷ Aminoff, M. J. Pharmacologic Management of Parkinsonism and Other Movement Disorders. In *Basic and Clinical Pharmacology*, 14th ed; Katzung BG. Eds, 2022.

s'agit de la sélégiline et la rasagiline, des amines propargyliques. Les I-COMT, eux, inhibent la dégradation de la L-Dopa en bloquant de manière sélective la Catéchol-O-MéthylTransférase⁴⁸. Ce sont des inhibiteurs compétitifs qui se fixent sur le site actif de l'enzyme de dégradation. Les molécules utilisées sont la tolcapone et l'entacapone, dont les structures chimiques sont apparentées à celle de la dopamine dont elles possèdent le noyau catéchol. Cependant ce traitement n'a aucun intérêt administré seul. L'I-DCC inhibe de la même façon l'interaction de l'enzyme avec la L-Dopa.

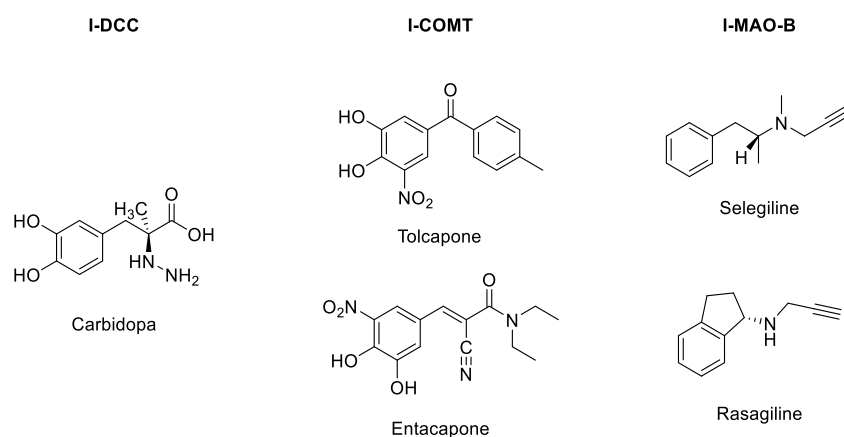


Figure 9 | Structures chimiques d'inhibiteurs enzymatiques.

- Les agonistes dopaminergiques

Il existe au niveau neuronal divers récepteurs à la dopamine (D₁-like, D₂-like). Ils représentent 5 sous-types, divisés en 2 classes. Une fois activés, ces récepteurs se couplent à des protéines hétérotrimériques, les protéines G, capables de lier le GTP (Guanosine TriPhosphate) et induisent les effets moteurs. Les traitements visant à stimuler ces récepteurs sont principalement spécifiques des D₂-like en raison d'un moins grand nombre d'effets indésirables comparé aux récepteurs D₁-like. La pergolide, la ropinirole et la rotigotine sont des agonistes des récepteurs à la dopamine (**Figure 10**), c'est-à-dire que ces molécules imitent l'action physiologique de la dopamine en interagissant avec ses récepteurs.

⁴⁸ Entacapone to Tolcapone switch study group. Entacapone totolcapone switch: multicenter double-blind, randomized, active-controlled trial in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord.* **2007**, 22, 14-19.

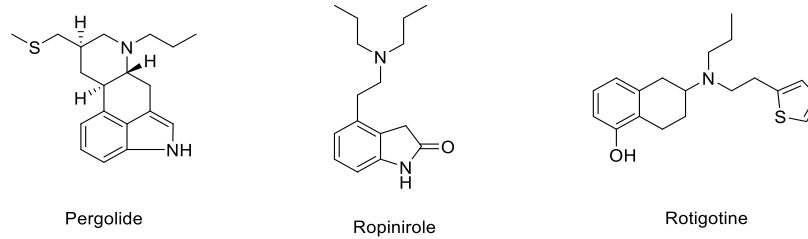


Figure 10 | Structures chimiques d'agonistes dopaminergiques.

- Les anticholinergiques

Si les niveaux de dopamine sont insuffisants, ceux de l'acétylcholine sont trop élevés. Des molécules anticholinergiques peuvent être mises en place afin de compenser ses effets délétères. Elles sont majoritairement utilisées lorsque les tremblements sont au premier plan des symptômes de la maladie. Cependant les anticholinergiques induisent de nombreux effets secondaires. Ils sont donc utilisés uniquement chez les patients jeunes.

- Effets indésirables et évolution de la maladie

L'apport de dopamine, issue des traitements, n'est pas spécifique des aires atteintes par la maladie. Les neurones sains sont donc soumis à une augmentation des transmissions dopaminergiques, ce qui engendre inévitablement des effets indésirables à plus ou moins long terme et pour tous les traitements évoqués. Parmi ces effets, les nausées et vomissements précédemment évoqués peuvent être prévenus. L'apparition de délires et hallucinations, de comportements hédoniques (jeu, achat, nourriture), d'hypotension et donc de chutes, de somnolences et de dyskinésies (mouvements involontaires) sont également observés.

Le traitement le plus courant de Dopa-thérapie présente des limites importantes. Quelques années après l'instauration du traitement, les effets bénéfiques tendent à diminuer et les symptômes à réapparaître. Des fluctuations apparaissent alors dans l'état du patient, ce qui nécessite un ajustement thérapeutique. Le traitement n'étant que symptomatique, la maladie poursuit son développement augmentant le seuil d'effet de la dopa-thérapie et nécessitant une augmentation de l'apport de L-DOPA.

1.2. Les traitements plus invasifs de deuxième intention

Lorsque la dopa-thérapie n'est plus suffisante pour pallier les symptômes de la maladie, deux autres approches sont possibles. Tout d'abord, quand les dyskinésies réapparaissent, une

pompe Duodopa peut être installée permettant l'administration continue de L-Dopa et de carbidopa. Ceci se fait par gastrostomie, l'implantation d'un dispositif externe relié au niveau intestinal par un orifice au niveau de l'estomac.

La seconde approche, invasive, est envisagée lors de l'apparition de complications motrices chez le patient. Il s'agit d'une stimulation cérébrale profonde délivrant un courant électrique par l'intermédiaire de deux électrodes implantées par stéréotaxie, au niveau des noyaux subthalamiques, au-dessus de la *substantia nigra*. Positionnées des deux côtés du crâne, les électrodes sont reliées à l'émetteur, situé dans la région sous-claviculaire, par des fils sous-cutanés. La stimulation électrique permet alors d'activer les cellules nerveuses et de remédier au déficit de dopamine tout en amoindrissant les symptômes.

1.3. Traitements complémentaires

En complément des traitements palliant les niveaux de dopamine, des traitements d'appoint patient-dépendant sont utilisés pour alléger les symptômes non moteurs développés. Afin d'améliorer le confort de vie des patients de la rééducation peut être mise en place, ainsi que de l'orthophonie.

Bien que ces diverses stratégies améliorent la vie des patients, elles ne limitent pas la progression de la maladie. Afin de développer des traitements thérapeutiques efficaces, il est essentiel de cibler les dysfonctionnements cellulaires et moléculaires qui surviennent dans la progression de la maladie.

2. Approches thérapeutiques en recherche

2.1. Intérêt en recherche clinique

La découverte et une meilleure connaissance des dysfonctionnements impliqués dans la maladie de Parkinson améliore le panel de cibles thérapeutiques. Les stratégies ne visent plus uniquement un effet symptomatique mais visent à traiter un dysfonctionnement. La volonté est d'avoir un effet sur le développement et l'évolution de la maladie elle-même et donc avoir un effet thérapeutique. La cause première du développement de la maladie n'étant pas assurée, les recherches portent à ce jour sur tous les mécanismes impliqués. Les essais cliniques en cours

traduisent cette variété^{49,50}, en visant aussi bien le traitement des symptômes de la maladie, qu'en cherchant à impacter l'évolution de la pathologie.

Des essais portent sur des agonistes aux récepteurs de la dopamine, des molécules ciblant les agrégations de l' α -synucléine, des modulateurs des récepteurs NMDA (récepteurs au glutamate), des molécules anti-oxydants, anti-apoptotiques, des inhibiteurs de kinases, de la recapture de la monoamine, ou encore des thérapies cellulaires et génétiques. Ces dernières années, la majorité des essais cliniques avancés porte toujours sur des thérapies symptomatiques (aux alentours de 60% des essais cliniques recensés) et repose principalement sur une utilisation majeure de petites molécules, au détriment de l'élaboration de thérapies géniques ou de l'usage d'anticorps.

Actuellement, 172 essais cliniques (d'après ClinicalTrials.gov) sont en cours de recrutement, bientôt en cours de recrutement ou bien actifs. Ils sont répartis entre la phase 1, la phase 2 et la phase 3. La phase 1 cherche à évaluer la toxicité de la molécule étudiée, ainsi que sa cinétique d'élimination. La phase 2 vise à établir l'efficacité de la molécule, c'est-à-dire la dose minimale efficace et à déterminer la tolérance. La phase 3, évalue l'intérêt thérapeutique du médicament.

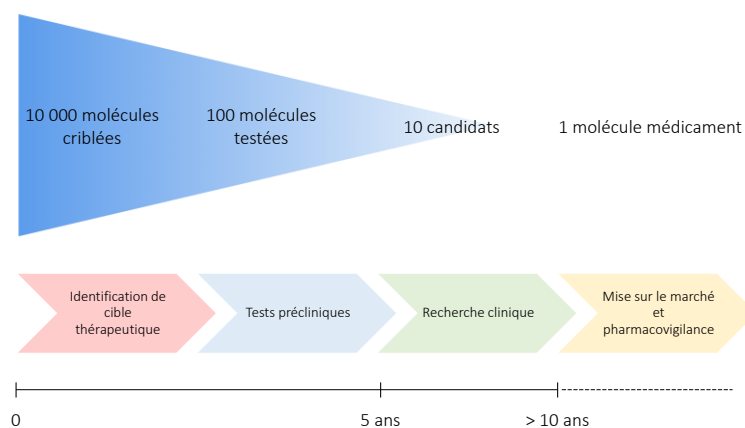


Figure 11 | Cycle de vie du médicament.

⁴⁹ Prasad, E. M., Hung, S-Y. *Pharmaceuticals*. 2021, 14, 717.

⁵⁰ McFarthing, K., Rafaloff, G., Baptista, M. A.S., Wyse, R. K., Stott, S. R. W. *J. Parkinsons Dis*. 2021, 11, 891-903

Tout comme pour la maladie d'Alzheimer, la majorité des essais cliniques sont en phase 2, mais une grande majorité ne parviennent pas en phase 3 (**Tableau 3**). En dépit du nombre important d'essais cliniques menés, à ce jour, aucun traitement à effet antiparkinsonien n'a été commercialisé. Cela peut s'expliquer en raison d'une cible thérapeutique potentiellement inadéquate ; mais également en raison de la difficulté de véhiculer les composés développés jusqu'au niveau du système nerveux central et plus précisément des neurones visés.

Tableau 3 | Répartition des essais cliniques portant sur la maladie de Parkinson, de 2020 à 2022.

Répartition des essais cliniques											
Phase 1			Phase 2			Phase 3			Total		
2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022
51	49	66	66	65	104	28	28	32	145	142	172
35%	35%	38%	46%	46%	60%	19%	20%	19%	100%	100%	100%

2.2. Effort de la recherche fondamentale

Un frein considérable au développement de stratégies thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives est un problème d'accès de la substance active jusqu'à la cible, c'est-à-dire le cerveau. En effet celui-ci est protégé par une barrière physiologique entre la circulation sanguine et le système nerveux central : la barrière hémato-encéphalique⁵¹. De nombreuses approches thérapeutiques sont néanmoins étudiées et la recherche fondamentale vise à développer des stratégies variées⁵². Les nombreux dysfonctionnements peuvent être autant de cibles thérapeutiques. La maîtrise des taux d' α -synucléine est tout de même l'élément central et un grand nombre de projets se focalise sur sa régulation. Les approches portent sur le développement de molécules ambitionnant de stimuler la dégradation protéique, ou bien d'inhiber sa synthèse. Une approche par l'injection d'anticorps (PRX002) est également en développement. Autrement, le vaccin PD01A consiste à l'injection en sous-cutanée de fragments d' α -synucléine de sorte à engendrer le développement d'anticorps. Bien que cette protéine paraisse être un élément clef du développement pathologique, la recherche se penche aussi sur la thérapie génique, les stratégies permettant de combattre la neuro-inflammation, la

⁵¹ Mahringer, A., Ott, M., Fricker, G. The Blood-Brain Barrier; An Introduction to Its Structure and Function. In *The Blood Brain Barrier (BBB)*, Fricker, G., Ott, M., Mahringer, A., Eds. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014; 1-20.

⁵² Ntetsika, T., Papatoma, P-E., Markaki, I. *Mol. Med.* **2021**, *27*, 17.

Chapitre I

réduction du stress-oxydatif, la stimulation de l'autophagie ou de la fonction mitochondriale par exemple.

2. La Barrière Hémato-Encéphalique : une barrière physique et métabolique du système nerveux central

I. Mise en évidence de la Barrière Hémato Encéphalique

La barrière hémato-encéphalique a été mise en évidence au début des années 1900. Son rôle est de protéger le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des anticorps et peut être assimilée à un filtre très sélectif. En 1885, Paul Ehrlich a observé que l'injection systémique de colorants chez des animaux entraînait une coloration de tous les organes à l'exception du tissu cérébral. Postulant tout d'abord que les colorants n'étaient pas affins du SNC, il fut contredit quelques années plus tard par les travaux de Biedl et Kraus, Lewandowsky, et Goldmann. Tout d'abord Biedl, Kraus et Lewandowsky ont supposé l'existence d'une barrière en observant que l'injection intraveineuse de ferrocyanure de sodium et d'acide cholique n'aboutissait à aucun effet pharmacologique sur le SNC tandis qu'une injection intraventriculaire engendre des effets neurologiques. Bien que Lewandowsky évoqua en 1900 la notion de barrière hémato-encéphalique, il fallut attendre les années 1910 pour que Goldmann prouve son existence. L'expérience déterminante a été l'injection d'un colorant bleu à des animaux, au niveau intraventriculaire pour certains et en intraveineuse pour d'autres. L'injection au niveau cérébral a conduit à la seule coloration du tissu cérébral tandis que l'injection intraveineuse a conduit à la coloration de l'animal à l'exception du cerveau et de la moelle épinière. Cette expérience a alors montré que les colorants ne présentaient pas de problème d'affinité pour les tissus cérébraux.

II. Rôle de la Barrière Hémato Encéphalique

De nombreuses études ont montré que la BHE a diverses fonctions de protection et de régulation, permises notamment grâce à son architecture unique. Majoritairement composée de cellules endothéliales présentant des jonctions intracellulaires, elle permet de filtrer le passage des molécules entre le système sanguin et le système nerveux central. Il est estimé que 100% des « grosses » molécules et plus de 98% des petites (~ 100 Da) ne traversent pas la BHE⁵³. Les jonctions serrées, tapissent les capillaires sanguins et sont essentielles à la barrière en permettant la nutrition cérébrale et la régulation ionique *via* des transporteurs et des canaux afin d'aboutir à une concentration optimale pour le bon fonctionnement de la signalisation

⁵³ Pardridge, W. M. *NeuroRx*. **2005**, 2, 1, 3–14.

synaptique⁵⁴. La BHE permet également la régulation des neurotransmetteurs pour éviter toute neurotoxicité ou dommage neuro-excitatoire. De plus, son organisation empêche le passage de macromolécules, de protéines, qui pourraient causer des dommages importants sur le fonctionnement neuronal. De la même façon, les neurotoxines endogènes ou exogènes présentes dans la circulation sanguine sont majoritairement bloquées. Ainsi, très peu de molécules sont capables de franchir cette barrière étanche, ce qui est un atout lors du développement de molécules à visée non cérébrale, mais ce qui peut expliquer l'échec de la majorité des essais cliniques visant un effet au niveau cérébral.

III. Organisation de la BHE

La barrière hémato encéphalique assure donc la protection du cerveau, en réduisant son exposition aux toxines, en régulant l'homéostasie, en filtrant les molécules passant au travers⁵⁵. Son organisation est désormais connue (**Figure 12**)⁵⁶ : Les cellules endothéliales, assemblées entre elles par les jonctions serrées de telle sorte à réduire le transport paracellulaire. Elles reposent sur une membrane basale qui sert à accroître leur maintien en favorisant leur attachement. Des astrocytes et des péricytes sont également présents dans l'environnement proche des cellules endothéliales, pour assurer également la continuité des propriétés d'étanchéité de la barrière.

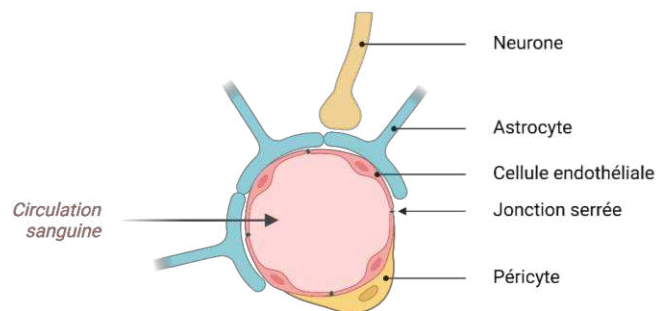


Figure 12 | Organisation de la Barrière Hémato-Encéphalique. Adapté de Jamieson et al.⁵⁶

⁵⁴ Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., Begley, D. J. *Neurobiol. Dis.* **2010**, 37,1, 13–25.

⁵⁵ Pardridge, W. M. *Drug Discov. Today.* **2007**, 12, 54-61

⁵⁶ Jamieson, J. J., Searson, P. C., & Gerecht, S. *J. Biol. Eng.* **2017**, 11, 1–11.

L'équilibre biochimique nécessite cependant la possibilité de franchir la barrière. Cela est possible sous certaines conditions *via* des mécanismes énoncés ci-après⁵⁷ (**Figure 13**)

- **Le passage paracellulaire :** Cette voie correspond au passage de molécules à travers les jonctions serrées de la barrière. L'espacement étant serré, cette voie n'est pas la plus favorable et seules les petites molécules flexibles sont capables de passer. Le passage paracellulaire est donc restreint aux molécules hydrophiles et de faible poids moléculaire, tels l'eau, le glycérol ou encore l'urée.
- **La diffusion passive :** La diffusion passive (qui permet le passage de l'éthanol, de la nicotine) ne nécessite aucun apport d'énergie et tend à égaliser les concentrations entre le milieu cérébral et le milieu sanguin. Il s'agit du mécanisme le plus impliqué pour le passage de la BHE⁵⁸. Les phospholipides membranaires présentent une conformation induisant la formation de petits espaces entre les chaînes lipidiques, ce qui permet le passage de petites molécules. La nature de la membrane implique donc la restriction de ce passage aux molécules lipophiles et l'espacement exclut la diffusion des molécules ayant une masse moléculaire trop importante (supérieure à 500-600 Da). Une forte polarité de la molécule limite également son passage car plus la polarité est importante, plus la lipophilie de la molécule est réduite. Les molécules ioniques sont également retenues. La membrane étant chargée négativement, elle repousse les molécules anioniques, tandis que les molécules cationiques seront retenues sous l'effet d'interactions ioniques. Un dernier critère réduit considérablement les candidats capables de franchir la barrière par diffusion passive. Une majorité de molécules interagissent par des liaisons ioniques ou des liaisons de Van der Waals avec les composants du plasma sanguin, et notamment les protéines plasmatiques. Ces interactions, bien que réversibles, réduisent la capacité des molécules à franchir la barrière. Par exemple, il est estimé que l'albumine du sérum humain, qui est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin, se lie à plus de 70% de toutes les molécules.
- **Le transport membranaire :** De nombreuses molécules ne peuvent pas diffuser à travers la membrane et nécessitent donc la présence de transporteurs. Il s'agit d'un passage actif nécessitant de l'énergie fournie par le métabolisme cellulaire, pouvant dès lors aller à l'encontre du gradient de concentration. Néanmoins, l'implication d'un

⁵⁷ Abbott, N. J., Rönnbäck, L., Hansson, E. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, 7, 41-53.

⁵⁸ Zeiadeh, I., Najjar, A., Karaman, R. *Molecules.* **2018**, 23, 6.

transporteur spécifique en fait une voie de passage saturable. La BHE présente alors une grande quantité de transporteurs sur la membrane cellulaire permettant de véhiculer des peptides, des molécules ioniques, du glucose ou des acides aminés du sang vers le SNC ou bien du SNC vers la circulation sanguine.

- **La transcytose :** Cette voie de transport est médiée par des récepteurs de transcytose ou bien par adsorption. Dans le premier cas, le ligand se lie au récepteur membranaire, engendrant un repli pour former une vésicule. La vésicule est ensuite transportée vers le côté cérébral pour expulser la molécule. La transcytose par adsorption permet le passage des molécules chargées positivement. L'interaction électrostatique entre le cation et la membrane lipidique entraîne la formation d'une vésicule permettant le passage de la molécule. La transcytose permet ainsi le passage de macromolécules telles l'insuline ($\sim 5800 \text{ g.mol}^{-1}$), la transferrine ($\sim 77000 \text{ g.mol}^{-1}$) ou bien le passage de peptides. De plus, n'impliquant pas l'utilisation de transporteurs, son débit est plus important que le transport membranaire.
- **Les récepteurs :** Présents à la surface de la BHE, les récepteurs liés stimulent la transcytose ou engendrent une perméabilité membranaire⁵⁹. Ils peuvent dès lors être utilisés dans la conception de molécules thérapeutiques pour faciliter l'entrée vers le SNC.

Une fois les molécules passées du système sanguin au système nerveux central, elles peuvent néanmoins regagner le niveau sanguin par un phénomène d'efflux. Les pompes à efflux sont particulièrement exprimées au niveau de la BHE, tout en ayant une capacité de reconnaissance de substrat très large. Les pompes impliquées peuvent toutefois être ciblées par des inhibiteurs spécifiques afin d'éviter une inefficacité thérapeutique, dans le cadre de l'administration d'anticancéreux, par exemple⁶⁰.

⁵⁹ Carman, A. J., Mills, J. H., Krenz, A., Kim, D-G., Bynoe, M.S. *J. Neurosci.* **2011**, 31, 37, 13272-13280.

⁶⁰ Löscher, W., Potschka, H. *NeuroRx.* **2005**, 1, 2, 86-98.

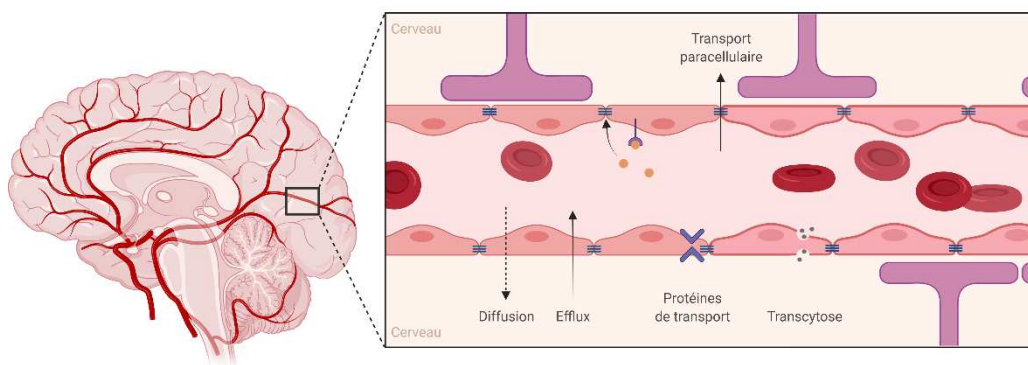


Figure 13 | Représentation de la Barrière Hémato-Encéphalique et des modes de passage possibles. Adapté d'Abbott et al.⁵⁷

Les molécules exogènes pouvant franchir la BHE sont donc très majoritairement retenues. Les caractéristiques physico-chimiques permettant leur passage sont restreintes. Franchir cette barrière protectrice est indispensable afin que l'objet thérapeutique puisse accéder au milieu neuronal, à la cible biologique et délivrer la substance active.

IV. Estimer le passage de la BHE

1. Caractéristiques des molécules franchissant la BHE

Dans l'optique d'estimer la capacité d'un médicament administré par voie orale à franchir les membranes biologiques, en 2001, Lipinski *et al* ont mis en exergue des caractéristiques nécessaires à une perméabilité optimale⁶¹. Les règles empiriques de Lipinski décrivent l'importance d'avoir : une masse moléculaire inférieure à 500 daltons ; un nombre de donneurs de liaisons hydrogène inférieur à 5 ; un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 10 ; un log P inférieur à 5. Toutefois, si ce modèle peut s'adapter à différents types de membrane, il s'avère insuffisant pour estimer le passage de la BHE. Cette barrière est bien plus imperméable que les autres membranes biologiques, et d'après l'expérimentation les caractéristiques physico-chimiques nécessaires au bon passage d'une molécule sont plus restrictives⁶².

Comparé aux règles de Lipinski, les molécules doivent présenter une lipophilie plus importante et une bonne flexibilité moléculaire, les membranes étant souvent plus imperméables aux structures rigides. Il est également nécessaire de réduire le nombre de site

⁶¹ Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3-26.

⁶² Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., and Villalobos, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 435-449.

pouvant former des liaisons hydrogènes. Plus une molécule en possède, moins elle est peut diffuser passivement. De plus, la présence de donneurs de liaisons hydrogène, comme des fonctions alcool ou amine par exemple, peuvent entraîner un phénomène d'efflux plus important⁶³. La molécule doit avoir une masse moléculaire comprise entre 150 g.mol⁻¹ et 400 g.mol⁻¹^{64,65}. Le pKa de la molécule exerce également une influence sur l'efficacité neuronale. Une molécule à pKa élevé aura tendance à augmenter l'efflux, tout en présentant une mauvaise distribution cérébrale⁶⁶.

2. Application du criblage virtuel

La mise en évidence des caractéristiques physico-chimiques essentielles au passage de la BHE par les candidats-médicaments a permis le développement d'approches prévisionnelles informatiques. Dans la lignée de l'essor du criblage à haut débit, ces nouvelles méthodes ont pour but d'apporter une réponse au problème de prédiction du devenir d'un médicament ciblant le SNC.

Les nombreux modèles mathématiques développés pour ces essais *in silico* reposent sur les données expérimentales obtenues lors des précédents essais de molécules *in vitro* et *in vivo*. Depuis une vingtaine d'années⁶⁷, l'élément central et la difficulté majeure à l'élaboration d'un modèle fiable est le choix des ensembles de données utilisées. Longtemps les modèles se sont développés sur l'hypothèse que la diffusion passive était la voie de transport majoritaire pour pénétrer le SNC, sans prendre en compte les autres voies de passage et de transport possibles⁶⁸. La complexité de l'élaboration de modèles les plus complets possibles a engendré la restriction de leur utilisation aux seules petites molécules. On retrouve ainsi le « Support Vector Machine », « K-nearest Neighbor » ou le « Decision Tree ». En outre, toutes les caractéristiques physico-chimiques ne sont pas systématiquement prises en compte. Aussi, de nombreux modèles utilisent le logBB, c'est-à-dire le ratio cerveau/plasma des molécules, qui est une

⁶³ Hu, E., Kunz, R. K., Chen, N., Rumfelt, S., Siegmund, A., Andrews, K., Chmait, S., Zhao, S., David, C., Chen, H., Lester-Zeiner, D., Ma, J., Biorn, C., Shi, J., Porter, A., Treanor, J., and Allen, J. R. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8781-8792

⁶⁴ Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., Villalobos, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 6, 435-449.

⁶⁵ Ghose, A., Herbertz, T., Hudkins, R. L., Dorsey, B. D., Mallamo, J. P. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 50-68.

⁶⁶ McDonald, I. M., Mate, R. A., Zusi, F. C., Huang, H., Post-Munson, D. J., Ferrante, M. A., Gallagher, L., Bertekap Jr, R. L., Know, R. J., Robertson, B. J., Harden, D. G., Morgan, D. G., Lodge, N. J., Dworetzky, S. I., Olson, R. E., and Macor, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 1684-1688.

⁶⁷ Burns, J., Weaver, D. F. *Can. J. Neurol. Sci.* **2004**, 31, 520-527.

⁶⁸ Deli, M. A. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In *Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*; Tihanyi, K., Vastag, M., Eds Bentham Science Publishers, 2011; 144-165.

donnée facilement disponible et qui dépend de la lipophilie de la molécule étudiée⁶⁹. D'autres modèles reposent sur le respect des règles de Lipinski. Bien qu'initialement particulièrement fiable (avec environ 90% des molécules à administration orale respectant ces caractéristiques), aujourd'hui ce modèle semble insuffisant. Hormis la nécessité d'avoir des critères restreints lorsque l'on étudie la BHE, les molécules développées tendent à déroger à ces règles. Il est estimé que 50% des nouvelles entités chimiques étudiées étant des produits naturels, ne respectent pas les règles de Lipinski⁷⁰. En 2019, Miao *et col.*, ont élaboré une approche prédictive applicable à toutes molécules indépendamment de leur taille : le Deep Learning⁷¹. Cette approche est basée sur des réseaux de neurones artificiels et permet un périmètre d'action élargi par l'apprentissage informatique. Par exemple, elle prend ainsi en compte les considérations cliniques, les indications thérapeutiques, les effets secondaires.

Bien que particulièrement intéressants dans le développement de nouveaux candidats-médicaments et toujours en voie d'amélioration, ces modèles souffrent toujours d'inexactitudes. Certains modèles ont une précision insuffisante due à la restriction des champs d'étude.

V. Approches pour optimiser le passage de la BHE

Le développement de médicaments ciblant le SNC a nécessairement entraîné la mise en place d'approches permettant le passage de la BHE. La diffusion passive est restreinte aux seules molécules lipophiles de faible masse molaire, mais la majorité des molécules développées aujourd'hui présentent une taille trop importante pour utiliser cette voie de passage. Afin de permettre l'accès au SNC, les stratégies élaborées reposent sur des modifications chimiques, pour permettre une reconnaissance spécifique, ou bien sur l'altération temporaire de l'intégrité de la barrière.

- **Modification de structure.** Une première stratégie consiste en la modification chimique de la molécule. Il peut s'agir de la cationisation de la molécule pour conduire à sa transcytose⁷². *Via* le couplage covalent d'une molécule poly-aminée cationique au

⁶⁹ Bagchi, S., Chhibber, T., Lahooti, B., Borse, V., Dev Jayant, R. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, 13, 3591-3605.

⁷⁰ O'Hagan, S., Swainston, N., Handl, J., Kell, D. B. *Metabolomics.* **2015**, 11, 323-339.

⁷¹ Miao, R., Xia, L. Y., Chen, H. H., Huang, H. H., and Liang, Y. *Scientific Reports.* **2019**, 9, 1, 1-11.

⁷² Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J-M. *The APPS Journal.* **2008**, 10, 3, 455-472.

candidat-médicament, la densité de charges positives va augmenter. Une lipidisation⁷³ pour améliorer sa lipophilie est également possible pour une diffusion passive, sous réserve que la prodrogue formée conserve une masse moléculaire inférieure à 500 Da.

- **Le ciblage d'un transporteur ou d'un récepteur.** Une approche grandement étudiée consiste en la liaison covalente d'une molécule reconnue par un transporteur ou bien un récepteur à la surface des cellules endothéliales⁷⁴. Souvent, il s'agit de peptides ou d'anticorps ciblant les récepteurs à la transferrine, aux lipoprotéines, ou bien les transporteurs au glucose ou aux acides aminés. Un ciblage des transporteurs permet le passage direct de la molécule liée. Un ciblage des récepteurs peut conduire soit à la déconstruction provisoire des jonctions serrées, soit à une stimulation du processus de transcytose.
- **Association non covalente.** Parallèlement aux modifications chimiques des candidats-médicaments, l'injection d'une solution hypertonique stimulant la perméabilité de la membrane est également utilisée. Pour cela une administration de VEGF⁷⁵ (Facteur de croissance endothélial vasculaire – *Vascular Endothelial Growth Factor*), de mannitol peut être utilisée pour ouvrir temporairement la barrière et permettre le passage du composé.
- **Les méthodes alternatives.** De manière plus invasive, une injection stéréotaxique, directement dans la zone cérébrale voulue, peut être envisagée. Le recours à des ultrasons focalisés ouvre la BHE pour quelques heures, autorisant dès lors le passage de la molécule⁷⁶. L'intégrité de la barrière n'est plus assurée, toute molécule peut alors atteindre le SNC sans restriction. D'autres approches ont été étudiées bien que difficilement applicables chez l'homme. Par exemple, le recours à l'injection concomitante de DMSO avec la substance active a été évalué⁷⁷. Le solvant permet l'ouverture de la BHE et donc la diffusion de la molécule dans le SNC. Néanmoins, sa neurotoxicité a stoppé son utilisation.

La compréhension des mécanismes de passage de la BHE est essentielle à la mise au point de stratégies thérapeutiques. De nombreuses approches initialement étudiées pour atteindre le

⁷³ Juillerat-Jeanneret, L. *Drug Discov. Today*. **2008**, 13, 1099-1106.

⁷⁴ Pardridge, W. M. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, 32, 11, 1959-1972.

⁷⁵ Mayhan, W. G. *Am. J. Physiol.* **1999**, 276, 5, 1148-1153.

⁷⁶ Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtesa, N., Jolesz, F. A. *Radiology*. **2001**, 220, 3, 640-646.

⁷⁷ Broadwell, R.D., Salzman, M., Kaplan, R. S. *Science*. **1982**, 217, 164-166.

SNC sont toxiques ou trop invasives. Ainsi, l'utilisation du DMSO, de solutions hyperosmotiques⁷⁸ ou d'ultrasons focalisés en vue d'ouvrir la BHE, sont des approches trop invasives, douloureuses ou bien conduisent à des dommages permanents⁷⁹. La recherche de stratégies qui respectent la physiologie sont à privilégier.

VI. Les modèles *in vitro* de la BHE

En vue de comprendre le fonctionnement de la BHE, des cultures *in vitro* de la BHE ont été développées dès les années 1970. Aujourd'hui ces modèles de BHE peuvent être utilisés en vue d'étudier le passage et la toxicité de candidats-médicaments⁸⁰. L'essor de ces approches *in vitro* s'inscrit dans une volonté de diminuer les essais *in vivo* et de respecter la règle des 3R : réduire, raffiner et remplacer. Ce principe constitue le fondement de la démarche éthique de l'expérimentation animale et contribue au développement de méthodes alternatives. Il repose sur la réduction du nombre d'animaux utilisés, le remplacement de ces essais par le recours à des modèles *in silico* et *in vitro*, et l'optimisation des expérimentations pour réduire ou supprimer la douleur animale.

La complexité de la membrane physiologique induit inévitablement une difficulté quant à sa reproduction en laboratoire. Les premiers modèles consistaient donc en l'utilisation d'un filtre avec des pores de taille variable selon l'étude souhaitée, recouvert d'une matrice sur laquelle est cultivée une monocouche de cellules endothéliales cérébrales (**Figure 14**). Pour se rapprocher des conditions physiologiques, les modèles ont évolué avec l'adjonction d'astrocytes et de péricytes⁶⁹. Les modèles initialement animaux induisaient un biais trop important eu égard des différences inter-espèces, et des modèles humains ont alors été développés. Toutefois mimer la BHE induit des biais inévitables en raison de sa complexité, des difficultés à isoler des cellules humaines ou encore de méconnaissance de la composition de la matrice naturelle. En outre, les modèles les plus complexes engendrent une manipulation difficile et un coût élevé.

⁷⁸ Rapoport, S. I. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **2001**, 10, 10, 1809-1818.

⁷⁹ Bidros, D. S., Vogelbaum, M. A. *Neurotherapeutics*. **2009**, 6, 539-546.

⁸⁰ Helms, H. C., Abbott, N. J., Malgorzata, B., Cecchelli, R., Couraud, P-O., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V., Stebbins, M. J., Vandenhoute, E., Weksler, B., Brodin, B. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2016**, 36, 5, 862-890.

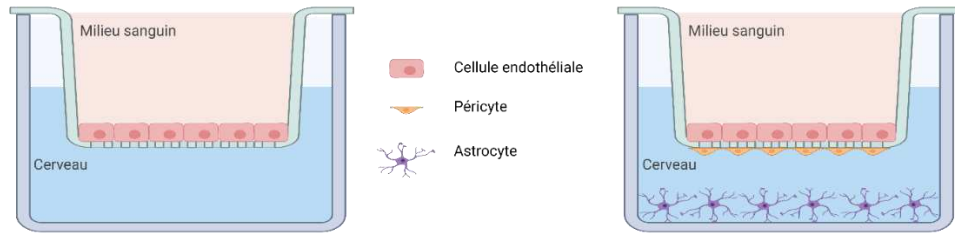


Figure 14 | Modèles in vitro de la BHE.

Exemples de modèles dont le compartiment donneur simule le système sanguin et le compartiment receveur simule le cerveau. Les modèles peuvent être composés de mono-culture de cellules endothéliales, ou de cultures multiples, le plus complet comportant des cellules endothéliales, des péricytes et des astrocytes. Adapté d'Helms et al.⁸⁰

Ainsi franchir la BHE est un défi majeur dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant le SNC. Son imperméabilité impose des caractéristiques physico-chimiques pour permettre le passage de la barrière. Des technologies d'estimations des capacités de passage de cette membrane sont en développement et des alternatives *in vitro* sont étudiées pour simplifier leur évaluation. Complexes à mettre en place, elles permettent une première estimation, bien que la fiabilité ou l'adaptabilité soit encore parfois limitées. Quoiqu'il en soit, la conception de molécules, antiparkinsonienne dans notre cas, doit permettre d'atteindre le SNC pour cibler les lysosomes neuronaux.

4. Altérations du lysosome, dysfonctions associées et approches thérapeutiques ciblant le pH de l'organite

I. Altérations pathologiques du lysosome

Le lysosome est un organite intracellulaire complexe au rôle central dans les processus métaboliques de toutes les cellules⁸¹. Il est impliqué dans la dégradation, la biogénèse et le transport de lipides, d'acides nucléiques, ou encore de protéines. De fait, son rôle dans de nombreuses pathologies telles que les maladies lysosomales, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes, les processus infectieux ou encore cancéreux a été clairement établi (**Figure 15**). En effet, de nombreux dysfonctionnements ont été décrits dans la littérature et peuvent impacter le processus autophagique, mitochondrial ou encore déséquilibrer le stockage protéique.

- Ainsi les maladies lysosomales, qui regroupent une cinquantaine d'affections, sont majoritairement dues au déficit ou à l'absence d'enzymes spécifiques de la dégradation de divers métabolites ou de protéines de transport. Une altération du gène codant pour une de ces enzymes est suffisante pour impacter la dégradation lysosomale. Pour exemple, les maladies de Fabry et Gaucher présentent une altération de l'enzyme α -galactosidase et la glucocérébrosidase respectivement, impliquées dans le métabolisme des céramides et des sphingolipides⁸² (lipides indispensables au développement des organismes vivants). S'ensuit une accumulation du métabolite concerné, un engorgement de la cellule et de l'organe. D'autre part, les maladies de surcharge lysosomale peuvent être dues à une altération des protéines de transports permettant la sortie de molécules de l'organite afin qu'elles exercent leur fonction⁸³. Un défaut de ces protéines peut également induire l'accumulation des molécules associées et le développement d'une maladie lysosomale.
- Les maladies neurodégénératives sont, elles, principalement causées par une accumulation protéique en raison du dysfonctionnement du processus autophagique. Plusieurs phénomènes ont lieu dans le développement de ces maladies. Le pH lysosomal peut être déficient altérant le bon fonctionnement des enzymes de dégradation qui nécessitent un pH acide. Il est alors observé une accumulation

⁸¹ Lawrence, R. E., Zoncu, R. *Nat. Cell Biol.* **2019**, 21, 133-142.

⁸² Parenti, G., Medina, D. L., Ballabio, A. *EMBO Mol. Med.* **2021**, 13.

⁸³ Bonam, S. R., Wang, F., Muller, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, 18, 923-948.

protéique potentiellement problématique. C'est le cas dans la maladie de Parkinson, lors de laquelle l'altération du pH conduit à l'accumulation de l' α -synucléine et la formation de corps de Lewy, toxiques. Par ailleurs, lors des maladies neurodégénératives il est également observé un mauvais repliement protéique qui conduit à l'agrégation pathologique. Plusieurs approches thérapeutiques sont donc possibles : la restauration du pH lysosomal, le recours à une molécule chaperonne afin de permettre le bon repliement protéique.

- Au contraire, les processus cancéreux présentent une activité autophagique accrue et à une prolifération cellulaire accentuée. Cibler le lysosome et inhiber son activité peut alors être une approche thérapeutique dans le développement de stratégies anticancéreuses.
- Dans ces diverses affections, un phénomène d'inflammation lysosomale peut également être en cause. Ces inflammations étant souvent corrélées à des processus de stress oxydatif, une approche anti-oxydante au niveau de l'organite peut ainsi s'avérer adaptée. De plus, ces dysfonctions lysosomales impactent l'activité d'autres organites, et notamment les mitochondries. Développer des stratégies thérapeutiques ciblant le lysosome peut ainsi être particulièrement intéressant pour agir sur de nombreuses pathologies.

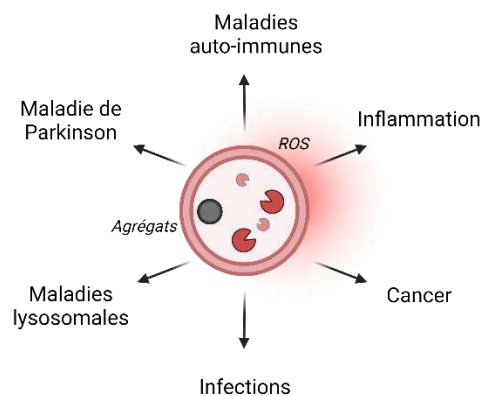


Figure 15 | Rôle central du lysosome dans des pathologies répandues.

Compte tenu des causes multifactorielles de la maladie de Parkinson, développer un vecteur non viral modulable, permettrait de cibler une restauration du pH lysosomal, apporter une molécule anti-oxydante ou bien délivrer une molécule chaperonne. Dans le cadre de cette thèse, notre stratégie a été visée spécifiquement la restauration du pH lysosomal.

II. Stratégies visant à augmenter le pH lysosomal

Le pH lysosomal régule la fonction de dégradation enzymatique. De nombreux cancers peuvent stimuler le processus autophagique conduisant à une surproduction de nutriments nécessaires à la croissance et à la survie cellulaire cancéreuse. De fait, contraindre l'inhibition du processus autophagique au sein des tumeurs conduit à une augmentation de l'apoptose⁸⁴. Pour cela, augmenter le pH lysosomal, notamment par l'apport d'une molécule basique, afin d'altérer son fonctionnement est devenue une approche thérapeutique prometteuse dans le traitement cancéreux. Les molécules apportées présentent un ou des pKa supérieur(s) au pH lysosomal (environ 4.5).

L'utilisation de la chloroquine ou de l'hydroxychloroquine (HCQ) comme inhibiteurs de l'autophagie a été particulièrement étudiée pour le traitement de nombreux cancers. L'hydroxychloroquine a d'ailleurs été et est toujours largement utilisée pour traiter la malaria ou le lupus. Fan *et al.* ont montré le potentiel de la chloroquine à inhiber la croissance et la survie cellulaire, sur un modèle *in vitro* de cellules cancéreuses de la langue⁸⁵. Une approche combine l'effet de substances actives basiques et un traitement par radiothérapie. Les radiothérapies souffrent d'une résistance des cellules cancéreuses et peuvent conduire à des rechutes ou au développement de métastases des tumeurs. Cela est dû au fait que les radiations elles-mêmes induisent une autophagie. Partant de ce constat, en 2020, Li *et al.* ont encapsulé de l'HCQ dans des nanoparticules de silice afin d'atteindre le lysosome et d'y délivrer une concentration en substance active suffisante⁸⁶. De cette façon, ils ont pu inhiber *in vivo* le processus de dégradation cellulaire, la croissance cellulaire cancéreuse et provoquer l'apoptose. Bien que l'HCQ ait été approuvée par la FDA et utilisée en association pour le traitement de cancers, des études cliniques ont étudié plus en détail son efficacité. Elles ont mis en évidence l'insuffisance du pouvoir inhibiteur, à des doses tolérables d'HCQ, de l'autophagie chez l'humain. Pour obtenir un effet accentué, des analogues de ces molécules ont alors été développés, comme ROC-325 (un dérivé de l'HCQ et de lucanthone, pouvant également altérer la fonction autophagique)⁸⁷. Ce composé a présenté lors d'études précliniques, une efficacité dix fois supérieure à celle de l'HCQ⁸⁸.

⁸⁴ Zeng, J., Shirihai, O. S., Grinstaff, M. W. *J. Life Sci.* **2020**, 2, 25-37.

⁸⁵ Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S., Miao, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3218-3222.

⁸⁶ Li, Y., Cho, M. H., Lee, S. S., Lee, D-E., Cheong, H., Choi, Y. *J. Control Release.* **2020**, 325, 100-110.

⁸⁷ Jones, T. M., Espitia, C., Wang, W., Nawrocki, S. T., Carew, J. S. *Cancer Commun.* **2019**, 39.

⁸⁸ Nawrocki, S. T., Han, Y., Visconte, V., Przychodzen, B., Espitia, C. M., Phillips, J., Answer, F., Advani, A., Carraway, H.E., Kelly, K. R., Sekeres, M. A., Maciejewski, J. P., Carew, J. S. *Leukemia.* **2019**, 33, 2971-2974.

Hong *et al.* ont utilisé une approche parallèle pour obtenir une augmentation du pH lysosomal et une inhibition de l'autophagie. Partant du postulat que les transporteurs anioniques exercent, par un phénomène d'efflux, un effet de basification d'organites, ils ont synthétisé les composés **A.** et **B.** (**Figure 16**) ciblant ces transporteurs lysosomaux. Les évaluations *in vitro* sur des cellules HeLa (cellules cancéreuses) ont montré leur efficacité pour augmenter le pH⁸⁹. Il est à noter que le composé **A.** présente une efficacité plus importante que le composé **B.**

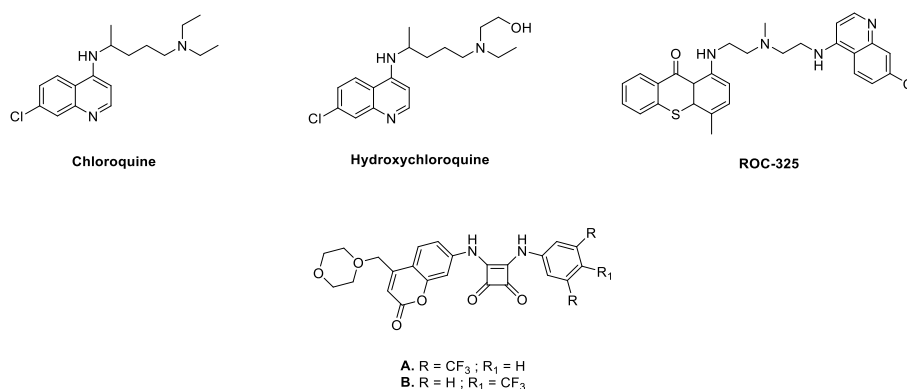


Figure 16 | Molécules pouvant augmenter le pH lysosomal.

III. Stratégies visant à abaisser le pH lysosomal

Contrairement aux molécules permettant d'élever le pH lysosomal, celles permettant de l'abaisser se font plus rares et seules deux molécules acidifiantes ont été recensées jusqu'à présent. Cela présage de la difficulté d'aboutir à des composés acidifiants non cytotoxique. Pourtant, la restauration de l'acidification lysosomale est une stratégie prometteuse pour permettre de relancer le processus de dégradation autophagique et revenir à une dégradation cellulaire fonctionnelle⁸³.

Une approche, développée en 2016 par Trudeau *et al.*, consiste en l'utilisation de nanoparticules qui libèrent leur pouvoir acidifiant sous activation UV (365 nm) et en présence d'eau (**Figure 17**). Envisagée pour restaurer l'autophagie altérée par de hauts niveaux d'acides gras dans le cadre de cancers (pancréatique par exemple), l'efficacité demeure limitée⁹⁰.

Pour véhiculer spécifiquement la prodrogue jusqu'aux lysosomes, cette équipe a conçu des NP polymériques d'environ 100 nm menant à la libération d'acides succiniques par stimuli

⁸⁹ Hong, X-Q., He, X-Y., Tam, K. Y., Chen, W-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30.

⁹⁰ Trudeau, K. M., Colby, A. H., Zeng, J., Las, G., Feng, J. H., Grinstaff, M. W., Shirihai, O. S. *J. Cell Biol.* **2016**, 214, 25-34.

accentué. Leur utilisation a été décrite pour les maladies neurodégénératives⁹¹, inflammatoires, cardiovasculaires ou encore les cancers⁹². Dans le cas de la mémantine, molécule approuvée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer mais qui n'a pas présenté une activité suffisante, Sánchez-López *et al.* décrivent son encapsulation au sein de NP de PLGA de manière à accroître son action thérapeutique⁹³. Les évaluations *in vivo* et les études histologiques ont indiqué une diminution bien plus importante du nombre de plaques amyloïdes toxiques chez les souris traitées avec les NP. Leur quantité a été réduite de moitié comparé aux souris traitées avec la mémantine libre, traduisant l'efficacité de la NP de PLGA à véhiculer une substance active et ainsi à en accroître l'effet.

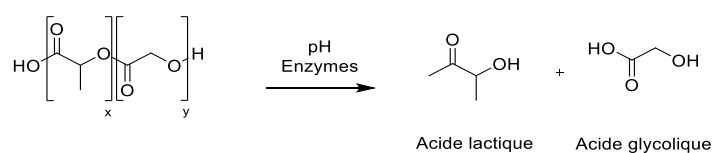


Figure 18 | Clivage du PLGA.

Ici, nous nous intéressons plus précisément à leur utilisation en tant que substance active, pouvant acidifier le lysosome. En effet le PLGA est un polyester *FDA-approved*, biocompatible et biodégradable, qui sous l'effet d'estérases libère des unités d'acide lactique et glycolique, aux pKa d'acides faibles de 3.86 et 3.83 respectivement. En 2012, Baltazar *et al.* rapportent une étude utilisant des NP de PLGA de différents poids moléculaires afin d'évaluer leur potentiel acidifiant pour restaurer le pH lysosomal⁹⁴. Sur une ligne de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien dont le pH a été élevé par une exposition à la chloroquine, les NP d'environ 390 nm ont pu entrer dans le lysosome, et acidifier le milieu. Les lysosomes des cellules contrôles ont gardé un pH de 5 tandis que ceux basifiés à la chloroquine avaient un pH moyen de 5.75. Après traitement avec les NP de PLGA, les lysosomes au pH dérégulé présentaient un pH abaissé à 5.11. Plus récemment, Zeng *et al.* ont mis en évidence, en 2019, que la composition en PLGA de la NP influe directement sur son pouvoir acidifiant⁹⁵. Ils ont ainsi formulé des NP de 100 nm de diamètre composées de PLGA à 50 :50 (Acide lactique (LA) / acide glycolique (GA)) et

⁹¹ Pinto, M., Silva, V., Barreiro, S., Silva, R., Remião, F., Borges, F., Fernandes, C. *Ageing Res. Rev.* **2022**, 79.

⁹² Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Prétat, V. *J. Control. Release.* **2021**, 161, 505-552.

⁹³ Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Cano, A., Calpena, A. C., Camins, A., Carmona, N., Silva, A. M., Souto, E. B., García, M. L. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, 16.

⁹⁴ Baltazar, G. C., Guha, S., Lu, W., Lim, J., Boesze-Battaglia, K., Laties, A. M., Tyagi, P., Kompella, U. B., Mitchell, C. H. *PloS one.* **2012**, 7.

⁹⁵ Zeng, J., Martin, A., Han, X., Shirihai, O. S., Grinstaff, M. W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, 58, 13910-13917.

75 : 25 (LA/GA). Le pouvoir acidifiant et la vitesse d'acidification ont été évalués sur un modèle de cellules issues de tumeur neuro-endocrinienne, exposées à une neurotoxine mitochondriale l'ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺). Il s'agit d'ailleurs d'un herbicide dont l'utilisation serait un facteur de risque pour le développement de la maladie de Parkinson chez ceux qui y sont exposés⁷. MPP⁺ conduit sur le modèle cellulaire à une augmentation de l'apoptose, conjointement à une augmentation du pH lysosomal et à une diminution du flux autophagique. Les NP ont toutes colocalisées avec les lysosomes, se sont dégradées et ont relargué leurs unités acides. La NP 75 :25 (LA/GA) a diminué le pH de 6.0 à 5.7. Celle en 50 :50 (LA/GA) a permis une acidification jusqu'à pH 5.5. Bien que l'acidification demeure faible, il est observé une meilleure efficacité lorsque la proportion d'acide glycolique est augmentée jusqu'à 50%. La dégradation du PLGA en est plus rapide et plus efficace. Parallèlement, au sein de notre équipe, en collaboration avec le Dr. Benjamin Dehay (neurobiologiste à l'Institut des Maladies Neurodégénératives de Bordeaux), Prévot *et al.* ont utilisé le PLGA plus uniquement comme un vecteur mais comme une molécule encapsulée, protégée au sein d'une nanoémulsion huile dans l'eau et relarguée au niveau cellulaire⁹⁶. L'objectif était d'en améliorer la délivrance et d'engendrer une acidification plus importante que celles observées dans les essais cités ci-dessus. En *in vitro*, sur des cellules neuronales humaines BE-(2)-M17, les nanoémulsions de PLGA ont permis une restauration du pH lysosomal à 24 heures, sans engendrer de cytotoxicité (**Figure 19 A.**). *In vivo* chez la souris (C57BL/6J), après injections stéréotaxiques, la formulation lipidique a montré une bonne diffusion cérébrale et après une injection systémique, un passage cérébral a pu être mis en évidence avec succès.

Malgré des résultats encourageants, l'inconvénient de ces composés polymériques repose sur leur nature chimique. Le PLGA est insoluble dans les nanoémulsions formulées et tend à s'agréger (**Figure 19 B.**). L'apport au niveau neuronal d'une molécule insoluble n'est pas voulu et le recours à une substance active alternative liposoluble pour réacidifier le lysosome s'impose.

⁹⁶ Prévot, G., Soria, F. N., Thiolat, M-L., Daniel, J., Verlhac, J. B., Blanchard-Desce, M., Bezard, E., Barthélémy, P., Crauste-Manciet, S., Dehay, B. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 4083-4089.

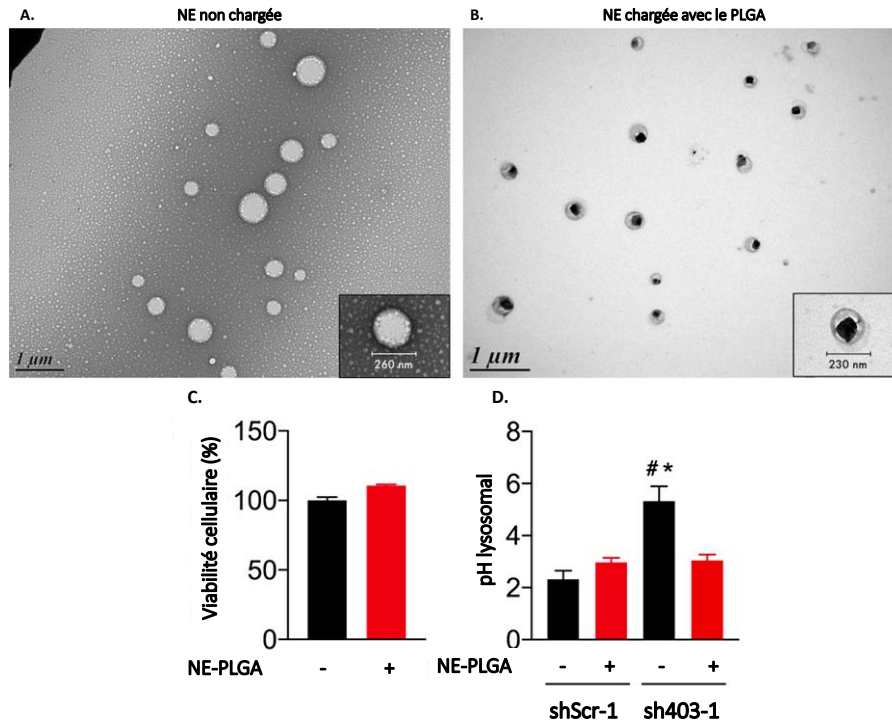


Figure 19 | Résultats des évaluations de NE-PLGA pour acidifier le lysosome.

A. Images TEM d'une nanoémulsion non chargée. **B.** Image TEM D'une nanoémulsion chargée en PLGA. **C.** Viabilité cellulaire à 24h de cellules traitées avec les NE-PLGA. **D.** Valeurs de pH lysosomal sur les cellules contrôles (shScr-1) et les cellules basifiées, en absence (-) ou présence (+) de NE-PLGA. Adapté de Prévot et al.⁹⁶

Depuis quelques années, le lysosome se révèle être une cible thérapeutique intéressante et prometteuse pour le développement de stratégies thérapeutiques. Cet élément central à la vie cellulaire est impliqué dans bon nombre de maladies neurodégénératives, lysosomales ou encore dans les cancers. Atteindre le lysosome pour y délivrer une substance active exogène demeure rare et les stratégies de modulation du pH lysosomal sont particulièrement peu développées. Uniquement deux molécules ont été rapportées dans la littérature pour acidifier le lysosome, bien que cette approche soit encourageante. Aussi, développer une molécule apportant une acidité exogène pour restaurer la fonction lysosomale défectueuse demeure un défi.

Chapitre II

Formulation et évaluation biologique de nanoémulsions acidifiantes

De nos jours, un grand nombre de candidats-médicaments pour les maladies neurodégénératives échouent lors de leur développement en raison d'une impossibilité à atteindre le système nerveux central. En restant cantonnés au niveau de la circulation générale, ils sont bien trop rapidement dégradés et présentent donc une absence d'effet thérapeutique. Il s'agit là d'un enjeu plus général dans le développement de molécules thérapeutiques. Il est donc essentiel d'élaborer de nouveaux systèmes innovants permettant de protéger les substances actives, parfois très fragile (acides nucléiques) ou peu solubles, de permettre une biodistribution cérébrale et de rendre possible un ciblage spécifique et de contrôler leur vitesse de relargage. Dans cette optique les nanotechnologies se sont massivement développées depuis les années 1990.

I. Les nanotechnologies : des systèmes de délivrance de molécules thérapeutiques

1. Historique et définition

Bien que les nanoformulations aient fait l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs décennies, leur essor dans le domaine pharmaceutique demeure relativement récent. L'objectif de franchir les barrières biologiques a conduit au développement massif des nanosystèmes. De plus, dans le domaine pharmaceutique, les substances actives développées peuvent montrer une mauvaise biodisponibilité, une dégradation anticipée ou bien un ciblage non spécifique nécessitant un véhicule modulable pour les transporter, les protéger et les délivrer à leur cible biologique.

Les nanosystèmes regroupent des nano-objets de composition et morphologie variables (nanoparticules, nanovésicules, dendrimères...) qui ont en commun une taille inférieure au micromètre et qui est généralement comprise entre 1 et 300 nm. Historiquement, 4 générations de nanosystèmes à visée thérapeutique ont été rapportées (**Figure 20**). La première consiste en l'utilisation d'un système n'ayant subi aucune modification de surface. Les nanosystèmes administrés par voie générale, sont rapidement pris en charge par les opsonines (protéines) circulantes et rapidement éliminés par le foie. Cette voie métabolique fait que l'intérêt thérapeutique de ces premiers systèmes est limité au ciblage hépatique. La deuxième génération résulte de l'adaptation des premiers objets développés, de telle sorte qu'ils puissent circuler plus longtemps dans l'organisme, sans être pris en charge par le foie. Pour cela, la surface des objets est modifiée pour la rendre furtive. L'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) est majoritairement répandue⁹⁷. Le polymère accroît significativement la taille de la particule inhibant ainsi l'interaction de la nanoparticule avec les opsonines par répulsion stérique. La troisième génération a permis la fonctionnalisation des extrémités polymériques⁹⁸. L'ajout d'un ligand (anticorps, peptide...) a pour but un ciblage spécifique de la cible thérapeutique *via* une reconnaissance clef-serrure. Une quatrième génération de nanosystèmes, plus élaborée est issue de l'élaboration de systèmes sensibles à un stimulus⁹⁹. Ces stimuli qui peuvent être aussi bien exogènes qu'endogènes et reposent par exemple sur une variation de température, de champ magnétique, de pH, ou encore d'une réaction d'oxydo-réduction.

⁹⁷ Veronese, F. M., Pasut, G. *Drug. Discov.* **2005**, 10, 21, 1451-1458.

⁹⁸ Elsabahy, M., Wooley, K. L. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2545-2561.

⁹⁹ Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P. *Nat. Mater.* **2013**, 12, 991-1003.

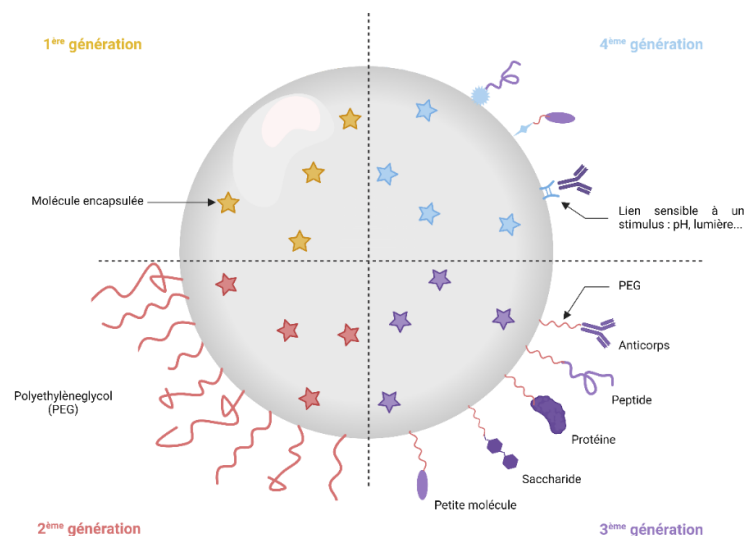


Figure 20 | Représentation schématique des 4 générations de nanosystèmes.

Adapté de Fasquelle *et al.*¹⁰⁰

2. Bénéfices des nanosystèmes

Les nanosystèmes sont développés pour permettre d'améliorer le passage des membranes biologiques jouant alors le rôle de véhicule pour les substances actives. Les possibilités de fonctionnalisation peuvent également servir de vecteur pour cibler plus précisément un organe. Ils permettent à la fois de protéger la molécule encapsulée, de la véhiculer et d'en améliorer l'effet biologique¹⁰¹. De cette manière, ils améliorent la stabilité (en empêchant la dégradation enzymatique de la molécule par exemple), de la solubilité du composé encapsulé et donc sa biodisponibilité, une diminution de la cytotoxicité et la possibilité d'un ciblage thérapeutique spécifique. Leur utilisation conduit alors à une diminution de l'absorption systémique, une meilleure internalisation cellulaire, une meilleure rétention tissulaire et un contrôle du relargage de la molécule véhiculée.

Ces avantages résultent notamment de la modification de la classification de la substance active dans le Système de Classification Biopharmaceutique (*Biopharmaceutical Classification System* - BCS). Ce système permet de différencier les substances actives en quatre catégories, en fonction de leur solubilité et de leur perméabilité gastro-intestinale *in*

¹⁰⁰ Fasquelle, F. Etude de la délivrance d'antigènes dans les voies aériennes en utilisant des nanoparticules de maltodextrine lipidées. PhD Thesis, Université de Lille : Lille, 2020.

¹⁰¹ Ghezzi, M., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., Del Favero, E., Cantù, L., Nicoli, S. *J. Control. Release.* **2021**, 332, 312-336.

*vitro*¹⁰² (**Figure 21**). En 1995, Amidon *et al.* ont développé cette classification corrélant les paramètres cités avec le contrôle du taux et de l'étendue de l'absorption du médicament par le corps humain. L'encapsulation de la molécule au sein d'un nanosystème permet de modifier son profil de perméabilité.

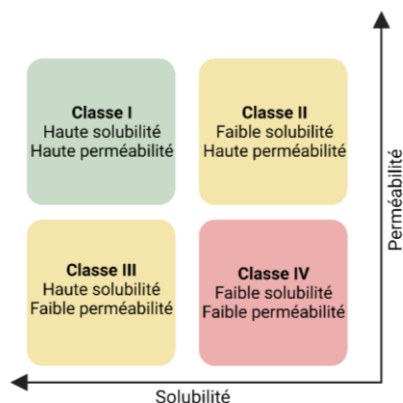


Figure 21 | Système de Classification Biopharmaceutique. Adapté d'Amidon *et al.*¹⁰²

3. Les différentes classes de nanosystèmes à usage thérapeutique

L'essor de la recherche portant sur les nanosystèmes a permis le développement de systèmes de diagnostic et de délivrance de molécules actives, permettant l'élaboration d'un panel de possibilités (**Figure 22**). Les nanoformulations présentent conjointement une diversité chimique, morphologique, de taille et de capacité d'encapsulation. Cette diversité rend possible la formulation de nombreuses molécules et le développement d'approches thérapeutiques, diagnostiques (imagerie) ou bien une approche théranostique.

¹⁰² Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R. *Pharm. Res.* **1995**, 12, 413-420.

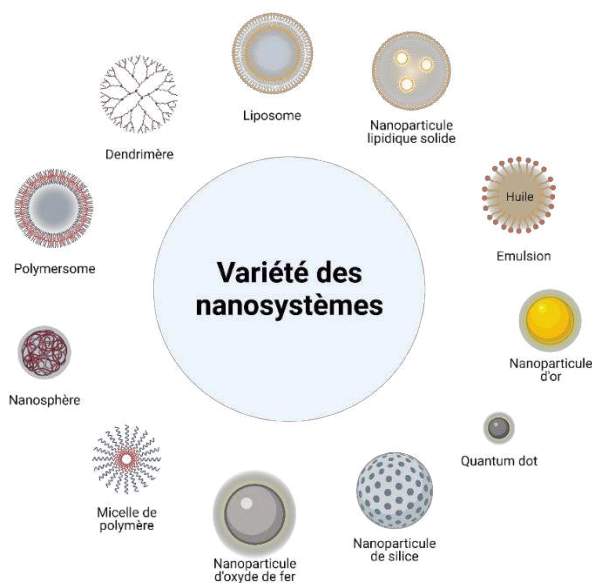


Figure 22 |Représentation des nanosystèmes les plus courants.

3.1. Diversité chimique des nanoformulations

Les nanosystèmes sont très divers : ils peuvent être polymériques, inorganiques ou lipidiques. Les formulations polymériques sont synthétisées avec des matériaux naturels ou bien synthétiques. Au-delà d'une facilité de synthèse, ces particules disposent d'une importante variété qui est fonction de la nature et du mode de formulation choisi. Il est aussi possible de trouver un panel étendu de morphologie. Cependant, la présence de matrice polymérique peut favoriser l'agrégation des particules qui peuvent engendrer une certaine toxicité.

Le cas des dendrimères est particulièrement intéressant. En premier lieu en raison de leur structure complexe et car leur synthèse met en œuvre des séquences multi-étapes particulièrement efficaces, mais également car leur structure chimique leur permet d'encapsuler des substances actives au sein des nombreuses « cavités » internes (**Figure 23**). L'équipe de Ling Peng à Marseille, spécialiste de ces objets, a rapporté en 2021, un exemple d'encapsulation de siARN à visée anti-cancéreuse¹⁰³ utilisant des objets dendrimériques. Les thérapies géniques utilisant les petits ARN interférant (siARN) ont émergées comme une nouvelle approche thérapeutique pour de nombreuses pathologies mais la problématique de l'administration des acides nucléiques peut être un obstacle à leur utilisation. Ces travaux rapportent la synthèse et l'utilisation d'un vecteur dendrimère supramoléculaire, issu de l'auto-assemblage par

¹⁰³ Dhumal, D., Lan, W., Ding, L., Jiang, Y., Lyu, Z., Laurini, E., Marson, D., Tintaru, A., Dusetti, N., Giorgio, S., Iovanna, J. L., Pricl, S., Peng, L. *Nano Res.* **2021**, 14, 2247-2254.

interactions ioniques entre un dendrimère amphiphile et un siARN. Le complexe de 12 à 17 nm ainsi formé a été administré efficacement et a montré un puissant effet antiprolifératif sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, comme des cellules de cancer pancréatique.

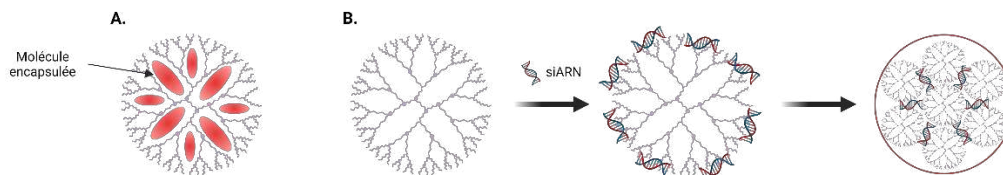


Figure 23 | Encapsulations de molécules au sein de dendrimères.

A. Encapsulation dans les cavités formées par le dendrimère. **B.** Encapsulation de siRNA au sein d'un auto-assemblage dendrimérique. Adapté de Peng and coll¹⁰³.

Les formulations inorganiques, quant à elles, présentent un intérêt majeur qui repose sur leurs propriétés physiques, électriques, magnétiques et optiques, provenant des propriétés des matériaux utilisés. L'inconvénient de ces nanosystèmes inorganiques est souvent leur faible solubilité et leur toxicité potentielle. Les quantum dots (QD), par exemple, sont composés de métaux semi-conducteurs permettant leur utilisation comme sonde fluorescente, dont la couleur d'émission dépend alors de la taille de la particule. Dans l'optique de détecter le peptide $A\beta_{42}$, corrélé aux plaques d'amyloïdes et à l'évolution de la maladie d'Alzheimer, Tang *et al.* ont développés une approche reposant sur l'utilisation de QD¹⁰⁴ (**Figure 24**). Des anticorps anti $A\beta_{42}$ reconnaissent le peptide et forment des complexes. L'autre terminaison du peptide est ensuite liée à d'autres anticorps biotinylés anti $A\beta_{42}$. Par suite de l'ajout de QD-streptavidine, la conjugaison avec les complexes biotinylés permet une séparation aisée des QD-streptavidine non liés. La concentration en peptide $A\beta_{42}$ a ainsi pu être corrélée à l'intensité de fluorescence des QD non liés. Appliquée avec succès à un échantillon de liquide céphalo-rachidien humain, cette méthode a présenté une sensibilité intéressante.

¹⁰⁴ Tang, M., Pi, J., Long, Y., Huang, N., Cheng, Y., Zheng, H. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, 201, 82-87.

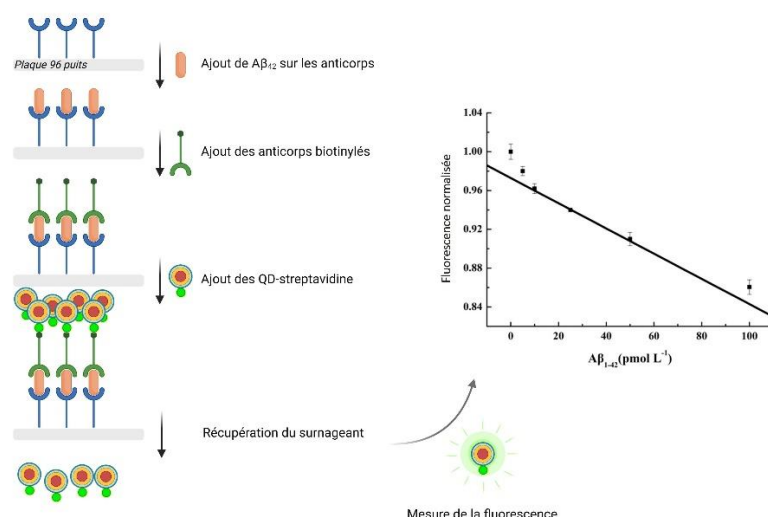


Figure 24 | Utilisation des QD pour la quantification de peptide Aβ dans l'objectif de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer. Adapté de Tang *et al*¹⁰⁴.

Les nanoparticules de silice mésoporeuses, quant à elles, offrent l'intérêt de ne pas subir de dégradation biologique et de protéger ce qui y est encapsulé¹⁰⁵. Organisées comme des cages hexagonales, ces systèmes ont une surface fonctionnalisable importante. Cette variété de nanoparticules est utilisée en recherche dans le cadre de recherche de traitements contre Alzheimer ou l'épilepsie. En 2016, Mo *et al.* ont développé une nanoparticule de silice mésoporeuse de 40 nm de diamètre dans une approche anti-glioblastome¹⁰⁶. La taille de ces particules a permis leur passage membranaire et notamment le franchissement de la BHE. Elles ont pu être chargées avec de la doxorubicine, anticancéreux bien connu et commercialisé en Europe depuis les années 60. Un polymère (polyétherimide) lié au peptide RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) ciblant les cancers a ensuite été greffé en surface par interactions électrostatiques. Le système ainsi formé a été évalué et il a présenté une haute capacité à franchir la BHE et à pénétrer les cellules cancéreuses de glioblastome. La perméabilité du médicament s'est avérée fortement améliorée pour ce nanosystème chargé de 40 nm par rapport à la doxorubicine seule (60 % d'internalisation cellulaire contre 33 % pour la molécule seule). Malgré ces résultats très intéressants, le système a montré également une cytotoxicité accentuée.

Les formulations à base de lipides (nanoémulsions, nanoparticules lipidiques solides, liposomes) présentent des propriétés d'autoassemblage, une biocompatibilité, une haute capacité de chargement en substance active et une importante biodisponibilité. En 2012, Sun *et*

¹⁰⁵ Mendiratta, S., Hussein, M., Nasser, H. A., Ali, A. A. A. *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, 36.

¹⁰⁶ Mo, J., He, L., Ma, B., Chen, T. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, 8, 6811-6825.

al. ont rapporté la capacité de chargement de telles formulations, notamment de nanoémulsions. Dans l'objectif d'améliorer la stabilité biologique de protéines, utilisées en tant qu'agents thérapeutiques et déjà sur le marché, ils ont encapsulé de l'albumine de sérum bovin au sein de nanoémulsions¹⁰⁷. Les protéines ont ainsi été encapsulées à hauteur de 45 mg.mL⁻¹ dans des formulations de 21.8 nm de diamètre moyen, ce qui représente une efficacité d'encapsulation de plus de 90%. De plus, ce chargement important n'a pas impacté la stabilité de ces systèmes. Ces caractéristiques de biocompatibilité, de biodisponibilité, et de capacité d'encapsulation fait des formulations lipidiques la classe de nanosystèmes la plus approuvée par la FDA pour des applications en nanomédecine¹⁰⁸.

3.2. Diversité morphologique des nanoformulations

Le panel de possibilités des formulations nanométriques inclut des différences de morphologie. Certains systèmes présentent une morphologie relativement molle, comme les liposomes, les nanoémulsions, les dendrimères ou les systèmes polymériques. D'autres seront plus rigides c'est le cas des nanoparticules d'or ou bien des quantum dots.

Ces nanosystèmes peuvent également être formulés sous diverses formes : sphères, bâtons, étoiles, triangles ou encore cubes. La forme que prend le nanosystème impacte son activité biologique, sa toxicité, sa stabilité, sa biodisponibilité et sa libération site-spécifique¹⁰⁹. Pour exemple, en 2017, Xie *et al.* ont étudié l'influence de la forme de nanoparticules d'or (étoile, triangle et bâton) sur leur internalisation cellulaire dans des cellules de macrophages leucémiques de souris (RAX264.7)¹¹⁰. Suite à l'incubation des cellules à une concentration de 20 µg.mL⁻¹, les formulations PEGylées de taille de 80-90 nm ont présenté une internalisation variant du simple au septuple (**Figure 25**). Aussi dans leur étude, les cellules incubées avec les nanoparticules d'or sous forme de triangle, ont présenté une internalisation de 1.4 pg/cellule, quand les cellules incubées avec les NP en forme d'étoiles avaient internalisé 0.2 pg/cellule. Les cellules en présence de NP de bâton ont présenté quant à elles, une internalisation de 0.8 pg/cellule. La taille des particules a également montré une influence sur la capacité d'internalisation cellulaire.

¹⁰⁷ Sun, H., Liu, K., Liu, W., Wang, W., Guo, C., Tang, B., Gu, J., Zhang, J., Li, H., Mao, X., Zou, Q., Zeng, H. *Int. J. Nanomed.* **2012**, 7, 5529-5543.

¹⁰⁸ Anselmo, A. C., Mitragotri, S. *Bioeng. Transl. Med.* **2019**, 4e10143.

¹⁰⁹ Jindal, A. B. *Int. J. Pharm.* **2017**, 532, 450-465.

¹¹⁰ Xie, X., Liao, J., Shao, X., Li, Q., Lin, Y. *Sci. Rep.* **2017**, 7.

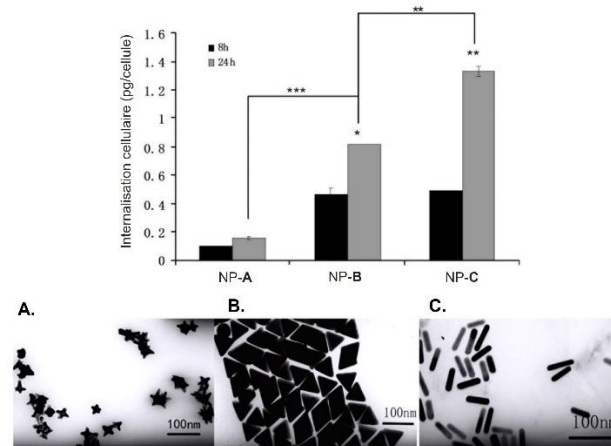


Figure 25 | Etude de l'effet de la morphologie de nanoparticules d'or sur leur internalisation cellulaire.

Les images TEM montrent les nanoparticules sont sous forme de **A.** étoiles, **B.** triangles, **C.** bâtons.
Adapté de Xie et al¹¹⁰.

3.3. Diversité de taille des nanoformulations

Les systèmes présentent une diversité importante au niveau de la taille (**Figure 26**). Les micelles présentent un diamètre inférieur à 50 nm, les liposomes ont une taille comprise entre 30 et 100 nm, tandis que les nanoémulsions sont comprises entre 150 et 300 nm. La taille du système impactera les caractéristiques mêmes du vecteur. Aussi, la voie d'internalisation cellulaire sera dépendante de ce paramètre. Pour exemple, Rejman *et al.* ont montré en 2004, que des nanoparticules de latex de taille inférieure à 200 nm subissaient une internalisation cellulaire par endocytose à récepteurs, tandis que l'augmentation de la taille conduisait à la préférence croissante d'une internalisation par cavéoles¹¹¹. De plus, les particules supérieures à 500 nm n'ont pas présenté la capacité à intégrer les lysosomes cellulaires. Outre la voie d'internalisation, la taille impacte l'efficacité de transfection, la biodistribution, la bioaccumulation et la cytotoxicité. Par ailleurs, la taille de la formulation détermine son ratio surface/volume et donc impacte l'hydrophilie ou la lipophilie du système ainsi que son interaction avec les molécules avec lesquelles il peut être en contact. De manière générale, une faible taille est corrélée à une pénétration facilitée mais à une toxicité accentuée. Ainsi il a été noté que les particules de plus de 1 µm se heurtent à une difficulté de pénétration cellulaire mais elles peuvent cependant atteindre le milieu cytoplasmique *via* leur interaction avec les

¹¹¹ Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D. *Biochem. J.* **2004**, 377, 159-169.

protéines. Au contraire, des QD Cadmium-Selenium qui pénètrent aisément les cellules, s'y accumulent induisant une toxicité¹¹².

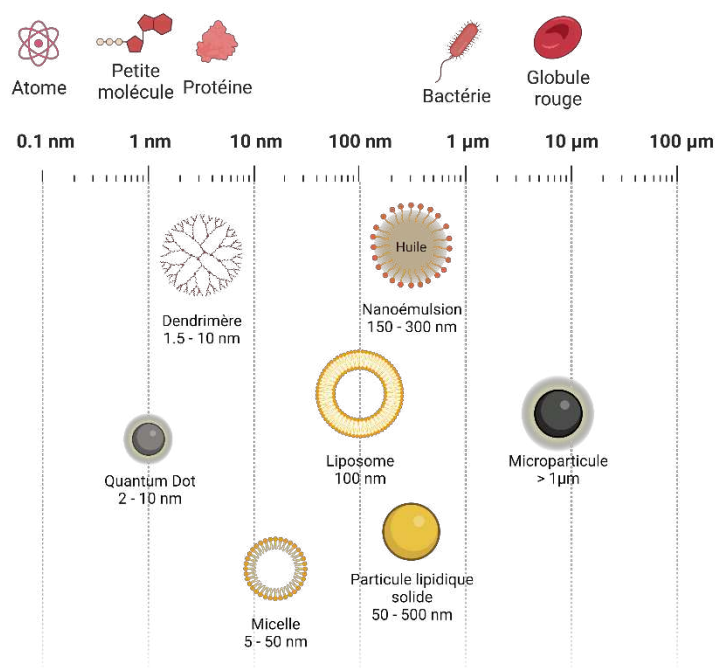


Figure 26 | Diversité de taille des nanoformulations.

L'application thérapeutique souhaitée guidera le choix de la formulation à adopter. La cible peut nécessiter un diamètre particulier pour le système utilisé, la lipophilie ou l'hydrophilie de la substance active à encapsuler impactera également le choix de la nature chimique de la formulation. La toxicité pouvant résulter de l'utilisation de nanosystèmes insolubles ou qui tendent à s'agréger peut également restreindre leur utilisation. Les propriétés physico-chimiques s'avèrent donc un critère de choix majeur.

4. Sélection du nanosystème de choix

Notre approche thérapeutique repose sur la synthèse d'une molécule nucléolipidique conçue comme une prodrogue. Afin de protéger et véhiculer notre objet synthétique, nous avons choisi de l'encapsuler au sein d'un nanosystème biocompatible, biodégradable et permettant potentiellement de franchir la BHE. Dans le but d'obtenir une efficacité thérapeutique optimale,

¹¹² Auría-Soro, C., Nesma, T., Juanes-Velasco, P., Landeira-Viñuela, A., Fidalgo-Gomez, H., Acebes-Fernandez, V., Gongora, R., Almendral Parra, M. J., Manzano-Roman, R., Fuentes, M. *Nanomaterials*. **2019**, 9.

la formulation choisie doit avoir une capacité d'encapsulation suffisante, une perméabilité importante à la BHE, tout en présentant un risque de toxicité réduit.

En 2013, Keck et Muller ont suggéré un Système de Classification Nanotoxicologique¹¹³ (*Nanotoxicological Classification System - NCS*). Les nanosystèmes y sont classés en quatre catégories, fonctions à la fois de leur taille et de leur biodégradabilité (**Figure 27**). La première classe présente une absence de risque ou un risque faible ; la deuxième et troisième classe sont considérées comme présentant un risque moyen ; et la quatrième classe est celle qui présente un risque élevé. Pour limiter les risques de toxicité, il est alors nécessaire de privilégier un nanosystème biodégradable (ce qui élimine les formulations polymériques, les nanoparticules de silice ou magnétiques¹¹⁴) et dont la taille est supérieure à 100 nm (afin d'éviter l'endocytose du système par toutes les cellules).

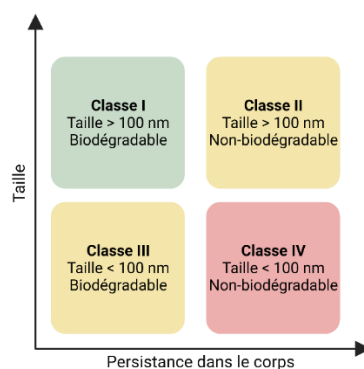


Figure 27 | Système de Classification Nanotoxicologique. Adapté de Keck et Muller.¹¹³

Le caractère lipophile de nos composés impose un système pouvant encapsuler une molécule relativement hydrophobe. Cette propriété, associée à la volonté d'aboutir à une forme thérapeutique finale biocompatible nous a conduit à privilégier les formulations lipidiques. Les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides et les nanoémulsions combinent ces propriétés ainsi qu'une importante biodisponibilité, une bonne biodégradabilité et un risque de toxicité réduit. Les micelles, quant à elles, présentent une taille inférieure à 50 nm, ce qui nous a conduit à écarter leur utilisation en raison d'une faible capacité de chargement. Les liposomes, bien que de diamètre pouvant être suffisant et permettant de franchir la BHE¹¹⁵, ont une capacité de chargement en substance active limitée comparé aux nanoémulsions et nanoparticules

¹¹³ Keck, C. M., Müller, R. H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 84, 445-448.

¹¹⁴ Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Kumar, N. S., Vekariya, R. L. *RCS Adv.* **2020**, 10, 26777-26791.

¹¹⁵ Seo, M-W., Park, T-E. *Biomed. Eng. Lett.* **2021**, 11, 211-216.

lipidiques solides : les molécules lipophiles ne peuvent se mettre qu'uniquement au niveau de la bicouche lipidique de faible surface¹¹⁶. Enfin, les nanoparticules lipidiques solides présentent deux inconvénients majeurs : une encapsulation limitée et une mauvaise rétention de la molécule au sein de la particule dans le temps, impactant leur stabilité¹¹⁷. De plus, la reproductibilité et l'obtention de ces particules à plus grande échelle est toujours problématique limitant l'utilisation des nanosystèmes et expliquant qu'ils soient cantonnés au domaine de la recherche¹¹⁸.

L'intérêt d'une formulation lipidique pour permettre le passage des membranes biologiques, la capacité d'encapsulation et la possibilité d'une transposition d'échelle de la production sont des critères qui ont retenu notre attention pour le développement d'une formulation dans l'objectif de cibler le lysosome au niveau neuronal. Les premiers travaux de nanoémulsions acides de PLGA réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de nous intéresser au développement de molécules acidifiantes qui pourraient être véhiculées sous forme de nanoémulsions. En effet, en plus des avantages liés au nanosystèmes lipidiques, de nombreuses études et revues rapportent la capacité des NE à franchir la BHE^{119,120,121} et l'intérêt de leur utilisation dans le développement d'approches thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives¹²².

II. Les nanoémulsions : intérêt thérapeutique et avantages

1. Définition des émulsions

Les émulsions sont des dispersions colloïdales métastables d'un système biphasique issu de deux composants non miscibles. Il s'agit de la dispersion d'un liquide en fins globules, la phase dispersée, dans un autre liquide, la phase dispersante (ou phase continue). Les globules formés sont stabilisés par des tensioactifs amphiphiles ou agents de surface, placés à l'interface, de telle sorte à abaisser la tension de surface. Ces structures sont connues pour permettre à la

¹¹⁶ Alavi, M., Karimi, N., Safaei, M. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, 7, 3-9.

¹¹⁷ Xu, L., Wang, X., Liu, Y., Yang, G., Falconer, R. J., Zhao, C-X. *Adv. NanoBiomed. Res.* **2022**, 2.

¹¹⁸ Scioli Montoto, S., Muraca, G., Esperanza Ruiz, M. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, 7.

¹¹⁹ Karami, Z., Saghatchi Zanjani, M. R., Hamidi, M. *Drug Discov. Today.* **2019**, 24, 1104-1115.

¹²⁰ Harun, S. N., Nordin, S. A., Gani, S. S. A., Shamsuddin, A. F., Basri, M., Basri, H. B. *Int. J. Nanomed.* **2018**, 13, 2571-2584.

¹²¹ Ganta, S., Dshpande, D., Korde, A., Amiji, M. *Mol. Membr. Biol.* **2010**, 27, 260-273.

¹²² Nirale, P., Paul, A., Yadav, K. S. *Life Sciences.* **2020**, 245.

fois la protection des substances encapsulées, leur transport et l'amélioration de leur délivrance¹²³.

Les émulsions peuvent être composées de différentes façons. Elles peuvent être des systèmes simples : hydrophile dans lipophile (H/L), lipophile dans hydrophile (L/H), lipophile dans lipophile (avec une phase polaire et une seconde apolaire). Les émulsions peuvent également être des systèmes multiples, lipophile dans hydrophile dans lipophile (L/H/L) ou bien hydrophile dans lipophile dans hydrophile (H/L/H). Le choix de la composition de l'émulsion formulée dépendra des propriétés physico-chimiques des composés à encapsuler.

En fonction de la taille des globules de la phase dispersée trois systèmes peuvent être distingués : les émulsions grossières, les nanoémulsions et les microémulsions (**Figure 28**). Ces systèmes diffèrent par la taille de leurs globules aux diamètres pouvant être très différents mais également par leur stabilité¹²⁴. Par convention, et tout le long de ce manuscrit, la phase hydrophile sera représentée en bleu tandis que la phase lipophile sera représentée en jaune.

- **Les émulsions grossières ou macroémulsions** sont composées de globules fortement polydispersés de 2 à 20 μm . Ces systèmes sont thermodynamiquement instables et peu stables cinétiquement.
- **Les nanoémulsions (NE)** ont des globules qui se rapprochent dans le temps formant donc un ensemble thermodynamiquement instable mais stable dans le temps. Ces émulsions blanches et opaques sont formées par des globules de 0,1 à 0,3 μm . La polydispersité est donc faible.
- **Les microémulsions**, sont thermodynamiquement stables et présentent des globules de taille inférieure à 0,1 μm . La petite taille des globules les constituant les rendant limpides, elles sont riches en tensioactifs.

¹²³ McClements, D. J. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, 1, 241-269.

¹²⁴ Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., Doyle, P. S. *Soft Matter.* **2016**, 12, 11, 2826–2841.

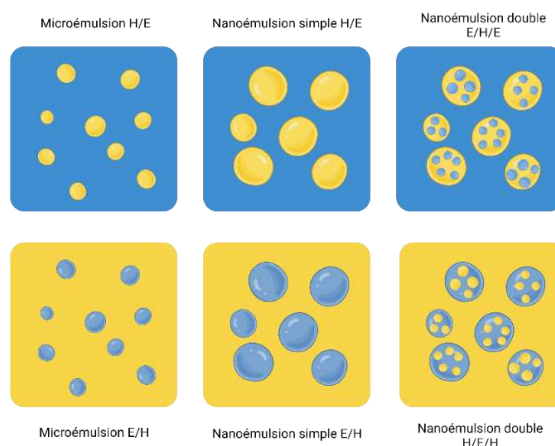


Figure 28 | Micro et nanoémulsions simples et doubles possibles.

Les NE simples ont une grande capacité de chargement en substance active lipophile dans le cas d'un système huile dans l'eau et hydrophile dans le cas d'un système eau dans l'huile¹²³. Cette capacité de chargement résulte du grand nombre de globules de taille réduite, augmentant de manière importante le rapport surface/volume. En comparaison, les liposomes ont une capacité de chargement bien plus réduite, notamment en principe actif lipophile puisque les couronnes de bicouches lipidiques sont les seuls espaces pouvant accueillir les substances actives lipophiles.

Les systèmes multiples, bien que moins stables dans le temps que les NE simples, ont l'avantage de permettre l'encapsulation concomitante de substances lipophiles et de substances hydrophiles respectivement dans les différentes phases internes du système.

La stabilité des dispersions suit la loi de Stokes qui caractérise la vitesse de déstabilisation du système métastable. Une variation des paramètres liés à la vitesse de rapprochement des globules peut permettre une amélioration de la stabilité. La loi (**Figure 29**) décrit une relation de la vitesse de sédimentation des globules proportionnelle au rayon de ces globules. Par conséquent, plus le diamètre moyen des globules est faible, plus la vitesse de déstabilisation est réduite et plus le système présente une stabilité colloïdale dans le temps. Une diminution de la différence des masses volumiques des deux phases peut également être envisagée, bien que cette approche ne puisse pas être systématiquement mise en œuvre. Une augmentation de la viscosité de la phase continue est un dernier paramètre pouvant être modulé. Néanmoins, la possibilité de faire varier ce paramètre dépendra de la voie d'administration

prévue pour l'émulsion. Une administration intra-veineuse éliminera la possible modulation de ce paramètre.

$$v = \frac{2\Delta\rho gr^2}{9\mu}$$

Avec,

v	vitesse de rapprochement des globules (m.s ⁻¹)
$\Delta\rho$	différence de masse volumique des phases (kg.m ⁻³)
g	accélération résultant de la gravité (m.s ⁻²)
r	rayon du globule (m)
μ	viscosité de la phase continue (Pa.s)

Figure 29 | Loi de Stokes.

2. Stabilité des émulsions

Les nanoémulsions et les macroémulsions présentent une instabilité thermodynamique. Cela conduit à des mécanismes de vieillissement et de déstabilisation des systèmes évoluant vers la séparation des phases¹²⁵. Ces mécanismes peuvent toutefois être différenciés : la floculation et le crémage sont des phénomènes réversibles ; tandis que la coalescence, le mûrissement d'Ostwald et la séparation de phase sont irréversibles (**Figure 30**)¹²⁶. Les déstabilisations réversibles peuvent être ramenées au nano-système initial par simple agitation. En effet, pendant ces phénomènes, le système perd en homogénéité, c'est-à-dire, la distribution des gouttes est déstabilisée. Cependant, la taille des globules reste stable. Bien que les mécanismes de déstabilisation de cette classe soient réversibles, il est important de relever que les divers phénomènes ne se produisent pas individuellement. La présence d'un de ces mécanismes peut en engendrer un autre, de telle sorte qu'une ou plusieurs déstabilisations peuvent apparaître conjointement.

- **Le crémage (ou sédimentation)** est un phénomène réversible par agitation reposant sur l'influence de la gravité. Lorsqu'il existe, entre les phases du système, une différence de densité, la phase la moins dense va subir un mouvement vers le haut pour se placer au-dessus de la phase la plus dense. Cela peut être le cas pour les nanoémulsions H/L dont les globules hydrophiles vont sédimenter. À l'inverse, dans le cas d'un système

¹²⁵ McClements, D. J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, 47, 611-649

¹²⁶ McClements, D. J. *Soft Matter.* **2011**, 7, 2297-2316

L/H, le phénomène sera inverse : la phase lipophile va subir un mouvement vers le bas formant alors à la surface, une couche de crème par le regroupement de la phase huileuse. La vitesse de migration des globules lors de ces phénomènes suit la loi de Stokes. Il est donc possible de ralentir ces phénomènes de plusieurs façons : en diminuant la différence de densité entre les phases, en diminuant la taille des globules ou bien en augmentant la viscosité de la phase continue.

- **La floculation** est également un phénomène réversible par agitation. Il repose sur l'effet des forces d'attraction. Naturellement les globules vont avoir une tendance à s'agréger tout en gardant leur intégrité. Ce phénomène dû aux mouvements Brownien entraîne la collision des globules. Cependant, les liaisons faibles qui maintiennent les globules entre eux, préviennent la rupture de leurs interfaces. La floculation peut mener à une sédimentation, à une coalescence et au plus long terme à une rupture de phase irréversible. L'ajout de tensioactifs ou bien la dilution du système peuvent être envisagés afin de limiter ce phénomène.
- **Le murissement d'Ostwald** est un phénomène irréversible. Il se produit lorsque les globules sont de taille inférieure à 600 nm et que la phase dispersée utilisée est légèrement soluble dans la seconde phase. Les globules subissent un retour vers un équilibre thermodynamique, ce qui mène à une augmentation de la taille des globules par transfert de matière entre eux. Il est possible de lutter contre le murissement d'Ostwald en utilisant des huiles plus lipophiles, peu solubles dans la phase aqueuse¹²⁶. Il est également possible d'ajouter des composés hydrophobes dans la phase huileuse de sorte à réduire sa solubilité.
- **La coalescence** consiste en la fusion des globules dispersés en globules de taille plus importante. Ce phénomène se déroule lorsque deux globules sont proches. Leurs interfaces se déforment et entrent en contact par la rupture de leur paroi. Les globules agglomérés vont s'unir jusqu'à la fusion totale. Ce phénomène irréversible mène à la séparation complète des phases. Cependant, il est possible de réduire son occurrence en augmentant les répulsions électrostatiques et stériques entre les globules, *via* la formulation de l'émulsion et le choix des tensioactifs.

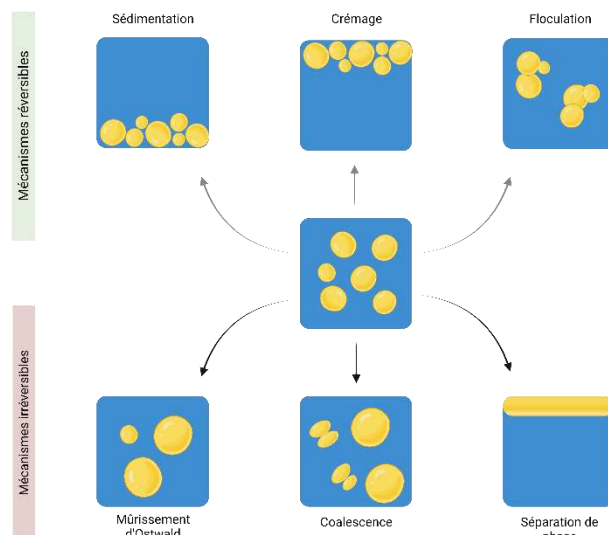


Figure 30 | Phénomènes de déstabilisation des nanoémulsions de manière réversible et irréversible. Adapté de McClements.¹²⁶

3. Composition des nanoémulsions

La composition de la formulation dépend de nombreux paramètres parmi lesquels la nature de la nanoémulsion voulue (L/H, H/L, système multiple), la nature de la ou des substances à encapsuler ou encore la voie d'administration désirée.

3.1. La phase huileuse

Il existe de nombreuses huiles utilisables pour la formulation des nanoémulsions. De l'huile de soja, à l'huile de sésame, en passant par l'huile de coton ou de noix de coco, elles sont composées de triglycérides à chaînes longues (C_{12} - C_{18}), à chaînes moyennes (C_8 - C_{10}) ou bien à chaînes courtes. Dans la formulation, elles peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Leurs proportions dans la nanoémulsion finale varie selon l'émulsion souhaitée. Généralement, leur part est de 5 à 20% pour une NE L/H.

La voie d'administration de la NE est un facteur majeur à prendre en compte¹²⁷. Une administration parentérale présente des limites dans le choix de la phase huileuse en raison de la toxicité de certaines huiles. Il est alors couramment utilisé des huiles végétales purifiées de triglycérides à chaînes longues, ou bien des huiles de synthèses de triglycérides à chaîne

¹²⁷ Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V. *AAPS PharmSciTech.* **2010**, 11, 4, 1526-1540

moyenne comme le Miglyol® 812N. Une administration cutanée conduira à l'utilisation préférentielle de paraffine, tandis qu'une administration par voie orale imposera l'usage d'une huile digestible, telle l'huile d'olives.

Le choix de la phase huileuse va également être grandement conditionnée à la solubilité de la substance à véhiculer.

3.2. Les agents de surface

Les agents de surface, ou surfactants, sont des molécules amphiphiles composés d'une tête polaire hydrophile et d'une ou plusieurs queues hydrophobes (**Figure 31**). Ils peuvent être ioniques ou non ioniques, linéaires, ramifiés ou bien aromatiques. Les tensioactifs possèdent un double rôle. Tout d'abord, ils permettent la formation de la dispersion à l'origine de l'émulsion. Ces molécules amphiphiles émulsifiantes se placent à l'interface des globules pour abaisser la tension interfaciale et ainsi permettre l'émulsification. D'autre part les tensioactifs permettent de limiter le phénomène d'évolution vers une séparation de phase irréversible de l'émulsion.

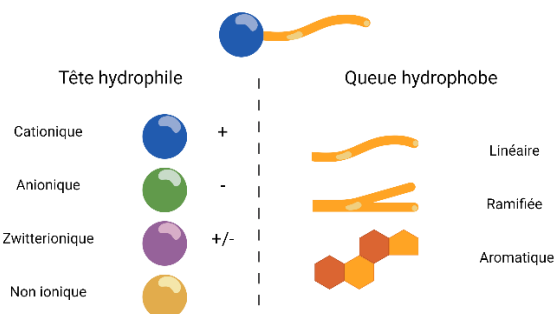


Figure 31 | Structure d'un tensioactif.

Les tensioactifs (TA) sont caractérisés par une valeur HLB (hydrophile-lipophile balance), comprise entre 0 et 20 (**Figure 32**)¹²⁸. Elle représente le ratio de la partie polaire par rapport à la partie apolaire du TA et donc le caractère hydrophile ou lipophile de la molécule. Pour une valeur inférieure à 6, le TA est hydrophobe, tandis qu'une valeur supérieure à 12 le définit comme hydrophile. Lors de l'élaboration de la composition de la nanoémulsion, le calcul de la valeur du HLB finale permet de réduire la démarche empirique en permettant de choisir

¹²⁸ Griffin, W. C. *Soc. Cosmet. Chem.* **1954**, 5, 249-256.

le couple de TA lipophile/hydrophile le plus adéquat. Néanmoins, le mélange d'un couple d'agents de surface n'est pas systématiquement nécessaire. Certaines nanoémulsions sont stables avec un seul agent de surface. C'est le cas, par exemple de l'Intralipide 20%®, une émulsion à base d'huile de soja, utilisée comme apport calorique lipidique et d'acides gras en nutrition parentérale. Permettant l'administration d'acides gras essentiels, elle est formulée à l'aide de phospholipides d'œufs (lécithines d'œufs), comme seul agent de surface¹²⁹.

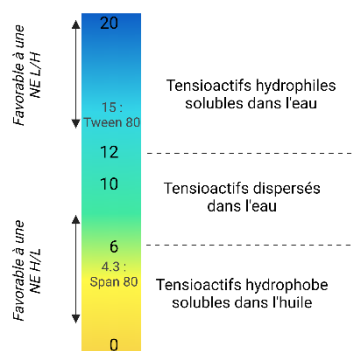


Figure 32 | Balance HLB des tensioactifs associée à leurs propriétés. Adapté de Griffin.¹²⁸

Comme les huiles, les TA peuvent aussi bien être d'origine naturelle que synthétique, être ioniques ou non ioniques. Les agents de surface naturels sont d'origine végétale ou animale. Une variation entre les lots est donc possible. Pour éviter cette variation, ils sont purifiés ou bien issus de dérivés semi-synthétiques. Les tensioactifs synthétiques sont multiples, néanmoins, une grande majorité de ces composés présentent une toxicité, ce qui limite leur utilisation. Le TA choisi a donc un impact sur la stabilité du système, mais il est nécessaire de prendre en compte sa toxicité. De plus, la voie d'administration est également un critère dans la sélection du TA. Pour une forme injectable, le choix des TA s'avère limité. Communément, pour les formes injectables, les surfactants le plus utilisés sont les lécithines de jaune d'œufs (TA naturel), qui sont des phospholipides ainsi que les polysorbates et les esters de sorbitan (Tween et Span 20, 40, 60 et 80 (synthétiques)).

4. Les procédés de fabrication

Plusieurs approches sont possibles afin d'aboutir à un système nanoémulsion stable. Les techniques développées sont divisées en deux catégories qui sont fonction de l'énergie à

¹²⁹ ANSM. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/frames.php?specid=67173618&typedoc=N&ref=N0285524.htm> (accessed June 6th, 2022).

apporter afin d'obtenir les caractéristiques granulométriques attendues : les méthodes de basse énergie et les méthodes de haute énergie¹³⁰.

4.1. Les méthodes de basse énergie

Les méthodes d'émulsification de basse énergie reposent sur l'utilisation des propriétés des composants de l'émulsion. Elles incluent le processus d'émulsification spontanée, de température d'inversion de phase et de composition d'inversion de phase.

- **L'émulsification spontanée** est une méthode de déplacement de solvant sans aucune agitation mécanique¹³¹. Cette autoémulsification se produit lors de l'ajout progressif d'une phase huileuse, contenant un tensioactif et un solvant organique miscible à l'eau, à une phase aqueuse. Le solvant va progressivement se déplacer vers la phase aqueuse, emportant avec lui le tensioactif. La perturbation engendrée crée alors des globules d'huile dans la phase aqueuse. L'inconvénient de cette méthode est le recours à un solvant organique, comme l'acétone ou l'éthanol, qui doit être éliminé en raison de la toxicité qu'il peut induire.

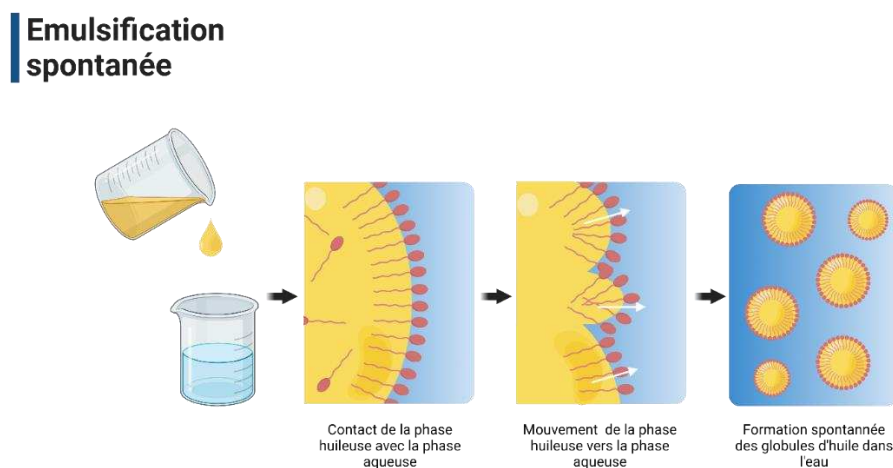


Figure 33 | Processus d'émulsification spontanée. Adapté de Saberi et al.¹³²

¹³⁰ Anton, N., Benoit, J.-P., Saulnier, P. *J. Control Release.* **2008**, 128, 185-199

¹³¹ Miller, C. A. *Colloids Surf.* **1988**, 29, 89-102

¹³² Saberi, A., Fang, Y., McClements, D. J. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 391, 95-102.

- **La méthode de température d'inversion de phase (PIT)** repose sur le comportement des tensioactifs en fonction de la température et s'affranchit de l'utilisation de solvant organique¹³³. Les tensioactifs, non ioniques, utilisés pour cette méthode voient leur affinité pour les différentes phases évoluer en fonction de la température¹³⁴. Lorsque la température est basse, les tensioactifs non ioniques sont hydrophiles en raison de l'hydratation accentuée de leur tête polaire. Lorsqu'elle est élevée, les têtes polaires des tensioactifs sont déshydratées. Ils deviennent alors lipophiles. Le procédé commence donc avec la formation d'une macroémulsion, à une température supérieure à celle d'inversion de phase, de telle sorte que lors du refroidissement du système la nanoémulsion souhaitée soit obtenue. Dans l'optique d'obtenir une NE L/H, la macroémulsion initiale, voit son TA soluble préférentiellement dans la phase huileuse à la température supérieure à celle d'inversion de phase. Une diminution rapide de la température du système provoque le retour du tensioactif dans la phase aqueuse et l'inversion de phase. Bien que cette méthode permette d'éviter l'utilisation de solvant organique, n'est pas adaptée à l'incorporation de molécules thermosensibles.

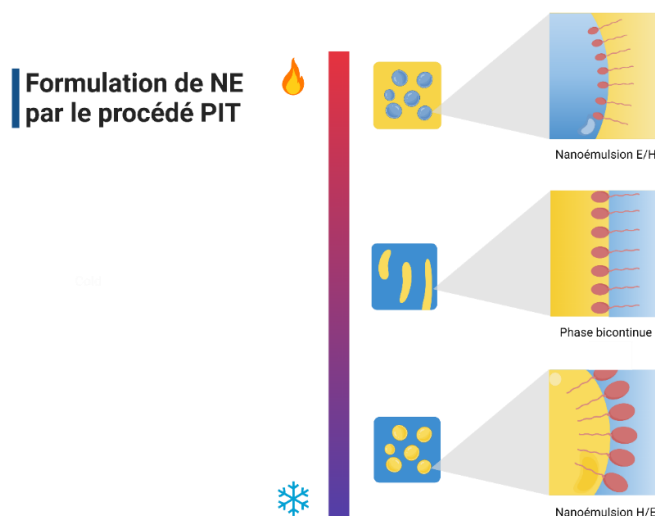


Figure 34 | Principe de la formulation de nanoémulsion par la méthode PIT. Adapté de Solans et Solé.¹³⁴

- **La méthode d'inversion de composition (PIC)** a l'avantage de former des nanoémulsions stables aux globules d'environ 50 nm, sans utiliser de chaleur ni de

¹³³ Shinoda, K., Saito, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1969**, 30, 2, 258-263.

¹³⁴ Solans, C., Solé, I. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, 17, 246-254.

solvant organique¹³⁵. Ces systèmes sont formés, sous faible agitation et à température constante, par lente addition d'eau dans une solution de surfactants dans l'huile. Tout d'abord une microémulsion H/L est obtenue, puis évolue vers une phase bicontinue et enfin la nanoémulsion L/H désirée. Les propriétés de la nanoémulsion obtenue dépendent des propriétés physico-chimiques des composants et du ratio en surfactant présent dans l'huile. Toutefois, la granulométrie de la nanoémulsion obtenue demeure moins homogène et présente une polydispersité plus importante que celle obtenue par suite d'un processus PIT¹³⁶.

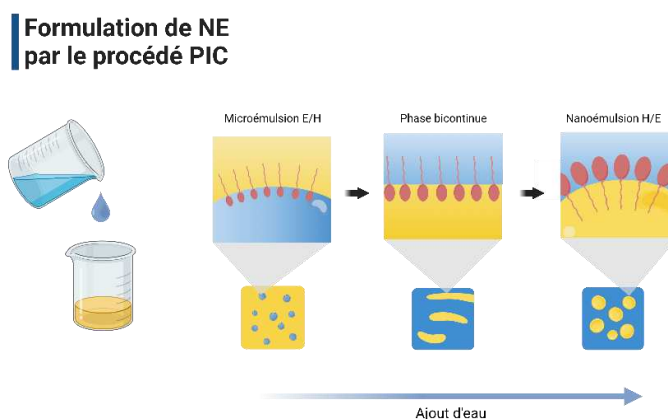


Figure 35 | Principe de la formulation par la méthode PIC. Adapté de Solans et Solé.¹³⁴

- **Les procédés à membrane** ont l'avantage de présenter un cisaillement faible, ce qui peut être utile pour les molécules sensibles¹³⁷. Dans ce processus, la phase dispersée est pressée à travers une membrane vers la phase continue. Les gouttes créées forment une nouvelle interface stabilisée par les TA. Cette méthode peut être réalisée à partir de la phase dispersée ou bien à partir d'une émulsion primaire. L'espacement des pores de la membrane permet le contrôle de la taille des globules formés, tout en permettant l'obtention d'une distribution resserrée des diamètres moyens¹³⁸. Ainsi, des formulations L/H ont pu être formulées à partir d'une membrane en céramique de pore de 100 nm. Le diamètre moyen des globules obtenus étant d'environ 3 fois la taille des pores de la membrane¹³⁹.

¹³⁵ Date, A. A., Desai, N., Dixit, R., Nagarsenker, M. *Nanomedicine*. **2010**, 5, 10, 1595–1616.

¹³⁶ Roger, K., Cabane, B., Olsson, U. *Langmuir*. **2011**, 27, 2, 604-611.

¹³⁷ Rayner, M., Trägårdh, G., Trägårdh, C. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, 266, 1-17.

¹³⁸ Piacentini, E., Driolo, E., Giorno, L. *J. Membr. Sci.* **2014**, 468, 410-422.

¹³⁹ Joscelyne, S. M., Trägårdh, G. *J. Membr. Sci.* **2000**, 169, 107-117.

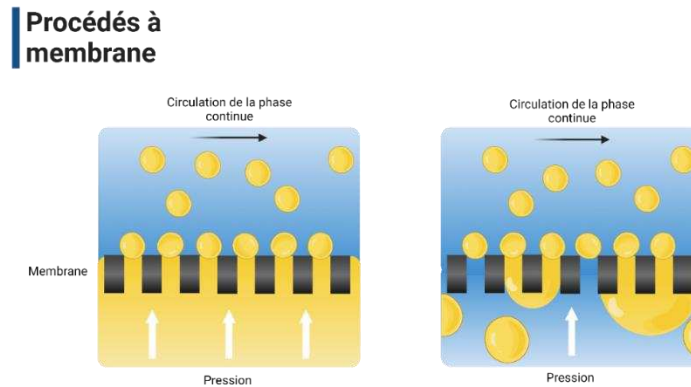


Figure 36 | Procédés de formulation à membrane. À partir de la phase dispersée (à gauche) ou à partir d'une émulsion déjà constituée (à droite). Adapté de Piacentini et al.¹³⁸

4.2. Les méthodes de haute énergie

Les méthodes de haute énergie se réalisent en deux temps. Tout d'abord l'émulsion grossière est généralement préparée par une inversion de phase et un processus d'émulsification à l'aide d'un homogénéisateur haute vitesse. Cet appareil permet la dispersion des deux phases et l'obtention de larges globules. Les globules sont ensuite fragmentés afin d'obtenir des diamètres réduits et la nanoémulsion. Cette dernière étape peut être réalisée par sonication ou bien par homogénéisateur à haute pression¹⁴⁰.

- **L'ultrasonication** repose sur l'utilisation d'ondes ultrasons générées à l'aide d'un générateur¹⁴¹. Cette approche est principalement utilisée sur des faibles volumes. Le générateur transmet un signal électrique à la sonde. Composée de cristaux piézoélectriques, elle convertit ce signal en vibrations physiques, à même de fragmenter les globules de l'émulsion grossière. Les ondes ultrasoniques générées consistent en une alternance de pression et de dépression, produisant un effet de cavitation permettant la diminution de taille¹⁴². En paramétrant le temps de sonication et l'énergie utilisés ainsi que l'impulsion des ondes générées, il est possible d'établir les propriétés de la nanoémulsion souhaitée. Particulièrement adapté à l'échelle du laboratoire, ce processus permet d'obtenir des formulations à partir de très faibles quantités de molécules à

¹⁴⁰ Piorkowki, D. T., McClements, D. J. *Food Hydrocoll.* **2014**, 42, 5-41.

¹⁴¹ Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E., Bibette, J. *Langmuir.* **2011**, 27, 5, 1683-1692.

¹⁴² Bondy, C., Söllner, K. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, 31, 835-842.

encapsuler. Cependant, il n'est pas adapté à la transposition industrielle. Les méthodes à haute pression lui sont alors préférées¹⁴³.

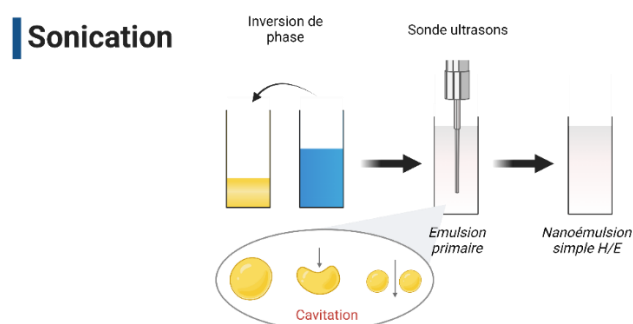


Figure 37 | Processus de sonication permettant la réduction de taille des gouttes d'huile par cavitation. Adapté de Gupta et al.¹²⁴

- Par la méthode de **l'homogénéisation à haute pression (HPP)**, une pompe force la macroémulsion à travers un capillaire étroit sous une pression de 1000 à 2000 bars¹⁴⁴. Le processus met en jeu des forces disruptives intenses (de turbulence, de cisaillement et de cavitation) responsables de la fragmentation globulaire. Par des cycles répétés, la nanoémulsion est obtenue aux globules de diamètre voulu et à la répartition monodisperse recherchée. Cette méthode est la plus utilisée d'un point de vue industriel pour l'obtention des nanoémulsions en raison des volumes importants pouvant être produits, tout en s'affranchissant d'une méthode qui serait opérateur-dépendant.

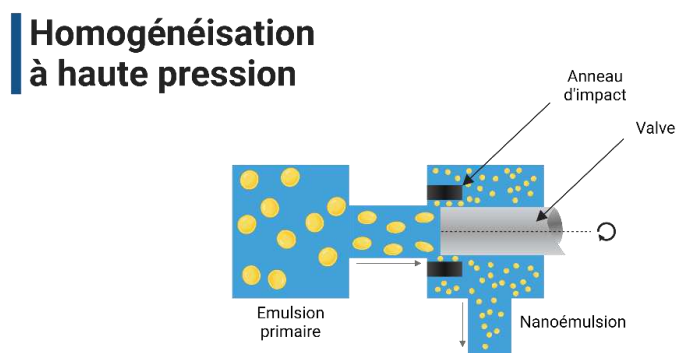


Figure 38 | Méthode d'homogénéisation à valve à haute pression. Adapté de McClements et al.¹⁴⁴

¹⁴³ Samer, C. J., Schork, F. J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, 38, 1801-1807.

¹⁴⁴ McClements, D. J., Rao, J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, 51, 285-330.

Un appareil analogue utilise la pompe à haute pression pour conduire les globules de l'émulsion grossière à travers une chambre d'interaction constituée de microcanaux ¹⁴⁵. De cette façon, les globules sont séparés et conduits à se rencontrer à haute vitesse pour être fragmentés par leurs impacts entre eux.

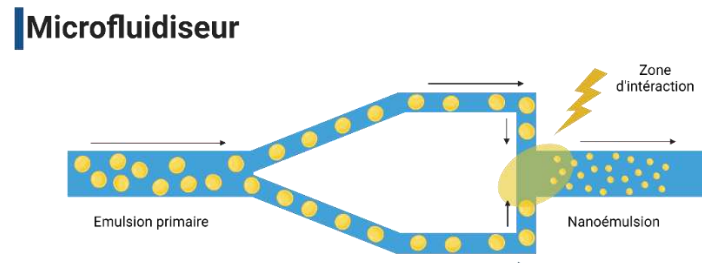


Figure 39 | Principe de la réduction de taille des globules par microfluidiseur. Adapté de McClements et al.¹⁴⁴

5. Caractérisation des nanoémulsions

Outre la détermination du pH de la formulation, de l'osmolalité (en cas d'essai biologique), ou bien de la viscosité du système si cela est pertinent, la caractérisation des systèmes formés ainsi que le suivi de leur stabilité dans le temps sont évalués par observations visuelles et analyses granulométriques.

5.1. Détermination du sens d'émulsion

Afin de déterminer le sens d'émulsion en présence (L/H, H/L), une méthode simple consiste à identifier le type de phase externe par l'étalement sur une surface hydrophile ou l'utilisation d'un colorant hydrophile ou lipophile. Ainsi, une émulsion H/E (huile dans eau) s'étalera sur un substrat hydrophile (comme un papier filtre), tandis qu'une émulsion E/H ne le fera pas. De même, l'ajout d'un colorant liposoluble entraînera la coloration de la nanoémulsion dans le cas d'une dispersion d'huile dans l'eau. L'inverse étant également exact. Le recours à la mesure de la conductivité électrique peut également être envisagée. Il s'agit de la méthode de référence pour déterminer le sens de l'émulsion. En effet, l'eau est un bon conducteur électrique tandis que les huiles ne le sont pas. La mesure permettra de déterminer la nature de

¹⁴⁵ Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., Ulrich, J. *Chem. Eng. Technol.* **2004**, 27, 4, 361-368.

la phase dispersante : ainsi les émulsions H/L sont des isolants électriques, à l'inverse les émulsions L/H sont conductrices.

5.2. Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des NE est fonction des paramètres intrinsèques du système tels le diamètre moyen des globules dispersés. Une observation visuelle permet donc d'apprécier globalement l'émulsification. Une nanoémulsion ayant des globules d'huile de diamètre inférieur à 100 nm, aura un aspect limpide tandis qu'une formulation aux globules de diamètre de 150 nm aura un aspect blanc et laiteux. De plus, l'observation visuelle permet de déceler une possible instabilité et l'apparition d'un phénomène de crémage, de sédimentation ou bien une séparation de phase.

5.3. Analyse granulométrique

Les propriétés des nanoémulsions, ainsi que leur stabilité dans le temps sont fortement dépendantes du diamètre moyen des globules dispersés et de leur indice de polydispersité (*Polydispersity Index* - PdI). Ces mesures peuvent être obtenues par diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering* – DLS)¹⁴⁶. L'analyse en DLS repose sur la variation d'intensité de la diffusion de la lumière d'un laser par les particules du milieu soumises au seul mouvement Brownien¹⁴⁷. Les fluctuations d'intensité détectées, à une température fixée, sont corrélées à la vitesse du mouvement Brownien, lui-même dépendant de la taille des particules. De cette manière, il est possible de calculer le diamètre hydrodynamique à l'aide de la loi de Stokes-Einstein. Le PdI représente l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la répartition granulométrique, fonction de la distribution du diamètre hydrodynamique moyen des globules. Sa valeur est comprise entre 0 et 1. Communément, un PdI inférieur à 0,2 est nécessaire pour qualifier la répartition granulométrique comme monodisperse¹⁴⁸, tandis qu'une valeur supérieure à 0,5 traduit une polydispersité importante.

Cette méthode de caractérisation est la plus répandue pour l'obtention de la granulométrie des nanoémulsions. Elle possède l'avantage d'être rapide, simple à mettre en

¹⁴⁶ Goldberg, W. I. *Am. J. Phys.* **1999**, 67, 12, 1152-1160.

¹⁴⁷ Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., Low, S. C. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8, 381.

¹⁴⁸ Babick, F. Characterisation of Colloidal Suspensions. In *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*, Vol 20; Valverde Millán, Ed.; Springer, 2016; pp 7-74.

place, tout en étant non destructive. Néanmoins, sa résolution ne permet pas de différencier les globules dispersés des potentielles micelles formées ou encore des agrégats de tensioactifs. Une concentration trop importante de l'échantillon à analyser est également à l'origine de résultats erronés dus à une diffusion trop importante. Une dilution de l'échantillon est donc nécessaire.

L'obtention de ces paramètres peut également être obtenue par analyse du suivi individuel de particules (*nanoparticle tracking analysis* – NTA)¹⁴⁹. Comme pour la DLS, l'analyse repose sur le mouvement Brownien des particules en suspension et les propriétés de la lumière diffusée pour obtenir la distribution de taille. Le faisceau laser entraîne la diffusion de la lumière des particules vers un microscope. Les mesures sont donc individuelles et permettent une meilleure détermination du diamètre moyen.

5.4. Détermination du potentiel zêta

L'utilisation de tensioactifs ou l'absorption de molécules chargées présentes dans le milieu dispersant génère une charge de surface des colloïdes en suspension. Le potentiel zêta (ζ) correspond à cette charge. Plus précisément, une particule en mouvement dans un liquide est entourée d'une double couche électrique. Une première couche dense constituée d'ions de charge opposée à la charge en surface de la particule. Une seconde couche électronique diffuse entoure la première. Le potentiel ζ correspond à cette différence de potentiel (**Figure 40**). Il s'agit donc d'un indicateur des forces répulsives.

L'évolution des formulations composées de particules en suspensions tend vers un rapprochement progressif et une agglomération. Des forces répulsives suffisamment importantes sont donc nécessaires pour limiter l'agrégation et conserver une stabilité temporelle. Généralement, il est considéré que des particules dispersées, formant un système stable ont un potentiel ζ inférieur à -20 mV ou supérieur à +20 mV¹⁵⁰. Une mesure comprise entre -10 et +10 mV représente un système considéré approximativement neutre.

Le potentiel ζ est mesuré par l'électrophorèse laser Doppler. La mobilité électrophorétique des particules chargées, soumises à un champ électrique continu permet de déterminer le potentiel ζ des globules.

¹⁴⁹ Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W. *Pharm. Res.* **2010**, 27, 796-810.

¹⁵⁰ Washington, C., Chawlo, A., Christy, N., Davis, S. S. *Int. J. Pharm.* **1989**, 54, 191-197.

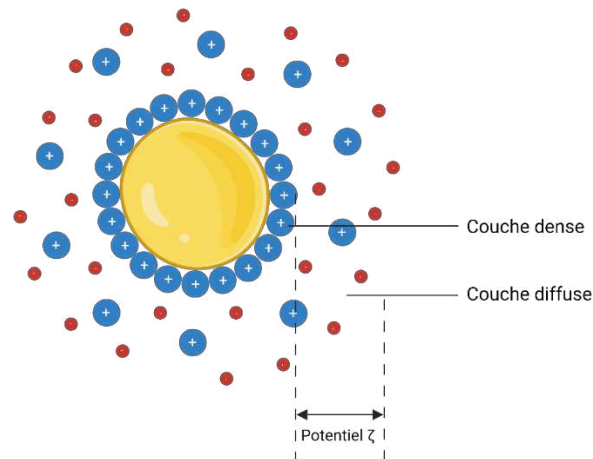


Figure 40 | Représentation du potentiel ζ pour une nanoémulsion L/H chargée négativement.

5.5. L'imagerie au microscope

Une observation au microscope du système est limitée par la taille des particules en suspension. Les microscopes optiques ne permettent pas d'observer des objets de moins de 500 nm. Les nanoémulsions ne peuvent donc être vues uniquement par microscopie électronique à transmission ou à balayage. La cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM – *cryo-Transmission Electron Microscopy*) peut être utilisée pour observer la morphologie des nanoémulsions. En effet, la TEM présente ses limites du fait de son principe qui nécessite l'évaporation du solvant, ce qui peut potentiellement altérer les propriétés morphologiques. La cryo-TEM est réalisée à partir d'un échantillon en solution déposé sur une grille puis plongé dans un bain d'éthane liquide avant d'être placé dans la chambre du microscope. Ces techniques permettent de visualiser les globules dispersés, leur forme et la distribution des globules dans le milieu dispersant.

Chapitre III

Synthèse, formulation et évaluation biologique de nucléolipides acidifiants à visée anti-Parkinsonienne

Le chapitre I a présenté l'intérêt central de la recherche portant sur le développement de stratégies thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives. La prévalence en forte augmentation de ces maladies, leur impact sociétal, ainsi que l'absence de traitement curatif, expliquent l'effort de recherche pour développer des approches thérapeutiques innovantes et efficaces.

Dans le contexte de la maladie de Parkinson, les dysfonctionnements cellulaires menant à la dégénérescence des neurones dopaminergiques sont nombreux et leur interconnexion complexifie l'identification de la cause originelle. Un facteur majeur a tout de même été identifié avec la mise en évidence du dysfonctionnement du lysosome, ce qui donne des perspectives pour une approche thérapeutique contre le développement de la maladie. L'accumulation et le mauvais repliement de la protéine α -synucléine ont été reliés à un dysfonctionnement de l'activité lysosomale. En effet, le lysosome des neurones dits Parkinsoniens présente une augmentation anormale de son pH ce qui est très préjudiciable pour l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation des protéines et en particulier ici, de l' α -synucléine.

Chapitre III

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Benjamin Dehay, neurobiologiste spécialiste de la maladie de Parkinson, la stratégie envisagée vise la restauration de la fonction lysosomale. Notre approche repose sur la synthèse de molécules bio-inspirées, biocompatibles et biodégradables, conçues comme des prodrogues et formulées au sein de nanoémulsions L/H afin d'atteindre le lysosome et d'y délivrer un acide organique exogène dans le but d'abaisser son pH.

Notre choix a porté sur l'utilisation de nucléolipides, bio-conjugués connus pour leur capacité à franchir les membranes biologiques. Un acide organique biocompatible sera porté par le nucléolipide conçu comme une prodrogue. Cette prodrogue sera alors incorporée à une nanoémulsion huile dans l'eau qui aura pour but de véhiculer et de protéger la molécule active lipophile.

Dans un premier temps, ce chapitre va présenter l'intérêt des dérivés d'acides nucléiques et de leurs conjugués lipidiques pour des applications biologiques. Dans un second temps, nous exposerons la synthèse, la formulation et l'évaluation biologique de nos molécules cibles.

1. Les dérivés d'acides nucléiques : molécules d'intérêt thérapeutique

Les dérivés de nucléosides sont connus pour leur capacité à franchir les membranes biologiques. De plus, ce sont des biomolécules aisément fonctionnalisables et compte tenu de l'expertise de l'équipe ChemBioPharm dans ce domaine, les dérivés de type nucléolipides nous sont apparus comme des candidats de choix dans le cadre de ce projet de thèse.

I. Définition et description

Les nucléosides sont des biomolécules et la conception d'analogues nucléosidiques s'inscrit dans une démarche bio-inspirée pour synthétiser des composés qui se veulent biocompatibles. Leur utilisation thérapeutique est déjà répandue avec des applications variées en tant qu'antiviraux, antibactériens, anti-inflammatoires... D'autre part, compte tenu du squelette sucre et de la nucléobase, il est possible de les fonctionnaliser en diverses positions, ce qui permet d'apporter des groupements d'intérêt variés. Au sein des cellules, les acides nucléiques sont primordiaux afin d'assurer la transcription et la traduction génétique, la synthèse protéique, la transmission de l'information génétique. Par leur présence indispensable au sein des systèmes vivants, ils ont rapidement été source d'étude et de recherche pour être utilisés en tant qu'agents thérapeutiques.

Les nucléosides sont les briques élémentaires des acides nucléiques, ce sont des molécules simples, composées d'un pentose, c'est-à-dire un sucre à cinq carbones (un ribose s'il s'agit d'ARN ou désoxyribose s'il s'agit d'ADN), lié à une base azotée (**Figure 41 A.**). La base azotée, peut être purique ou bien pyrimidique. Les pyrimidines sont des molécules hétérocycliques à six atomes, portant deux azotes. Elles comprennent la cytosine (C), la thymine (T), et l'uracile (U) (qui correspond à la thymine, en série ARN). Les purines, sont composées de deux cycles accolés, un groupement pyridine lié à un groupement imidazole. Elles comprennent l'adénine (A) et la guanine (G). Un nucléoside lié à un acide phosphorique en position 5' est un nucléotide.

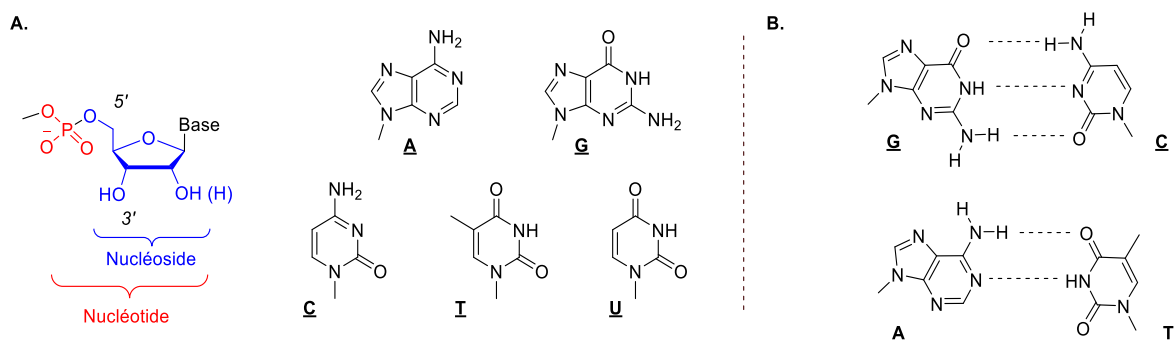


Figure 41 | Représentation des nucléosides (A.) et de l'appariement interbase possible (B.)

Les acides nucléiques sont les macromolécules constituées par l'enchaînement de nucléotides, liés entre eux par une liaison 3'-5'-phosphodiester, en 3' du premier nucléotide et en 5' du second. La série ADN est majoritairement organisée en double brin d'acides nucléiques, tandis que la série ARN n'est constituée que d'un seul brin. La structuration de l'ADN en double brin, et plus précisément en double hélice droite, mise en évidence par Watson et Crick en 1953¹⁵¹ est possible grâce à la complémentarité des bases azotées qui permettent l'appariement (**Figure 41 B.**). En effet, on retrouve sur la partie extérieure de la double hélice, les pentoses et les phosphates, alors que les liaisons hydrogène, entre les bases, sont au centre de l'édifice tridimensionnel. De cette façon, l'adénine se lie à la thymine par deux liaisons hydrogène, et la cytosine se lie à la guanine par trois liaisons hydrogène. Outre les doubles hélices, les acides nucléiques peuvent présenter d'autres structures secondaires¹⁵², sous forme de tige-boucle par exemple.

II. Intérêt thérapeutique des acides nucléiques

Les acides nucléiques offrent de nombreuses possibilités thérapeutiques, sous forme de monomère ou bien sous forme de polynucléosides. Ils permettent également la construction d'assemblages supramoléculaires, ce qui en fait une famille de molécule importante pour les structures artificielles¹⁵³.

Les nucléosides synthétiques les plus simples présentent un grand intérêt dans la mise au point de nouveaux médicaments car des modifications chimiques simples de molécules naturelles originelles peuvent conduire à d'importantes modifications des propriétés

¹⁵¹ Crick, F., Watson, J. *Nature*. **1953**, 171, 737-738.

¹⁵² Sivakova, S., Rowan, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 9-21.

¹⁵³ Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M. W., Barthélémy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6.

biologiques. Les possibilités de modifications sont d'autant plus variées qu'elles peuvent concerner le squelette sucre (ou des analogues), la base azotée ou le groupement phosphate (**Figure 42**). En chimie médicinale, ces modifications visent à conférer une activité biologique à la molécule ou bien, si elle est déjà active, à en améliorer la stabilité, inhiber la dégradation en milieu biologique ou améliorer l'efficacité. De nombreuses publications présentent l'activité biologique de nucléosides ou nucléotides comme antiviraux ou anticancéreux^{154,155,156}. Aussi, seuls quelques exemples choisis illustrant ce potentiel thérapeutique seront présentés ci-dessous.

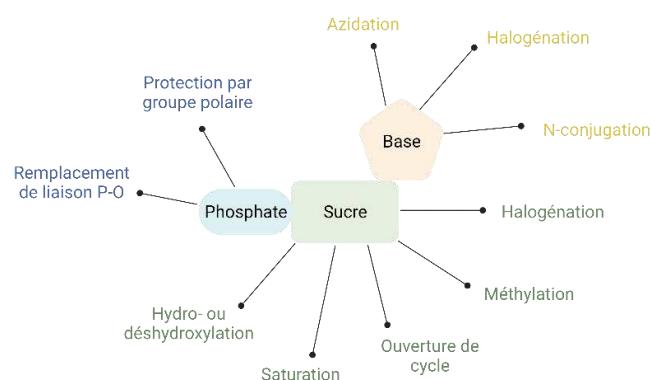


Figure 42 | Modifications chimiques envisageables pour la synthèse d'analogues nucléosidiques.
Adapté de Jordheim *et al*¹⁵⁵.

Les nucléosides ont été particulièrement mis en avant avec le développement de la zidovudine - l'AZT (signifiant l'azidothymidine) - le premier antirétroviral utilisé contre le VIH. Il s'agit d'un analogue de la thymidine substitué en position 3' par un groupement azoture. Au sein des cellules infectées par le virus, l'AZT bloque l'effet de la transcriptase inverse, responsable de la multiplication du virus. En raison de ses effets secondaires et de l'apparition de la résistance virale, des analogues ont été développés. Ainsi, la stavudine, la lamivudine, et l'emtricitabine (**Figure 43**) appartiennent à la classe des antimétabolites et sont aujourd'hui toujours utilisés en association¹⁵⁴. Certains des dérivés nucléosidiques sont connus pour leurs propriétés anticancéreuses. La floxuridine (analogue insaturé et trifluoré sur le méthyl en position 5 de la base azotée de la thymidine), ou bien la gemcitabine (analogue doublement fluoré en position 2' du sucre) (**Figure 43**), sont utilisées dans des chimiothérapies contre les cancers du côlon (floxuridine), du pancréas, des poumons ou du sein (gemcitabine)¹⁵⁶. La

¹⁵⁴ Seley-Radtke, K. L., Yates, M. K. *Antiviral Res.* **2018**, 154, 66-86.

¹⁵⁵ Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 447-464.

¹⁵⁶ Baroud, M., Lepeltier, E., Thepot, S., El-Makhour, Y., Duval, O. *Nanoscale Adv.* **2021**, 3, 2157-2179.

stabilité, leur affinité ou biodisponibilité, des modifications chimiques peuvent être effectuées au niveau des bases azotées, du sucre, ou bien au niveau des liens entre les nucléotides¹⁵⁸.

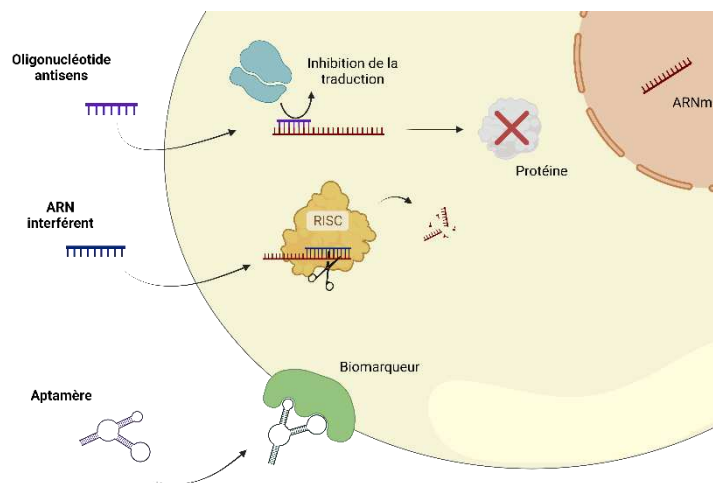


Figure 44 | Stratégies utilisant les oligonucléotides.

Plusieurs oligonucléotides sont commercialisés et la recherche s'intéresse grandement à leur potentiel¹⁵⁹. Le grand public a notamment découvert ces molécules d'intérêt avec la mise au point des vaccins à ARN. En 1998, le fomivirsén a été le premier oligonucléotide commercialisé par *Ionis Pharmaceuticals*, utilisé pour le traitement de rétinite virale chez des patients immunodéprimés. Composée de 21 nucléotides, cette molécule, administrée par injection intravitréenne, se fixe à l'ARN messager de la protéine virale afin d'inhiber sa traduction indispensable à la multiplication du virus. En 2021, *Sarepta Therapeutics* a commercialisé aux Etats-Unis, avec une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) conditionnelle, le casimersén afin de cibler la dystrophie musculaire de Duchenne. Administré en sous-cutané, cet oligonucléotide a conduit à des premiers résultats prometteurs qui devront néanmoins être confirmés.

L'utilisation d'oligonucléotides concerne également les maladies du système nerveux central. Le tominersén est actuellement en essai clinique de phase 3 afin d'étudier son efficacité contre la maladie d'Huntington. Cette maladie neurodégénérative, aux mécanismes encore peu élucidés, n'a à ce jour aucun traitement curatif. L'oligonucléotide développé par *Ionis Pharmaceuticals* et Roche cible le gène codant pour la protéine Huntingtine, muté dans le cas

¹⁵⁸ Crooke, S. T., Witztum, J. L., Bennett, C. F., Baker, B. F. *Cell Metabolism*. **2021**, 27, 714-739.

¹⁵⁹ Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., van der Meel, R. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, 16, 630-643.

de la maladie, pour inhiber sa transcription. Malgré des premiers résultats prometteurs, des réserves commencent à être émises, Stoker *et al.* ayant relevé en 2021 chez un patient traité, des complications de type hydrocéphalie, engendrant une pression intracrânienne anormale¹⁶⁰.

III. Les nucléolipides : des hybrides combinant les avantages des acides nucléiques et des lipides

Les nucléolipides (NLs), dont le terme a été introduit pour la première en 1978 par Hynie et Smrt¹⁶¹, sont des molécules hybrides amphiphiles. Les NLs sont composés d'une partie acide nucléique (nucléobase, nucléoside, nucléotide ou oligonucléotide), hydrophile et d'une partie lipidique hydrophobe, ce qui leur confère des propriétés particulièrement intéressantes issues de ces deux familles de biomolécules. Certains nucléolipides naturels présentent des propriétés antifongiques, antivirales, antimicrobiennes et antitumorales¹⁵³.

1. Nucléolipides naturels

Les premiers nucléolipides naturels¹⁶² ont été découverts dès les années 50 avec la mise en évidence du rôle de la cytidine diphosphate-diacylglycérol comme intermédiaire dans la biosynthèse des glycolipides et des lipoprotéines. Les tunicamycines sont, quant à elles, des molécules nucléolipidiques isolées des bactéries *Streptomyces lysosuperficus* qui présentent des propriétés antibiotiques. Elles agissent par inhibition de l'enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT) et donc de la N-glycosylation des protéines. Plus particulièrement, les tunicamycines inhibent, dans la synthèse oligosaccharide centrale la structure et la fonction protéique au sein des cellules eucaryotes. Les liposidomycines, également issues de bactéries présentent une activité antibiotique en inhibant la translocase *MraY* essentielle à la survie de la bactérie. En effet, cette enzyme transmembranaire est impliquée dans la biosynthèse des peptidoglycanes composant la paroi bactérienne.

¹⁶⁰ Stoker, T. B., Andresen, K. E.R., Barker, R. A. *Mov. Disord.* **2021**, 36, 263-264.

¹⁶¹ Hynie, S., Smrt, J. *Febs lett.* **1978**, 94, 339–341.

¹⁶² Rosemeyer, H. *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 977-1062.

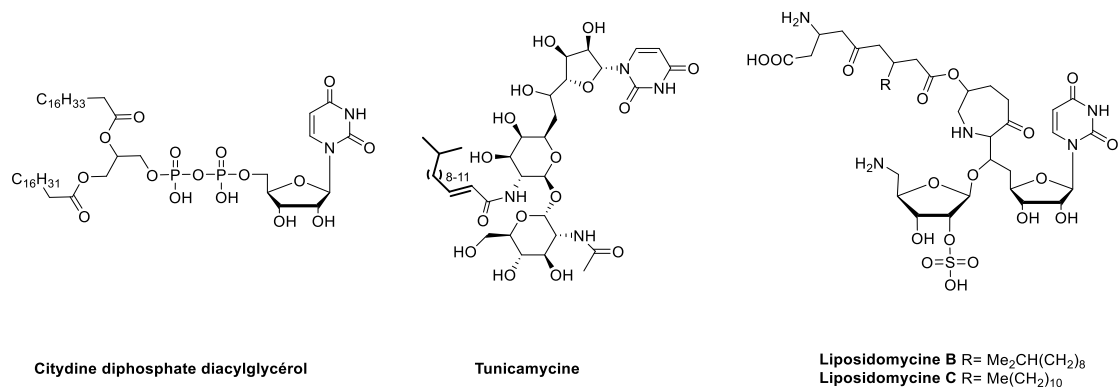


Figure 45 | Nucléolipides naturels à activité biologique.

La conjugaison d'un lipide avec des analogues nucléosidiques leur confère un caractère amphiphile, ce qui est à l'origine de l'intérêt porté à ces composés par les chimistes de synthèse. Parmi les propriétés des hybrides nucléolipidiques, on peut citer une capacité de passage membranaire (dont potentiellement la BHE) ainsi qu'une augmentation de la biodisponibilité orale, comparé au nucléo(si)tide homologue¹⁶³. En effet, les nucléosides peuvent conduire à une pénétration cellulaire limitée ou être rapidement éliminés. Des structures synthétiques bioinspirées des molécules naturelles présentent un potentiel immense compte tenu des possibilités de variation des structures sur chaque partie de la molécule. Le caractère lipophile peut ainsi être modulé avec la nature et la longueur de la chaîne lipidique. En effet, celle-ci peut être monocaténaire, bicaténaire, tricaténaire, saturée, insaturée ou bien même polycyclique. Les nucléolipides synthétisés peuvent être dérivés de nucléobases, nucléosides, nucléotides ou oligonuléotides et être neutres ou chargés. Ces hybrides amphiphiles présentent également des propriétés d'autoassemblages remarquables permettant leur utilisation pour des applications dans des domaines variés, dont biomédicaux¹⁶⁴.

2. Lipidisation de molécules connues pour moduler leur activité biologique

Tout d'abord, l'insertion d'une moitié lipidique sur une molécule active connue peut-être envisagée comme une pharmacomodulation pour en accroître l'activité thérapeutique. Par exemple, la didanosine (ddI) a fait l'objet d'une optimisation structurale dans un souci d'amélioration thérapeutique¹⁶⁵. En effet cette molécule, qui vise à réduire la charge virale chez

¹⁶³ Alexander, P., Kucera, G., Pardee, T. S. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, 100, 46-56.

¹⁶⁴ Baillet, J., Desvergnès, V., Hamoud, A., Latxague, L., Barthélémy, P. *Advanced Materials.* **2018**, 30, 1–24.

¹⁶⁵ Lalanne, M., Paci, A., Andrieux, K., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P., Deroussent, A., Ré, M., Vassal, G., Couvreur, P., Desmaële, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2237-2240.

les patients touchés par le VIH, présente une faible biodisponibilité (environ 30%) et une mauvaise absorption orale car elle est rapidement dégradée par les acides digestifs. De plus, pour être active la didanosine doit subir, par les kinases de la cellule hôte, trois phosphorylations successives sur sa position 5' ; la première étant une étape limitante. La pharmacomodulation de la ddI a donc été pensée pour limiter le premier passage hépatique, améliorer la biodisponibilité du composé et également pour catalyser la phosphorylation de la molécule. Pour cela, un premier composé **1** a été obtenu par insertion de triglycérides 1,3-dipalmitoyl en position 5' par un espaceur succinate. En effet, les triglycérides sont connus pour contourner le passage hépatique. De plus, les triglycérides portant des chaînes carbonées en C16 sont majoritaires dans les nutriments. L'insertion d'un monophosphate entre la didanosine et le triglycéride, pour contourner la difficulté de la première phosphorylation *in vivo*, a conduit au composé **2**. L'ajout d'une partie lipidique a donc permis d'obtenir les composés **1** et **2** (**Figure 46**) qui ont présenté des propriétés biologiques similaires à celles de la didanosine tout en conservant leur innocuité. Si le composé **1** exerce une efficacité contre le VIH similaire à celle obtenue avec la ddI, le composé **2**, lui, est moins efficace. La molécule nécessite une concentration de 28.5 μM pour aboutir à une dose efficace médiane, contre environ 2 μM pour la ddI et **1**. Ces deux composés présenteraient par ailleurs une meilleure biodisponibilité.

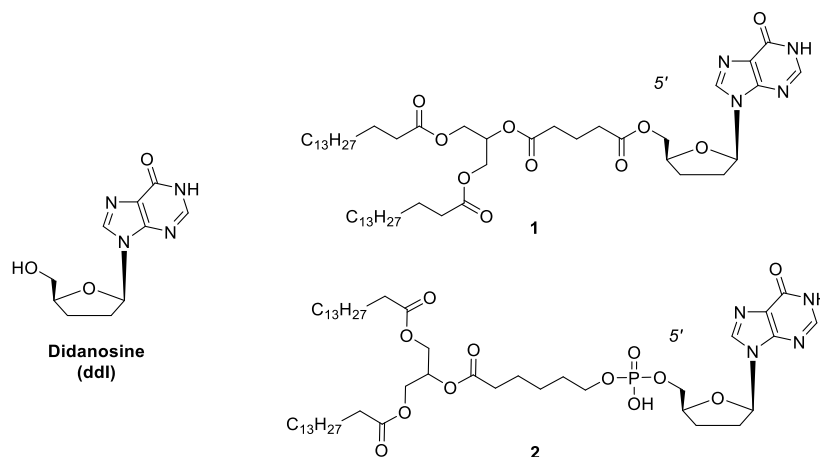


Figure 46 | Conjugaison lipidique sur un analogue nucléosidique. Exemple de la didanosine.

La gemcitabine, déjà citée, est utilisée en traitement contre le cancer du poumon et le cancer du pancréas et a également fait l'objet de modulations de sa structure par conjugaison avec un lipide en position 5'¹⁶⁶. Une pharmacomodulation de cette substance active a été

¹⁶⁶ Ali, S. M., Khan, A. R., Ahmad, M. U., Chen, P., Sheikh, S., Ahmad, I. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2571–2574.

envisagée en raison de sa dégradation rapide *in vivo*, de son absorption limitée, de sa faible biodisponibilité ou encore de sa toxicité. Ainsi Ali *et al.* ont synthétisé le conjugué NEO6002 (**Figure 47**) à partir d'un analogue d'éther de cardiolipide. Ce phospholipide est naturellement retrouvé au niveau cardiaque et musculaire et est un composé important de certaines membranes. Evalué *in vitro* sur des cellules tumorales humaines pancréatiques, le composé NEO6002 a conservé l'activité anticancéreuse tout en ayant une toxicité plus faible que le nucléoside. En 2006, une étude complémentaire de la même équipe a évalué NEO6002 *in vivo* démontrant une tolérance accrue comparée à celle de la gemcitabine¹⁶⁷. Par ailleurs, la survie de souris avec lymphome a été améliorée jusqu'à 73% à la dose de 27 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ tandis que la même dose de gemcitabine induisait une toxicité fatale. Sur une lignée de souris avec tumeur pancréatique, NEO6002 a permis d'inhiber le processus tumoral de 52% à une dose de 18 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ tandis qu'il n'est inhibé que de 32% avec la gemcitabine. Ainsi, la conjugaison du nucléoside avec un lipide a permis de modifier les propriétés biologiques de ce composé en améliorant la tolérance au traitement ainsi que son efficacité.

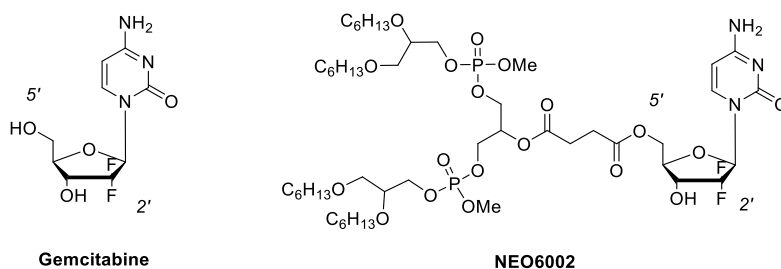


Figure 47 | Conjugaison lipidique sur un analogue nucléosidique. Exemple de la gemcitabine.

Sur un plan biologique, les hybrides nucléolipides présentent donc des avantages pour améliorer la biodisponibilité et l'efficacité thérapeutique en augmentant notamment la capacité des composés conjugués ou véhiculés à passer les membranes cellulaires. En 2019 Swastika *et al.* ont développé un nucléolipide radio-traceur pouvant atteindre le SNC¹⁶⁸ en franchissant la BHE, précédent particulièrement intéressant pour notre étude. Une gamme de radiotraceurs nucléosidique, développée majoritairement à partir de la thymidine ou de l'uridine, est utilisée en clinique pour l'imagerie cancéreuse. C'est par exemple le cas du 1-(2-fluoro-2-deoxy-3,5- β -D-arabano-furanosyl)-5-[⁷⁶Br]bromouracil ([⁷⁶Br]FBAU). Ces molécules présentaient

¹⁶⁷ Chen, P., Chien, P-Y., Khan, A. R., Sheikh, S., Ali, S. M., Ahmad, M., Ahmad, I. *Anticancer Drugs*. **2006**, 17, 53-61.

¹⁶⁸ Swastika, Chaturvedi, S., Kaul, A., Hazari, P. P., Jha, P., Pal, S., Lal, S., Singh, B., Barthélémy, P., Mishra, A. K. *Int. J. Pharm.* **2019**, 565, 269-282.

cependant une incapacité à franchir la BHE. En 2002, Kao *et al.* ont ainsi modifié le [⁷⁶Br]FBAU pour incorporer une partie lipophile en insérant notamment des groupements benzoates en positions 3' et 5' du [⁷⁶Br]FBAU, ce qui a permis d'accroître significativement *in vivo* le passage de la BHE^{169,164,170}. De nouveaux radiotraceurs nucléolipidiques ont ainsi été étudiés. Swastika *et al.* ont synthétisé un dérivé de l'uridine portant une double chaîne lipidique en C15 dans l'objectif de promouvoir l'absorption au niveau cérébral. La position 5' du nucléolipide a été conjuguée à un chélateur de l'isotope radioactif ^{99m}Tc (**Figure 48**), qui a permis de suivre la distribution de la molécule chez la souris. La biodistribution évaluée *in vivo* a mis en évidence, à la suite d'une injection systémique, une augmentation de la pénétration cérébrale lors de l'utilisation du composé **4** comparé au composé similaire isopropylidène **3**, non lipidisé : la quantité en molécule injectée retrouvée au niveau cérébral passe ainsi de 0.06% pour le composé **3** à 0.19%.

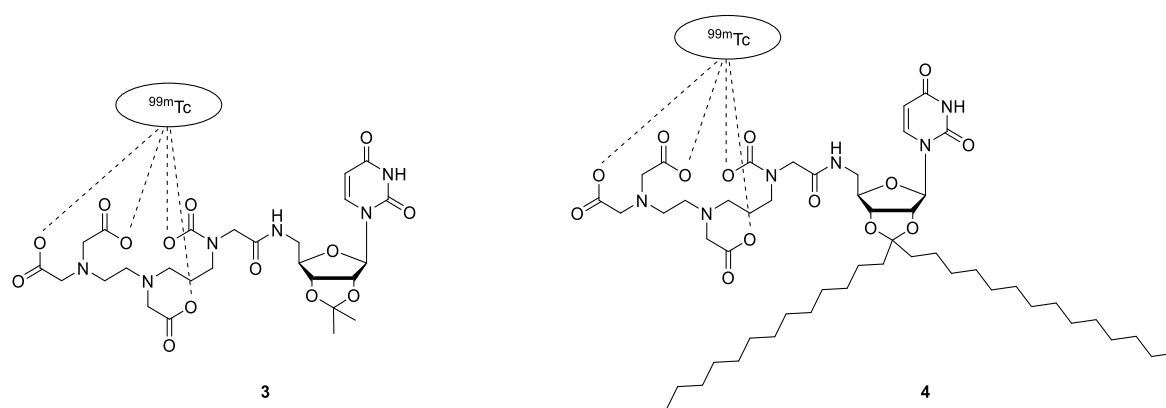


Figure 48 | Modification lipidique d'un nucléoside pour promouvoir l'absorption cérébrale.

Il est essentiel de noter que ces pourcentages demeurent faibles en raison d'une accumulation importante et majoritaire au niveau du foie, au niveau rénal et dans une moindre proportion au niveau de la rate. Cette accumulation prévisible suit les voies de métabolisation et dégradation, et elle pourrait être modifiée par le développement d'une formulation galénique adaptée. En effet, comme cela a été discuté dans le chapitre II, une formulation galénique convenablement choisie en fonction de la cible biologique et du mode d'administration permet également, en protégeant et véhiculant les molécules actives, d'améliorer significativement la biodisponibilité et la biodistribution.

¹⁶⁹ Kao, C-H. K., Waki, A., Sassaman, M. B., Jagoda, E. M., Szajek, L. P., Ravasi, L., Shimoji, K., Eckelman, W. C. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, 29, 527-535.

¹⁷⁰ Zaro, J. L. *AAPS J.* **2014**, 17, 83-92.

3. Conception de nucléolipides comme agents de transfection

La DOTAU (*N*-[5'-(2',3'-dioleoyl)uridine]-*N,N,N'*-triméthylammonium tosylate) est un nucléolipide dérivé de l'uridine¹⁷¹. Cette molécule a été développée dans le but d'accroître l'activité de transfection en introduisant des liaisons hydrogène et de π -stacking avec l'ADN. Les agents de transfection développés jusqu'alors ne mettaient en jeu que des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes. La modulation de ces interactions a été pensée dans le but d'obtenir une transfection optimisée, tout en réduisant la cytotoxicité des vecteurs utilisés. La DOTAU est un nucléolipide qui peut être facilement obtenu avec de bons rendements en seulement quatre étapes à partir de la 2',3'-isopropylidène uridine (**Figure 49**). Sa structure fait de ce composé une molécule amphiphile, capable de s'autoorganiser. Plus spécifiquement, la DOTAU a été développée de sorte à pouvoir interagir avec des brins d'ADN de sorte à permettre la transfection de gènes. Il y a formation de lipoplexes par génération de liaisons hydrogène *via* des interactions de Watson-Crick. L'ammonium permet l'interaction avec les phosphates et les chaînes lipidiques ont été introduites pour permettre de franchir les membranes biologiques. Les essais *in vitro* ont mis en évidence la capacité de la DOTAU à transférer efficacement les cellules avec une faible quantité de gènes.

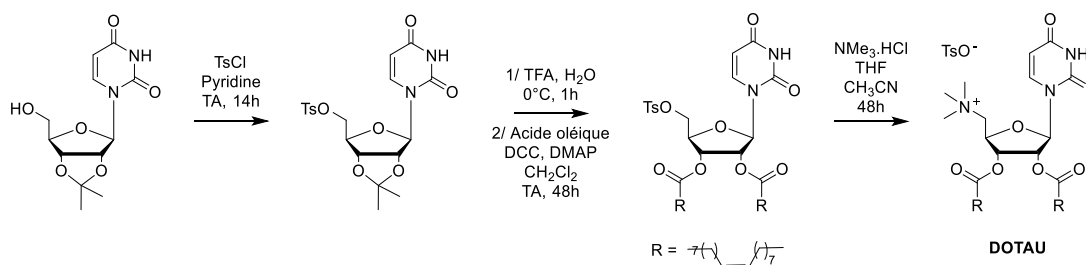


Figure 49 | Synthèse multi-étapes de la DOTAU.

Cette molécule présente cependant une toxicité cellulaire, comme beaucoup de lipides cationiques utilisés pour la transfection. La charge positive de l'ammonium quaternaire engendre une possibilité de lyse des membranes. Pour pallier ces défauts, des systèmes alternatifs, anioniques, zwitterioniques ou non-ioniques ont également été développés¹⁷² et le

¹⁷¹ Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., Serin, G., Moreau, L., Barthélémy, P., Grinstaff, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 466-472.

¹⁷² Khiati, S., Pierre, N., Andriamanarivo, S., Grinstaff, M. W., Arazam, N., Nallet, F., Navailles, L., Barthélémy, P. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1765-1772.

recours à un lipoplexe est le système (non viral) le plus utilisé à ce jour dans le cadre des essais portant sur la thérapie génique.

4. Cas des oligonucléotides-lipides

De la même façon que les monomères, les oligonucléotides peuvent être fonctionnalisés par l'introduction d'un lipide au sein de leur séquence¹⁷³. En sus de leurs propriétés de reconnaissance de séquence d'acides nucléiques, l'insertion d'un lipide leur confère alors la possibilité de s'auto-assembler en liposomes ou en micelles. Cela peut leur permettre de servir de véhicules pour des substances actives. Par ailleurs, de la même façon que dans le cas des nucléosides, leur capacité à franchir les membranes biologiques est améliorée par la conjugaison lipidique, leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique également. L'équipe de Philippe Barthélémy, spécialiste de la chimie des oligonucléotides thérapeutiques et des dérivés nucléolipidiques a notamment récemment développé des oligonucléolipides dans une approche thérapeutique contre l'antibiorésistance. L'antibiorésistance résulte par exemple, dans le cas des antibiotiques de la classe des pénicillines, de l'expression de gène codant pour des β -lactamases. Le développement d'oligonucléotides pouvant s'hybrider avec les ARNm correspondants permet d'inhiber l'expression du gène. Cette stratégie prometteuse est limitée par l'internalisation cellulaire des oligonucléotides. En 2020, il a été rapporté une modification lipidique de séquences d'oligonucléotides pour améliorer ce point crucial¹⁷⁴. Des conjugués comportant une modification lipidique en 3' ou en 5' (**Figure 50**) ont été synthétisés et leur efficacité a été évaluée sur des bactéries *Escherichia coli* en déterminant la concentration d'inhibition d'une céphalosporine, la Ceftriaxone. L'amélioration de leur internalisation cellulaire a permis de limiter l'antibiorésistance. En effet, les séquences étudiées ont conduit, après une internalisation dans la bactérie, à la diminution de près de 50% de la quantité en β -lactamases produite. Il en a résulté une diminution de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la Ceftriaxone de 25 fois en comparaison aux bactéries exposées aux analogues non lipidiques.

¹⁷³ Li, X., Feng, K., Li, L., Yang, L., Pan, X., Yazd, H. S., Cui, C., Li, J., Moroz, L., Sun, Y., Wang, B., Li, X., Huang, T., Tan, W. *Natl. Sci. Rev.* **2020**, 7, 1933-1953.

¹⁷⁴ Kauss, T., Arpin, C., Bientz, L., Nguyen, P. V., Vialet, B., Benizri, S., Barthélémy, P. *Sci. Rep.* **2020**, 10.

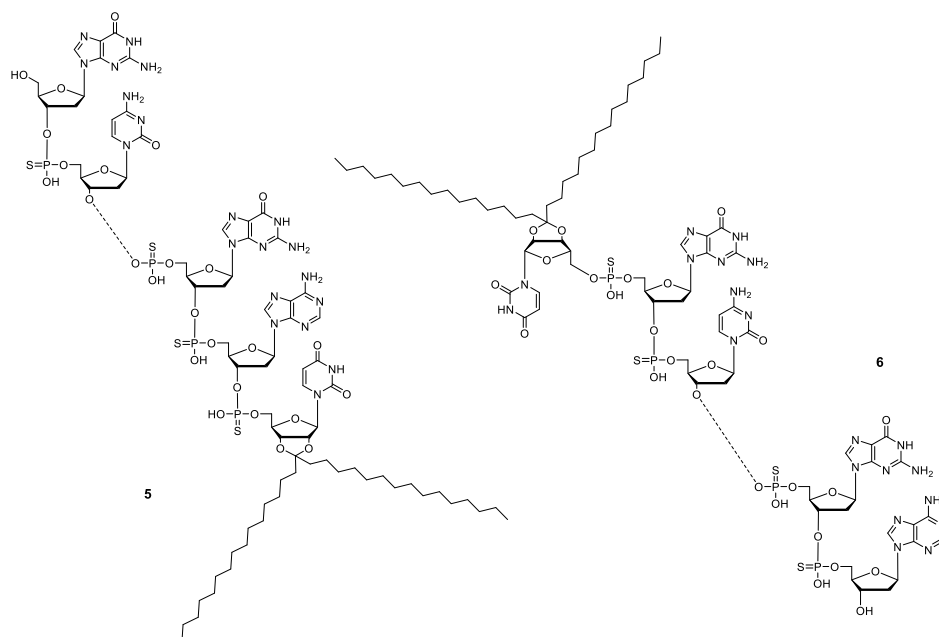


Figure 50 | Exemple de structures chimiques des oligonucléotides portant une partie lipidique en 3' (gauche) ou en 5' (droite) avec une des séquence étudiée.

Ces quelques exemples ont pour but de montrer l'intérêt des nucléolipides, tant pour leurs propriétés biologiques intrinsèques que pour leur capacité à franchir les membranes biologiques et donc à être un véhicule pour une entité active. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, notre stratégie s'appuie sur la double expertise du laboratoire, à savoir la conception et la synthèse chimique des nucléolipides et la formulation des nanosystèmes de type nanoémulsions. Il s'agit donc de concevoir et synthétiser des nucléolipides prodrogues pour réacidifier les lysosomes des neurones dopaminergiques impliqués dans la maladie de Parkinson. Pour favoriser l'internalisation cellulaire de nos molécules, les nucléolipides ont été formulés au sein de nanoémulsion L/H, ayant montré leur intérêt comme véhicule en vue d'un passage de la BHE⁹⁶.

2. Travaux préliminaires et preuves de concept

I. Travaux préliminaires sur la réactivité de la thymidine silylée

Pour l'obtention de notre molécule prodrogue acide, une première voie de synthèse a été initiée. Ayant au laboratoire des stocks d'intermédiaires thymidine silylés en 3', composé **7** ou en 5', composé **10**, nous avons travaillé sur la benzylation en *N3* de ces composés en utilisant un micro-onde de paillasse. En effet, des travaux préliminaires avaient mis en évidence que les réactions pouvaient être sélectives et beaucoup plus rapides¹⁷⁵. Une première étape a été réalisée dans des conditions décrites dans la littérature, en présence de NaH dans le DMF. Toutefois, la RMN ¹H du brut réactionnel a mis en évidence la présence de deux produits benzylés et silylés que nous avons supposé être les composés **9** et **12**, produits issus de la migration du groupement silylé sur le OH libre (**Figure 51**). Cette hypothèse a été faite sur la base de résultats antérieurs du laboratoire.

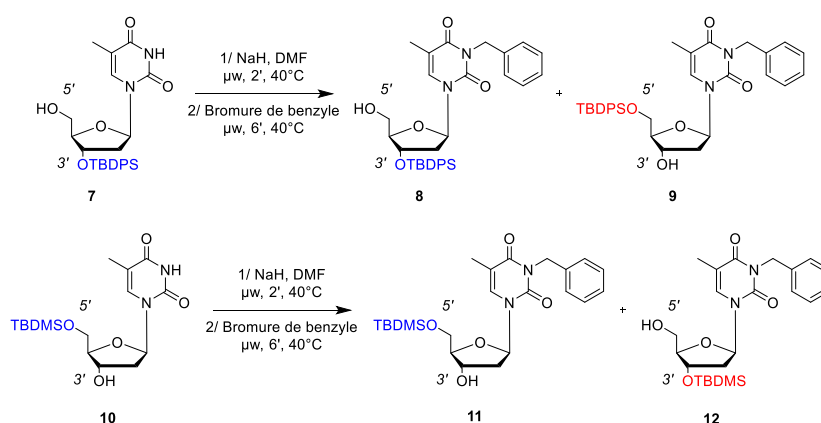


Figure 51 | Réaction de benzylation au micro-onde ayant engendré une migration de groupements silylés.

En effet, Ludovic Saussieau, lors de son stage de master 2, avait également mis en évidence la formation d'un produit secondaire lors de la réaction d'allylation sélective de thymidines silylées, suivant des conditions micro-ondes développées au laboratoire¹⁷⁶ (**Figure 52**). Lorsque la thymidine protégée en position 3' par un éther silylé **7** a été soumise à une activation par micro-ondes, en milieu basique (présence de 2.5 eq de NaH dans le THF), 9% du composé silylé en position 5' et allylé en position 3' **14** a été isolé. Ce sous-produit s'ajoute aux bis-allylation 5' et *N3*, ou encore 3' et *N3*, résultant de l'excès de bromure d'allyle utilisé. De même, lorsque la thymidine 5' tertbutyldiméthylsilylée **10** a été soumise aux mêmes conditions de

¹⁷⁵ Hamoud, A., Barthélémy, P., Desvergnès, V. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 1760-1769.

¹⁷⁶ Saussieau, L. Stage de Master 2, **2015**.

réaction, 4% de sous-produit **16** silylé en position 3' et allylé en position 5' a été récupéré. De manière étonnante, une telle obtention de sous-produits n'a pas été observée lorsque cette même réaction a été réalisée sur paillasse, dans des conditions de concentration et de quantité de réactifs équivalentes. Les conditions utilisant les micro-ondes semblent donc jouer un rôle central dans cette réactivité.

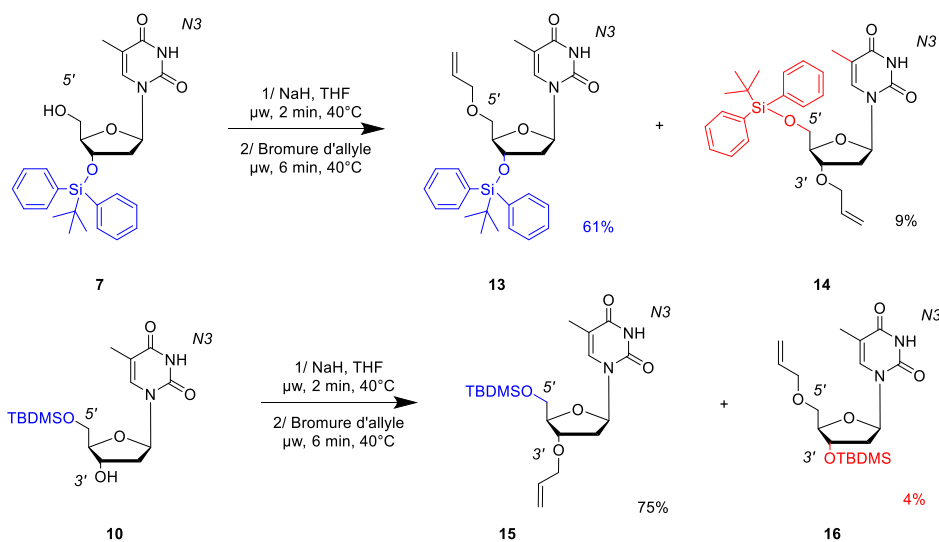


Figure 52 | Réactions d'allylation dans des conditions au micro-onde, lors desquelles des sous-produits inattendus ont été obtenus.

La migration de groupements protecteurs silylés n'est pas un fait nouveau et a été rapportée dans des conditions basiques et dans un solvant protique dans le cas de migrations 1,2 et 1,4 sur des diols¹⁷⁷ ou 1,3 sur du glycérol¹⁷⁸. Un exemple de sucre est à noter avec des migrations 1,4 d'un groupement silylé du carbone C4 vers le carbone C3 d'un pyranose substitué¹⁷⁹. En revanche un seul exemple de migration sur un squelette furanose a été rapporté et il s'agit comme dans notre cas d'une migration 1,5 de groupement silylé¹⁸⁰. Concernant les nucléosides portant donc un furanose, la migration de TBDMS en série ARN de la position 2' vers 3' est largement connue.¹⁸¹ Ces réactivités sont donc à prendre en compte lors des étapes de substitutions spécifiques et de protection-déprotection d'hydroxyles. Le plus souvent, cette réactivité n'est pas souhaitée et peut donc poser un problème. En série ADN, les fonctionnalisations requièrent également ces étapes de protection et déprotections des positions

¹⁷⁷ Mori, Y., Futamura, Y., Horisaki, K. *ACIE*. **2008**, 47, 1091.

¹⁷⁸ Peters, U., Bankova, W., Welzel, P. *Tetrahedron*. **1987**, 43, 3803.

¹⁷⁹ Zhou, M., O'Doherty, G.A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 2283-2286.

¹⁸⁰ Furegati, S., White, A. J. P., Miller, A.D. *Synlett*. **2005**, 15, 2385-2387.

¹⁸¹ Somoza, A. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 2668-2675.

3' et 5'. Ces positions sont plus éloignées l'une de l'autre, que les positions 2' et 3' ne le sont, en raison de leur stéréoisomérie *trans*.

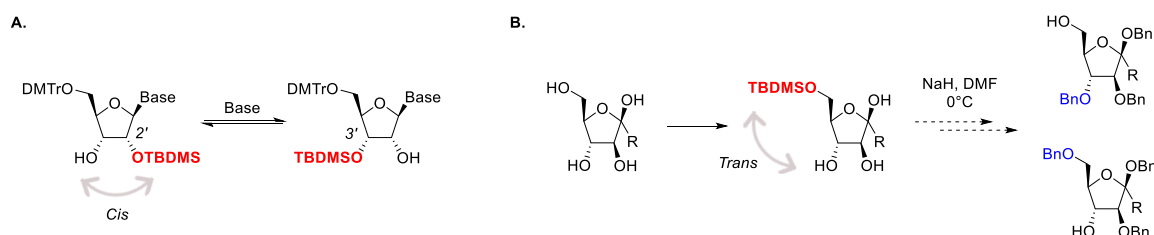


Figure 53 | Exemples de migration de groupements silylés déjà rapportés. A. Migration 2'-3' sur un ribose¹⁸¹. B. Migration 1,5 sur un fructose durant une O-benzylation¹⁸⁰.

Au vu de cette réactivité inattendue, nous avons étudié ce processus de migration 1,5 et les conditions qui le favorisent.

Pour investiguer l'influence des paramètres, tels que la température d'activation, le solvant de réaction ou bien le groupe silylé, nous avons uniquement opéré l'étape d'activation en milieu basique, avant d'ajouter, non plus un électrophile de type bromure d'allyle ou bromure de benzyle mais une solution aqueuse saturée de NH_4Cl au milieu réactionnel. Nous avons effectué la réaction sur le substrat silylé en 3' faisant l'hypothèse raisonnable que le composé en 5' serait le produit thermodynamique.

Nous avons ainsi réalisé l'étude en utilisant trois groupements protecteurs silylés différents : tertbutyldiphénylsilyle, tertbutyldiméthylsilyle et le triisopropylsilyle et ce, dans le THF et le DMF (à une concentration $c = 0.2 \text{ M}$). La température de réaction a également été modulée, allant de 40°C jusqu'à 120°C (**Figure 55**). La RMN ^1H des différentes réactions a montré des protons anomériques discriminables mettant ainsi aisément en évidence la migration. Le ratio d'un composé par rapport au second a pu être mesuré par intégration sur la RMN ^1H du brut réactionnel (**Figure 54**).

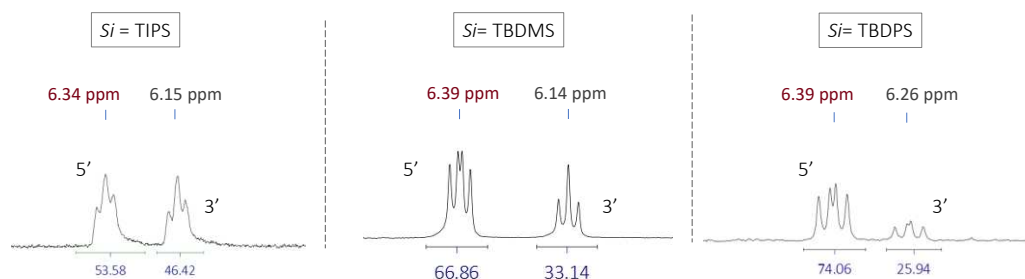


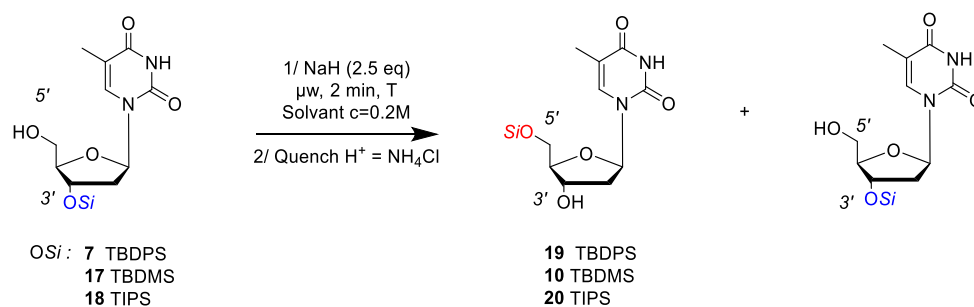
Figure 54 | Spectres RMN ^1H 300 MHz, CDCl_3 : Mise en évidence des migrations de groupement silylé de la position 3' vers la position 5' dans le DMF (NaH, pendant 2 minutes).

De façon générale, pour les trois groupements protecteurs la migration de la position 3' vers la position 5' s'est avérée d'autant plus importante que le solvant est le DMF et lorsque la température augmente. Ainsi, à partir du composé **7**, par suite de l'activation au micro-ondes à 40°C, nous avons obtenu 7% de produit de migration dans le THF tandis qu'à la même température, il y en a 75% dans le DMF, ce qui constitue d'ailleurs le maximum de produit silylé en 5' qui a été obtenu quelle que soit les conditions de réaction. Dans le cas du composé **17**, la tendance est la même mais dans le DMF la migration s'opère plus lentement que pour le tertbutyldiphénylsilyle, composé **7**. Dans ce cas également le maximum de produit obtenu sera de l'ordre de 75%, ce qui montre que l'équilibre n'est jamais totalement déplacé.

Le composé **18** TIPS dans le THF semble être le cas le moins favorable à la migration conduisant au maximum de 18% de composé silylé en 5'. Dans le DMF la réaction semble moins rapide que pour les deux autres substrats mais elle atteint, comme dans les autres cas, un maximum de l'ordre de 75% à 120°C.

L'impact du groupement utilisé est clair mais reste difficile à rationaliser si on tient compte notamment de la taille du groupement car la tendance n'est pas la même en fonction du solvant de réaction.

La migration du TBDPS de 3' vers 5' a également été étudiée dans le dioxane. Ce groupement silylé a été sélectionné car il présente le taux de migration le plus important. Dans le dioxane, aucune migration n'a été observée à 40°C ou 60°C. Il a fallu chauffer à 80°C pour observer une faible migration, de 3%, qui n'augmente pas significativement lorsque l'activation se fait à 120°C.



OSi	Température	Solvant	5' %	3' %
 7	40°C	THF	7	93
	60°C		11	89
	80°C		15	85
	120°C		25	75
	40°C	DMF	75	25
	60°C		74	26
	80°C		75	25
	120°C		Major*	-
 17	40°C	THF	-	100
	60°C		7	93
	80°C		26	74
	120°C		35	65
	40°C	DMF	38	62
	60°C		61	39
	80°C		68	32
	120°C		74	26
 18	40°C	THF	-	100
	60°C		-	100
	80°C		14	86
	120°C		18	82
	40°C	DMF	-	100
	60°C		14	86
	80°C		53	47
	120°C		76	24

Figure 55 | Effet de la température et du solvant sur la migration de groupement silylé de la position 3' vers 5'.

Les résultats précédents montrent un impact déterminant du solvant lors de la réaction assistée aux micro-ondes. Le principe même du micro-onde repose sur l'alignement des dipôles de molécules sous l'action de l'oscillation du champ émis, engendrant des rotations, des frottements et donc de l'énergie thermique. Cette méthode de chauffage par la création de points chauds au sein du milieu réactionnel implique un rôle important des constantes diélectriques des solvants de réaction. La constante diélectrique reflète la capacité que le solvant a à séparer les charges ; la constante dipolaire dépend elle de la distance entre deux charges. Le $\tan \delta$ donne une tendance de la capacité du solvant à être efficacement chauffé lors de la réaction sous micro-ondes, c'est-à-dire, sa capacité à convertir en chaleur l'énergie électromagnétique émise. Aussi, en regard des constantes diélectriques et dipolaires, nous pouvons avoir un début d'explication

sur ce phénomène de migration. Les trois constantes pour chacun des solvants utilisés, présentés en **Tableau 4**, sont plus importantes pour le DMF. Ces valeurs vont dans le sens des observations d'une migration favorisée dans le DMF et moins importante dans le dioxane.

Tableau 4 | Constantes diélectriques et dipolaires des trois solvants de réaction étudiés.

	ϵ	μ	$\tan \delta$
DMF	37.0	3.87	0.161
THF	7.58	1.75	0.047
Dioxane	2.21	-	-

Ces résultats nous ont conduits à proposer l'hypothèse d'un équilibre entre les positions 3' et 5' et donc le passage par un intermédiaire silylé pentavalent, dans un processus réversible (**Figure 56**).

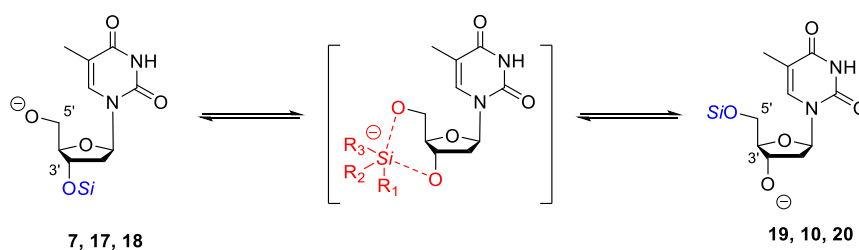


Figure 56 | Proposition d'un intermédiaire réactionnel lors du processus de migration de groupements protecteurs silylés.

Pour vérifier la réversibilité du phénomène, nous avons purifié les composés issus de la migration puis réalisé la réaction assistée aux micro-ondes sur les substrats 5'-silylés, dans les conditions de migration optimales : dans le DMF, à 80°C pendant 2 minutes (**Figure 57**). Nous avons obtenu des ratios similaires à ceux issus de la migration de la position 3' vers la position 5', traduisant un équilibre entre les deux formes substituées.

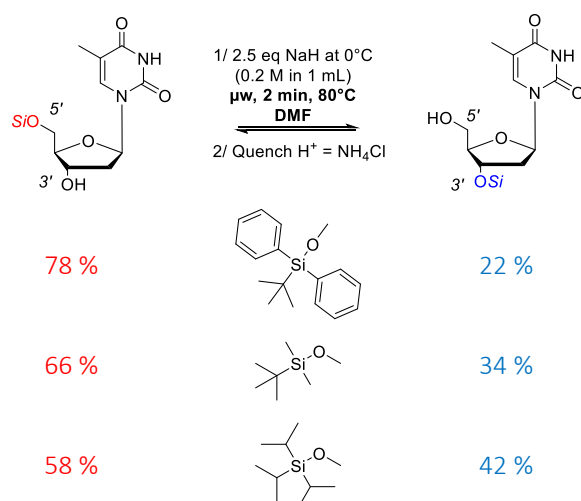


Figure 57 | Migration de groupement silylé de la position 5' vers 3'.

L'intervention d'un intermédiaire silylé pentavalent, par ailleurs déjà décrit dans la littérature¹⁸², pourrait expliquer l'effet unique du DMF. Il est en effet possible d'imaginer son implication dans la stabilisation de l'intermédiaire silylé cyclique. Le DMF, qui est une base de Lewis, peut se coordonner avec le silicium pour conduire à l'espèce ci-dessous, ce qui favoriserait d'autant plus l'intermédiaire pentavalent.

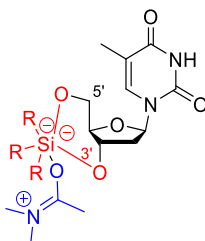


Figure 58 | Coordination du DMF avec le silicium lors de la formation de l'intermédiaire.

Une étude a été menée en modifiant la concentration dans le cas de tous les substrats. Ces essais n'ont montré aucun impact de la concentration sur la propension des groupes silylés à la migration, ce qui va dans le sens d'un processus intramoléculaire et non intermoléculaire.

Au cours de nos différentes voies de synthèse, nous avons par la suite observé un phénomène similaire de migration intramoléculaire non plus des groupements silylés mais pour un groupement ester. Cette réaction, mise en évidence lors de tentatives de fonctionnalisation de la position 5' du composé **21** sous conditions micro-ondes, a permis la mise en évidence,

¹⁸² Rendler, S., Oestreich, M. *Synthesis*. **2005**, 11, 1727-1747.

l'isolation et la caractérisation du composé **22**, issu d'une transestérification intramoléculaire entre 3' et 5' (**Figure 59**).

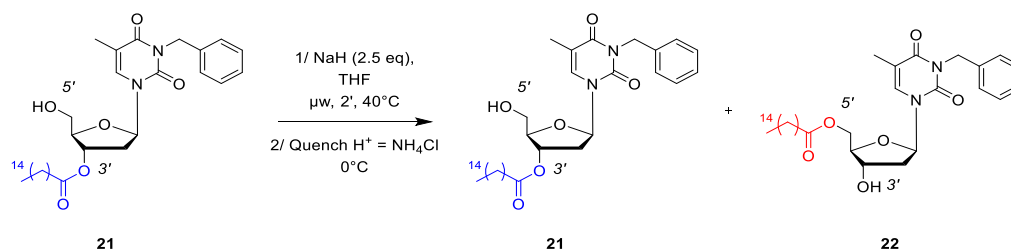


Figure 59 | Transestérification dans des conditions micro-ondes.

La possibilité d'une telle migration d'ester est inattendue car elle nécessite le passage par un intermédiaire cyclique probablement moins stable que celui mis en jeu lors de la migration d'éther silylés. Sur un raisonnement similaire à celui tenu pour la migration d'éther silylé, un intermédiaire hexacyclique pourrait se former pour permettre l'obtention du composé 3'-lipide ou 5'-lipide (**Figure 60**).

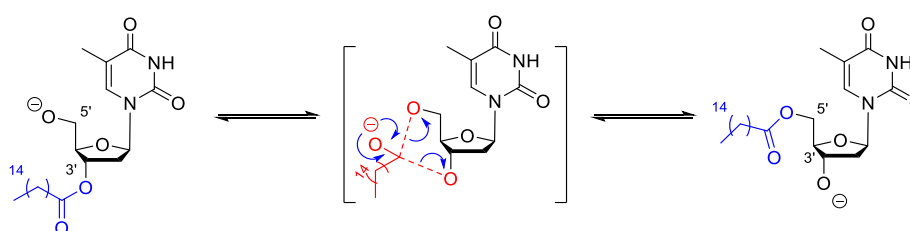


Figure 60 | Proposition d'un intermédiaire réactionnel lors du processus de transestérification.

Ces réactions de migration ont engendré la formation de sous-produits difficilement séparables du fait d'un rapport frontal très proche entre les deux isomères en chromatographie sur couche mince. De plus, les conditions de réaction ont conduit à un taux de migration plus ou moins important. Ces phénomènes peuvent donc complexifier les réactions de fonctionnalisation des nucléosides et il nous a donc paru essentiel d'étudier ce phénomène afin de l'anticiper ou de l'éviter. C'est pourquoi, nos stratégies de synthèse ont tenu compte de cette réactivité et nous avons finalement effectué les réactions de substitution au micro-ondes sur la thymidine nue, ce qui s'est avéré très efficace.

II. Synthèse, formulation et évaluation de nucléolipides fluorescents comme preuve de concept

Dans le but de synthétiser un nucléolipide « actif » permettant une potentielle acidification du lysosome, il était nécessaire dans un premier temps de mettre en évidence la capacité de tels composés à franchir les membranes des cellules neuronales et à rejoindre le lysosome. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un véhicule lipidique de type nanoémulsion (L/H) permettant de passer les membranes biologiques et pouvant être administré par différentes voies, tant orales que parentérales. La combinaison des avantages des NE et des nucléolipides, en un même nanosystème, nous permettait alors d'envisager, à plus long terme, un passage de la BHE optimal. La structure moléculaire et donc la fonctionnalisation du squelette nucléolipidique devait donc être conçue pour permettre son incorporation à la phase lipidique de l'émulsion.

Notre approche s'est appuyée sur des travaux antérieurs du laboratoire qui rapportent la synthèse et la formulation d'un nucléolipide modèle formulé en NE dont la capacité à pénétrer des cellules de neuroblastomes humains Be(2)-M17 a été évaluée¹⁸³. La thymidine a été choisie comme modèle, car il s'agit du nucléoside le plus simple à fonctionnaliser. Ses positions 3' et 5' du sucre et sa position N3 de la base ont été substituées. Le nucléolipide a été obtenu par fonctionnalisation par l'acide palmitique en position 3' ou 5'. Un fluorophore, la rhodamine B, a été également inséré sur la molécule afin de suivre la localisation du composé *in vitro*. Un groupement benzyle a été fixé en position N3 sur le dérivé nucléosidique afin d'apporter la lipophilie nécessaire en vue de la formulation du composé en nanoémulsion. Les deux composés (**Figure 61 A.**) ont donc été formulés avant d'être évalués *in vitro* par le Dr. Benjamin Dehay.

¹⁸³ Cunha, A., Prévot, G., Mousli, Y., Barthélémy, P., Crauste-Manciet, S., Dehay, B., Desvergnès, V. *ACS Omega*. **2020**, 5, 5815-5823.

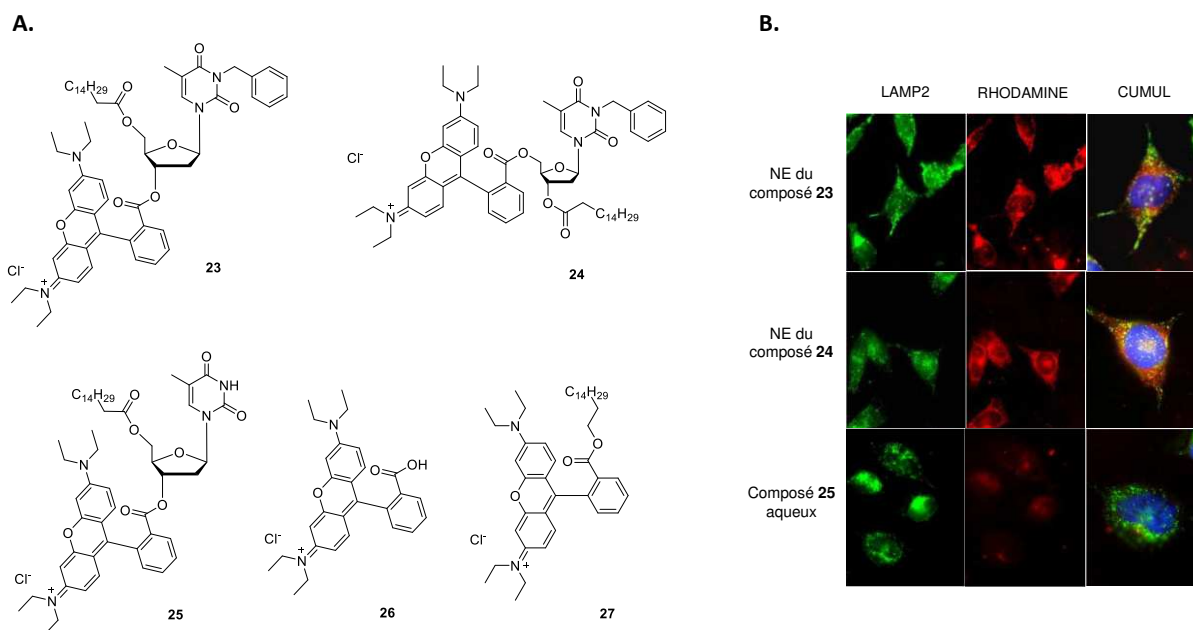


Figure 61 | Internalisation cellulaire de nanoémulsions de nucléolipides. *A. Structure chimique des nucléolipides 23, 24 et 25 d'intérêt, de la rhodamine B 26 et de la rhodamine lipidisée 27. B. Images de microscopie à fluorescence montrant la localisation des composés au sein des cellules. Les noyaux ont été colorés par Hoechst (bleu), les lysosomes avec LAMP2 (vert) et les composés 23 et 24 et 25 par la rhodamine (rouge). Adapté de Cunha et al.¹⁸³*

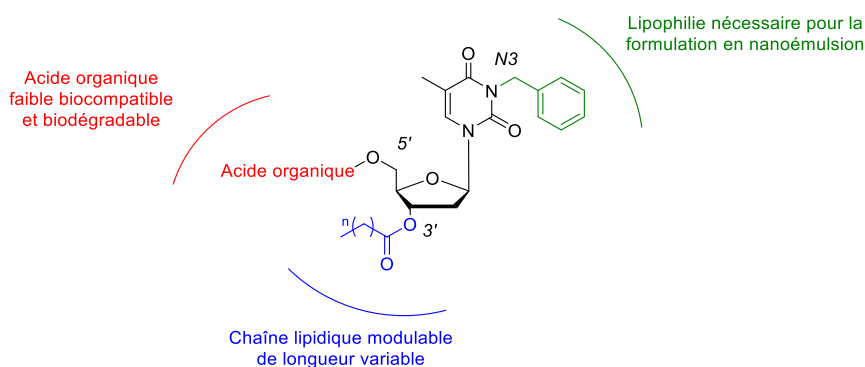
Quatre groupes de molécules ont ainsi été formulés et évalués. Les nucléolipides-rhodamine **23** et **24**, benzylés en *N3*, le nucléolipide-rhodamine **25** non substitué en *N3*, la rhodamine seule **26** et la rhodamine lipide **27**. Les images en fluorescence ont mis en évidence l'internalisation cellulaire efficace des nanoémulsions de nucléolipides **23** et **24**, ainsi que leur colocalisation avec les lysosomes (**Figure 61 B.**). Par comparaison, le composé lipide-rhodamine **27** a conduit à une internalisation cellulaire aussi efficace que les analogues NLs **23** et **24** mais s'est avéré cytotoxique dès 24h, mettant en évidence l'intérêt du véhicule NL comparé à un lipide simple. Le composé NL **25** non benzylé, moins lipophile que **23** et **24**, a pu être solubilisé en milieu aqueux. Les résultats obtenus ont montré que dans ce cas, le passage des membranes est limité à 50%, quand les NE de nucléolipides ont permis une internalisation de 100%. Cet exemple met en évidence le rôle positif et donc l'intérêt d'un véhicule de type nanoémulsion L/H. Les résultats d'internalisation et de cytotoxicité effectués avec la rhodamine non couplée, ont montré l'intérêt à la fois du couplage et du véhicule NE puisque ce composé s'est avéré au mieux peu internalisé (formulé en NE), au pire cytotoxique (lorsque solubilisé en milieu aqueux, cas de **26_{aq}**) (**Tableau 5**).

Tableau 5 | Internalisation cellulaire et viabilité cellulaire des composés évalués. * Le composé 25, nucléolipidique gardant sa position N3 libre n'a pas pu être formulé au sein d'une nanoémulsion.

Composé	23	24	25 _{aq} *	26	26 _{aq}	27
Internalisation cellulaire	91%	100%	63%	14%	8%	100%
Viabilité cellulaire	++	++	++	++	-	-

Des nucléolipides originaux rendus lipophiles ont ainsi pu être formulés au sein de NE (L/H), permettant une internalisation cellulaire optimale ainsi qu'une colocalisation des composés au niveau des lysosomes, et ce, sans présenter de toxicité. Ces travaux constituent une preuve de concept et ont été le point de départ de notre étude.

En s'appuyant sur les résultats précédents, notre approche propose la synthèse d'analogues nucléosidiques de la thymidine convenablement fonctionnalisés, portant non plus un fluorophore mais une substance active (**Figure 62**), afin d'apporter un acide carboxylique exogène qui pourra être libéré et restaurer la fonction lysosomale. Nous avons décidé de conserver la structure du composé précédent benzylé en N3 avec l'acide gras en position 3', laissant ainsi la position 5' libre pour une fonctionnalisation plus aisée.

**Figure 62 | Représentation des analogues nucléolipidiques cibles.**

Une séquence réactionnelle simple en cinq étapes à partir de la thymidine a alors été envisagée (**Figure 63**). La prodrogue finale sera obtenue par l'introduction tardive de l'acide organique en position 5' sur l'alcool libre d'une thymidine convenablement substituée. Cet intermédiaire lipide sera lui-même issu de l'estérification de la position 3' libre. Le nucléoside protégé en position 5' et benzylé en position N3, obtenu à partir de la thymidine, sera l'intermédiaire commun à de nombreuses approches.

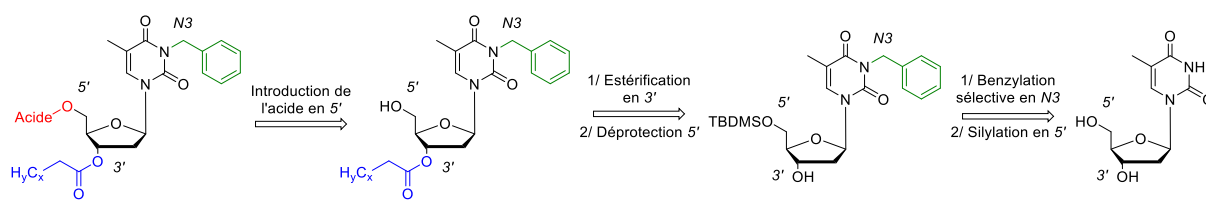


Figure 63 | Schéma rétrosynthétique général des nucléolipides acides.

3. Synthèse des nucléolipides acides

Au regard de la migration possible des groupements protecteurs silylés, notre synthèse a débuté par l'alkylation de la position *N3* de la thymidine sous conditions aux micro-ondes (**Figure 64**). Le groupement protecteur silylé a été inséré afin de fonctionnaliser spécifiquement la position 3' par estérification de l'alcool secondaire avec un acide gras. L'alcool primaire déprotégé peut alors être couplé à l'acide organique sélectionné.

Ce schéma synthétique, simple et modulable, a permis d'envisager plusieurs modifications synthétiques. Tout d'abord, des lipides variés ont été introduits afin d'évaluer leur solubilité dans les huiles lors des essais de préformulation et en vue de leur formulation au sein de nanoémulsions L/H. D'autre part, plusieurs acides organiques ont également été envisagés pour conduire à diverses familles de prodrogues à évaluer.

I. Synthèse des intermédiaires nucléolipidiques benzyles

L'alkylation de la position *N3* de la thymidine commerciale a été réalisée dans des conditions assistées aux micro-ondes, développées précédemment au laboratoire en tentant de reproduire des résultats de la littérature mentionnant une alkylation sélective en position 5'¹⁷⁶. Selon cette méthodologie, il est possible de substituer sélectivement l'amine secondaire de la base ou les alcools libres du sucre, selon le solvant utilisé. La littérature a déjà rapporté le rôle central de la constante diélectrique du solvant sur la sélectivité de la réaction¹⁸⁴. Sous conditions microondes, à 200 Watts, en présence d'hydruure de sodium, dans le DMF et par la suite de l'ajout de l'agent alkylant, le bromure de benzyle, l'alkylation efficace de la nucléobase a été obtenue. L'utilisation du THF dans les mêmes conditions d'activation conduit à une *O*-alkylation en 5' et 3' selon que l'une des deux positions est protégée ou déjà substituée. Cette méthode permet l'obtention des composés correctement substitués dans de bons à très bons rendements, avec un temps de réaction beaucoup plus court. En effet, dans des conditions plus classiques, la *N*-benzylation s'opère pendant 15 heures, en présence de K₂CO₃.

L'alcool primaire en 5' a ensuite été protégé sous forme d'éther silylé afin de permettre l'estérification de l'alcool secondaire en 3'. Cette protection s'opère dans des conditions classiques avec du TBDMSCl à l'aide d'une catalyse nucléophile qui permet de former

¹⁸⁴ Teste, K., Colombeau, L., Hadj-Bouazza, A., Lucas, R., Zerrouki, R., Kraus, P., Champavier, Y. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1490–1495

l'intermédiaire pyridinium silylé particulièrement réactif. Le composé a été obtenu sur une échelle de 2 g avec un rendement global de 85%.

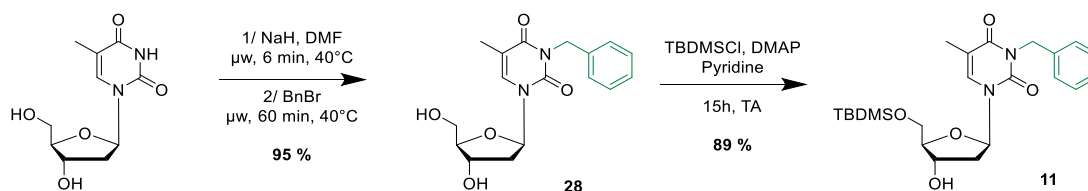


Figure 64 | Synthèse de l'intermédiaire nucléosidique.

Les stratégies de liaisons d'un lipide avec un nucléoside, un nucléotide ou avec une nucléobase sont nombreuses et variées¹⁶⁴. Majoritairement les liaisons ester, amide, éther, les ponts disulfures, les liens triazole, carbamate ou bien acétal sont retrouvés. Un tel hybride peut donc être synthétisé avec des réactions simples et efficaces. L'application biologique visée peut imposer le choix de la liaison. Dans le but d'obtenir un composé biodégradable en milieu biologique, un lien clivable tel que le pont disulfure ou bien une liaison ester peut être utilisé.

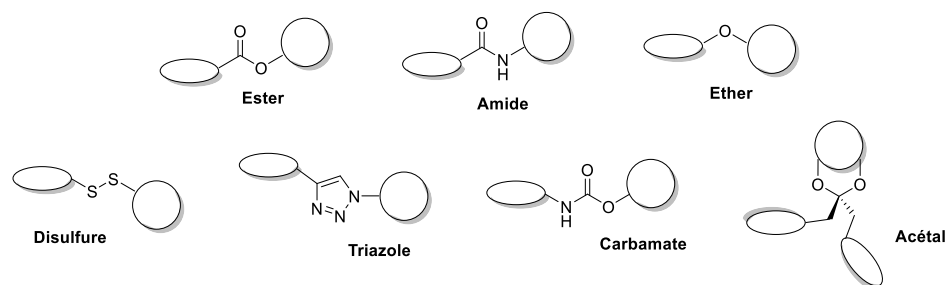


Figure 65 | Liaisons majoritairement utilisées entre un nucléoside et un lipide.

Nous avons choisi d'introduire un lien ester clivable par les estérases ou les lipases, enzymes ubiquitaires, dont la présence au sein du lysosome est essentielle. Pour cela, à la suite de résultats décevants utilisant des conditions d'estérification classiques, nous avons utilisé les conditions de couplage de Steglich¹⁸⁵ optimisées précédemment lors du composé synthétisé pour la preuve de concept. Ces conditions, adaptées en 1978 par Steglich, dérivent des conditions de couplage peptidique¹⁸⁶ mettant en jeu le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de

¹⁸⁵ List, B., Mitschke, B. *Synfacts*. **2019**, 15, 1185.

¹⁸⁶ Neises, B., Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Eng.* **1978**, 17, 522-524.

l'hydroxybenzotriazole (HOBt). L'HOBt permet d'éviter la racémisation et d'améliorer l'efficacité du couplage peptidique. Majoritairement performante, cette réaction peut conduire à la formation de sous-produits *N*-acylurés. Dans l'objectif d'utiliser un carbodiimide pour la formation d'ester, Steglich a mis en évidence que l'utilisation de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) permet d'accélérer la réaction et d'éviter la formation de sous-produits acylurés, tout en réalisant la réaction à température ambiante. Il est donc possible d'estérifier dans des conditions douces. Depuis, d'autres carbodiimides sont utilisés afin de s'affranchir complètement de la formation de dicyclohexylurée (DCU) issu de l'absorption par le DCC de l'eau générée au cours de la réaction. Les agents de couplage *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide (DIC) et 1-Ethyl-3-(3-diméthylamipropyl)carbodiimide (EDC) sont alors utilisés.

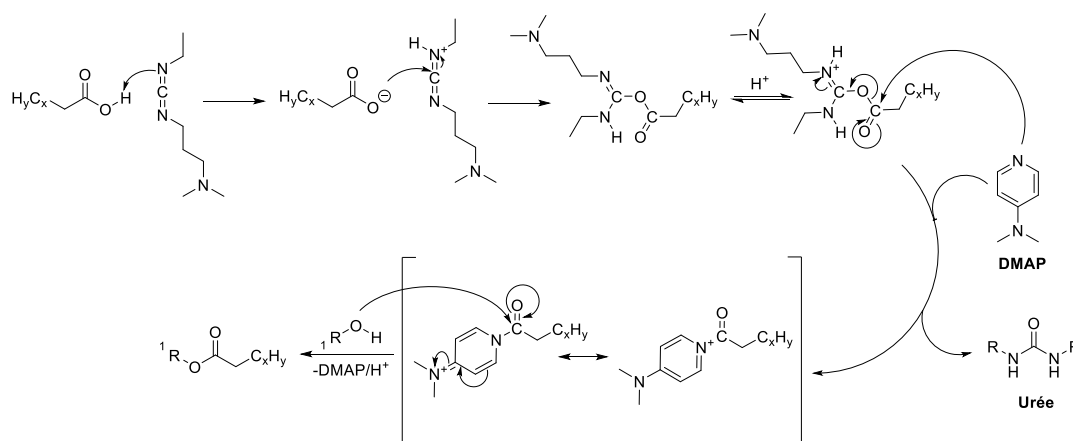


Figure 66 | Mécanisme de l'estérification selon les conditions de couplage de Steglich. Utilisation de l'EDC comme agent de couplage.

Les nucléolipides ont été synthétisés avec trois longueurs de chaîne différentes afin de moduler leur lipophilie et ainsi étudier leur liposolubilité dans les huiles en vue de leur formulation au sein de nanoémulsions (L/H). Par analogie avec les travaux précédents, la longueur de chaîne intermédiaire de 16 carbones a été choisie. Une chaîne grasse plus longue dérivant de l'acide arachidique (C20) et plus courte dérivant de l'acide laurique (C12) ont également été sélectionnées. Pour obtenir les composés **29**, **30** et **31**, nous avons utilisé l'EDC sous forme de chlorhydrate. La DMAP permet la formation d'un acylpyridinium très réactif, directement attaqué par l'alcool libre de notre nucléoside pour conduire à l'ester. Ces conditions de couplage nous ont permis d'isoler les nucléolipides 5'-silylés avec des rendements quantitatifs quelle que soit la longueur de chaîne.

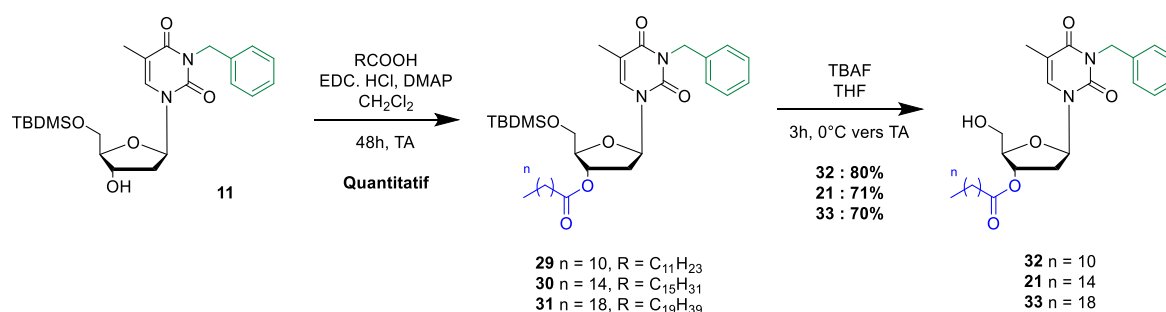


Figure 67 | Synthèse des intermédiaires nucléolipidiques.

Les composés ont ensuite été déprotégés dans des conditions classiques, par l'utilisation de TBAF, dans du THF, pour obtenir les composés **32**, **21** et **33**, avec des rendements de 80%, 71% et 70% respectivement (**Figure 67**). Les différences de rendements de cette étape, diminuant avec l'augmentation de la longueur de chaîne carbonée, entre les trois composés sont probablement dues à une gêne stérique résultant de la longueur de la chaîne lipidique en 3'. Une façon de déprotéger l'éther de tertbutyldiméthylsilyle consiste en l'utilisation d'APTS. Le recours à l'APTS engendre une déprotection en conditions acides que nous avons préféré éviter pour écarter tout risque de réactions secondaires avec l'ester en 3'.

I. Approche synthétique à des dérivés monoacides

Dans un premier temps, nous avons tenté d'introduire des monoacides simples en position 5' du premier nucléolipide **21** (**Figure 68**). Trois composés ont été utilisés : l'acide 3-bromopropionique pour synthétiser le composé **34**, l'acide 5-bromopentanoïque pour le composé **35** et l'acide 4-bromométhylbenzoïque pour obtenir le composé **36**. Le couplage a, en premier lieu, été essayé pour les composés avec des conditions assistées par micro-ondes. À 0°C dans du THF du NaH a été ajouté pour déprotoner l'alcool primaire. S'ensuit une activation de 4 minutes à 40°C puis les bromoacides ont été ajoutés et la réaction remplacée sous micro-ondes pendant 1 heure à 40°C. De façon surprenante, les substitutions se sont avérées infructueuses pour les deux composés et les substrats de départ ont été récupérés, et ce même en faisant varier le nombre d'équivalents de NaH et de bromure (1.3 eq ; 2.5 eq ; 4 eq). Afin de conclure sur un potentiel effet du micro-onde, la réaction avec l'acide 3-bromopropionique a été réalisée sur paillasse, sans succès et le produit de départ a également été récupéré.

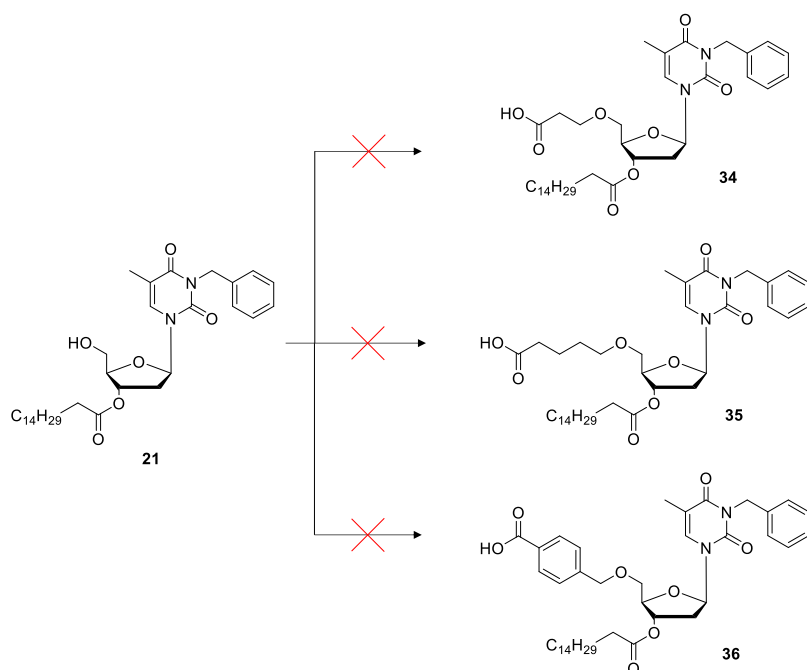


Figure 68 | Essais de fonctionnalisation de la position 5' par substitution avec des monoacides.

Il est étonnant que ces réactions simples n'aient pas fonctionné même légèrement, d'autant plus que la base a été mise en solution avec le nucléolipide avant l'ajout de l'acide de façon à éviter que NaH ne déprotone les monoacides. Il aurait sous doute été pertinent de protéger les acides sous forme d'ester et de tenter de nouveau les réactions, mais nous avons envisager une autre approche.

II. Conception, synthèse, formulation et évaluation biologique du premier nucléolipide acide : cas de l'acide oxalique

1. Approche synthétique

Dans le but d'acidifier le milieu lysosomal et de pallier les limites du PLGA, l'idée était d'apporter un acide organique bioinspiré, biocompatible et biodégradable comme substance active. De façon également à obtenir un effet acidifiant similaire ou supérieur à celui résultant de la libération du PLGA dans le lysosome nous avons opté pour l'utilisation d'un diacide et choisi l'acide oxalique dans un premier temps. Biocompatible, il présente également une acidité intéressante ($pK_{a1} = 1.27$; $pK_{a2} = 4.2$). En effet, en plus d'être présent dans l'alimentation

(chou, rhubarbe, épinards...), il est un sous-produit du métabolisme cellulaire¹⁸⁷. De plus il présente une LD₅₀ de 600 mg.kg⁻¹, laissant présager de sa biocompatibilité dans une approche thérapeutique. Enfin, une fois la position 5' fonctionnalisée, un oxalate serait obtenu, permettant la libération d'une double acidité, celle issue de l'acide libre et celle issue de la libération par les estérases cellulaires.

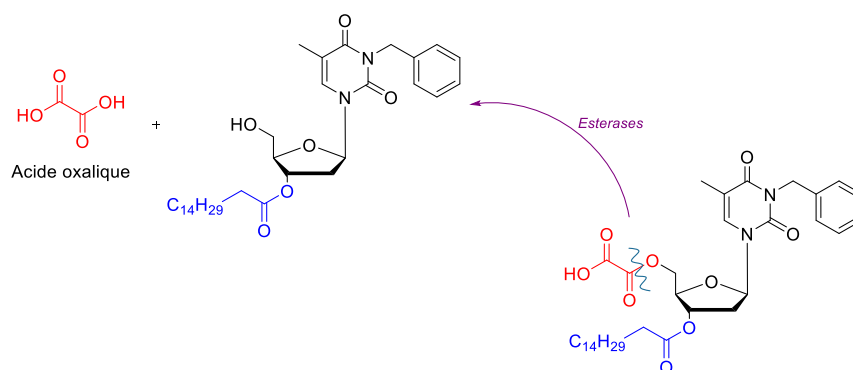


Figure 69 | Clivage de la prodrogue nucléolipidique.

La première synthèse a été effectuée par Yannick Mousli sur le nucléolipide fonctionnalisé par l'acide palmitique en 3'. L'étape d'estérification avec l'acide oxalique n'a cependant pas été sans difficultés. Les essais de fonctionnalisation du composé *N*-benzyle **21** ont d'abord utilisé des conditions simples d'estérification de Fischer en milieu acide en présence d'acide paratoluènesulfonique. L'utilisation d'un acide plus fort a été écarté pour limiter les possibilités d'hydrolyse de l'ester de palmitate. Une seconde approche, utilisant les conditions de couplage de Steglich et recourant aux carbodiimides, a également été menée. Aucun de ces essais n'a permis l'obtention du composé escompté ni même une quelconque conversion (**Figure 70**).

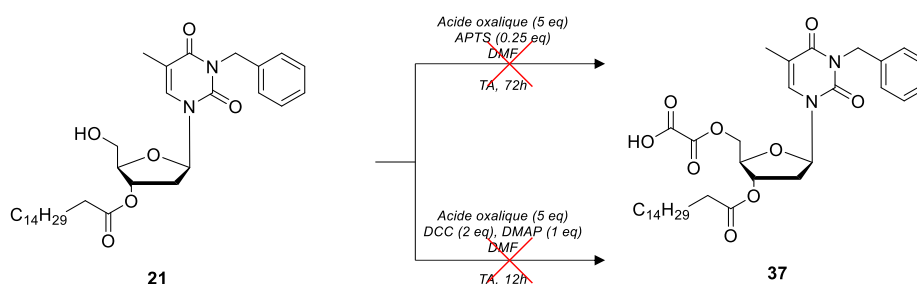


Figure 70 | Essais d'estérification de l'acide oxalique.

¹⁸⁷ Palmieri, F., Estoppey, A., House, G. L., Lohberger, A., Bindschedler, S. Chain, P. S. G., Junier, P. *Adv. Appl. Microbiol.* **2019**, 106, 49-77.

C'est finalement l'utilisation des conditions de couplage rapportées par MacMillan¹⁸⁸ qui ont permis de parvenir au nucléolipide acide **37** (**Figure 71**). L'alcool en position 5' a ainsi été aisément converti en oxalate au moyen de chlorure d'oxalyle et sans qu'aucune purification ultérieure ne soit nécessaire (ni faisable). Dans de l'éther diéthylique, l'ajout au goutte à goutte de chlorure d'oxalyle a ainsi conduit efficacement au composé cible **37**, et ce en 48 heures avec un rendement quantitatif.

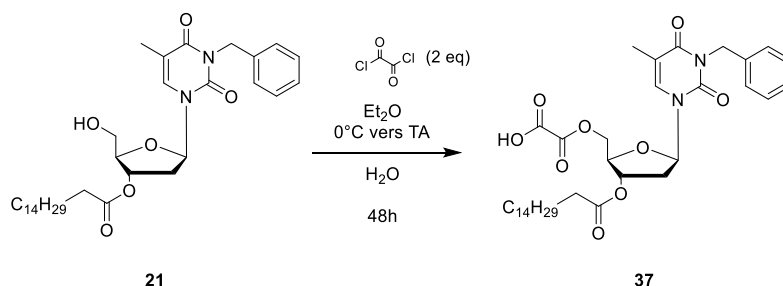


Figure 71 | Couplage du chlorure d'oxalyle sur le nucléolipide.

2. Formulation des nanoémulsions

La formulation des nanoémulsions s'est majoritairement confrontée au défi d'obtenir des systèmes stables et biocompatibles à partir de très faibles quantités de substances actives. En effet, le développement galénique, même à l'échelle du laboratoire, est exigeant en quantité de matières premières alors que la synthèse organique ne peut produire, lors de la recherche, que des quantités limitées. Cela est d'autant plus vrai lorsque le composé final est issu d'une synthèse multi-étapes.

Afin de pouvoir permettre l'incorporation de très faibles quantités de molécules synthétiques produites en système nanoémulsion L/H (20/80), nous avons utilisé le procédé et la composition mis au point au préalable, au laboratoire, par Geoffrey Prévot, lors de son doctorat soutenu en 2018¹⁸⁹. Cette méthode a permis, en utilisant l'appareil du laboratoire (sonicateur) de produire des nanoémulsions de volume final de l'ordre du millilitre tout en garantissant l'émulsification et une réduction de la taille des globules dans l'échelle nanométrique. L'enjeu de pouvoir faire de très faibles quantités de nanoémulsions est de pouvoir tester les nouvelles molécules synthétiques produites en faible quantité, ce qui est

¹⁸⁸ Zhang, X., MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 13862-13865.

¹⁸⁹ Prévot, G. Plateforme de nanoémulsions destinées au diagnostic et à la thérapeutique. Ph.D. Dissertation, Université de Bordeaux, 2018.

capital pour pouvoir espérer les sélectionner par la suite pour des applications thérapeutiques. Dans ce travail, nous n'avons pas cherché à optimiser la composition tant que le résultat de la répartition granulométrique et la stabilité étaient satisfaisantes pour pouvoir mener les essais *in vitro*.

Le but de l'encapsulation de la prodrogue synthétisée est de lui conférer une stabilité et de lui faciliter le passage des membranes biologiques avec à terme, pour nous, l'objectif du passage de la BHE. Les NE sont en effet capables de véhiculer efficacement les substances actives, en présentant une capacité d'encapsulation importante. Dans un souci de transférabilité, les composants de la formulation sont biocompatibles et approuvés par les instances sanitaires. Ainsi les excipients utilisés sont approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) ainsi que par la pharmacopée européenne. Le procédé pour des NE d'un volume de 1 mL a été développé par l'utilisation d'une sonde à ultrasons.

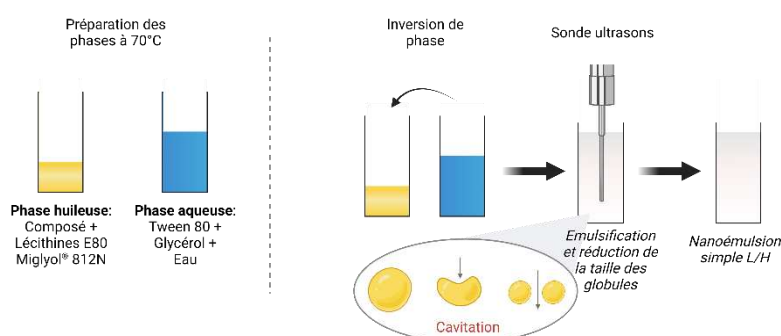


Figure 72 | Représentation du procédé de fabrication des nanoémulsion L/H.

Les NE ont donc été formulées avec 20% d'huile, ici des triglycérides à chaînes moyennes (Miglyol® 812N). Au sein de l'huile, des lécithines d'œufs (Lipoid E80), tensioactifs classiquement utilisés dans la formulation des émulsions injectables, ont été dispersées à l'aide d'un bain à ultrasons, à 70°C. Les lécithines de jaune d'œuf sont des phosphatidylcholines amphiphiles émulsifiantes. Composée d'une tête hydrophile et une queue hydrophobe les émulsifiants ou tensioactifs permettent, lors de l'émulsification, d'abaisser la tension interfaciale en se positionnant à l'interface de la phase continue et de la phase dispersée. De plus, la formule comprend un deuxième tensioactif non ionique, le polysorbate 80. Il est indispensable à la formation et à la stabilité de la nanoémulsion. En plus de favoriser l'émulsification, ces tensioactifs permettent de stabiliser la NE et éviter une séparation de phase. La composition type de la nanoémulsion est donnée dans le tableau suivant, **Tableau 6**.

Tableau 6 | Composition des nanoémulsions contrôles.

Nanoémulsion composition	
Lipoïd® E80	1.2%
Miglyol® 812N	20%
Tween® 80	2.5%
Glycérol	2.25%
H ₂ O <i>qs</i>	100%

Le nucléolipide synthétisé va ensuite pouvoir être solubilisé au sein de la phase huileuse ainsi constituée. Afin de déterminer la quantité de composé à encapsuler afin d'obtenir le même nombre d'unités acides que celles délivrées lors de l'évaluation du PLGA¹⁸³, nous avons estimé qu'une masse comprise entre 30 et 50 mg du nucléolipide était nécessaire. Une valeur précise ne peut pas être obtenue en raison du fait que le PLGA précédemment utilisé est un polymère dont la masse molaire était comprise entre 24000 et 38000 g.mol⁻¹. Pour débiter notre étude nous sommes partis d'une masse plus réduite, de 10 mg de nucléolipide, correspondant à celle utilisée lors de la preuve de concept. Par ailleurs, il s'est avéré que cette quantité correspond à la solubilité maximale de notre composé dans la phase huileuse. En parallèle de la phase huileuse, la phase aqueuse de la NE est préparée avec l'incorporation à 70°C de polysorbate 80, qui est un second tensioactif, non ionique, dans de l'eau Milli-Q. Pour ajuster l'osmolalité en vue des essais cellulaires *in vitro*, du glycérol est ajouté à la phase aqueuse. En effet, une variation de l'osmolalité entraîne un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire pouvant être fatal pour les cellules. Aussi, l'ajout de 2.25% de glycérol est nécessaire afin d'ajuster l'osmolalité des formulations, initialement proche de 0 mOsmol.kg⁻¹ pour se rapprocher de la valeur plasmatique aux environs de 300 mOsmol.kg⁻¹.

Le processus de production consiste ensuite en l'ajout de la phase aqueuse dans la phase huileuse, à chaud, puis en une agitation au vortex immédiatement suivie d'une sonication permettant de réaliser en une seule étape, afin de ne pas perdre de matière, l'émulsification et la réduction de taille pour atteindre une répartition granulométrique dans l'échelle nanométrique. L'analyse granulométrique permet de caractériser notre système (**Tableau 7**). Deux nanoémulsions comportant le composé **37** ont été formulées. La mesure du pH de la première NE **37** – A a montré une formulation acide (pH ~ 4.5). Afin de vérifier que tout l'acide

n'avait pas déjà été consommé, le dosage du composé encapsulé a été effectué et a montré une courbe caractéristique d'un dosage de diacide. La seconde formulation NE 37 – B correspond à la même composition, mais son pH a été ajusté à pH physiologique par ajout progressif d'une solution aqueuse de soude à 0.1 M. L'encapsulation du nucléolipide ou l'ajustement du pH n'ont pas modifié significativement le diamètre moyen des globules d'huile et les populations sont demeurées monodisperses ($PdI < 0.1$ pour les NE 37). Une nanoémulsion contrôle de même composition mais sans le nucléolipide a été produite de la même façon pour servir de comparatif.

Tableau 7 | Caractéristiques des nanoémulsions chargées en nucléolipide acide oxalique et d'une nanoémulsion contrôle non chargée.

	Diamètre (nm)	PdI	Potentiel ζ (mV)	pH
NE 37 – A	162.1 \pm 2.8	0.092	-30.6 \pm 6.7	4.5
NE 37 – B	177.5 \pm 0.8	0.058	-43.4 \pm 4.6	~7
NE contrôle	182.1 \pm 1.9	0.138	-32.6 \pm 2.6	~7

3. Évaluation biologique

3.1. Évaluation de la viabilité cellulaire

Les formulations fraîchement préparées ont été utilisées pour évaluer leur cytotoxicité ainsi que leur pouvoir acidifiant *in vitro*. Ces évaluations biologiques ont été réalisées par le Dr. Benjamin Dehay, neurobiologiste à l'Institut des Maladies Neurodégénératives et spécialiste de la maladie de Parkinson. La viabilité cellulaire a été mesurée sur une lignée cellulaire de neuroblastomes humains BE(2)-M17 après traitement avec 1 μ L de NE diluée au 1/1000. Les émulsions par leur caractère lipophile sont susceptibles d'impacter la viabilité cellulaire lors des évaluations biologiques *in vitro*. Les conditions d'évaluation *in vitro*, et notamment la dilution préalable en phase aqueuse de l'émulsion, ont été mises au point par Benjamin Dehay dans le cadre de la collaboration sur la thèse de Geoffrey Prévot. La NE 37 – A, non ajustée à pH physiologique, n'a pas impacté la viabilité cellulaire 24h après l'exposition des cellules mais une cytotoxicité à 48 heures a été observée. La nanoémulsion contrôle, non chargée est demeurée non cytotoxique jusqu'à 48h, de même que pour la NE 37 – B, ajustée à

pH physiologique. (**Figure 73**) Le traitement des cellules avec une formulation dont le pH n'est pas ajusté au pH physiologique, bien que préalablement diluée semble impacter de manière trop importante le milieu cellulaire.

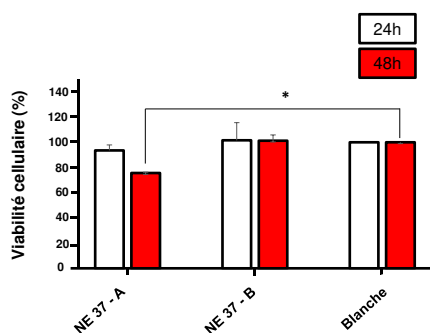


Figure 73 | Evaluation in vitro de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire a été évaluée sur des cellules *shScr-1* à 24h et 48h.

3.2. Evaluation du potentiel acidifiant

L'impact des nanoémulsions sur le pH lysosomal a été mesuré sur la même lignée cellulaire saine mais également sur une lignée modèle de la maladie de Parkinson, préalablement déplétée du gène *ATP13A2* (*shATP13A2(403-1)*) de manière à obtenir un pH anormalement élevé.

La mesure du pH lysosomal a montré que seule la NE **37** – A, donc cytotoxique à 48 heures, permettait une acidification significative du lysosome en abaissant le pH de 1.25 unité, tandis que la formulation ajustée à pH physiologique n'a pas présenté d'efficacité pour l'acidification. L'hypothèse de l'inefficacité peut être attribuée à la consommation de l'acide libre lors de l'ajustement du pH de la formulation par ajout de soude. De cette manière, l'intérêt du diacide est perdu et seule une acidification secondaire peut avoir lieu par suite du clivage de l'ester en 5' par les enzymes cellulaires. Cette seconde acidité peut être soit insuffisante, soit survenir dans un délai plus long que celui de l'étude. Néanmoins, la formulation efficace (pH non ajusté) est également celle qui présente une cytotoxicité, laissant supposer un impact négatif de l'acide oxalique. En effet, le nucléolipide conçu lors de la preuve de concept (**Figure 61**), fonctionnalisé par un benzyle en *N3*, un palmitate en 5' et la rhodamine en 3', n'avait pas induit de mort cellulaire lors des évaluations *in vitro*. De plus, bien que NE **37** – A abaisse le pH de 1.25 unité (**Figure 74**), l'acidification demeure en deçà de celle observée lors de l'apport de PLGA qui avait conduit à un abaissement de 2.28 unités. Par ailleurs, un calcul du nombre d'unités acides libérées par le clivage du PLGA nous a conduit à estimer que pour avoir un

nombre d'unités acides similaire, il était nécessaire de charger nos nanoémulsions avec une masse comprise entre 31 mg et 49 mg de nucléolipide pour 200 mg de phase huileuse. Cela correspond à un chargement de nucléolipide entre 3% et 5% (m/m) dans la nanoémulsion finale. Cela nécessiterait donc un chargement plus important en nucléolipide-acide oxalique au sein de la nanoémulsion, que celui étudié lors de ces tests.

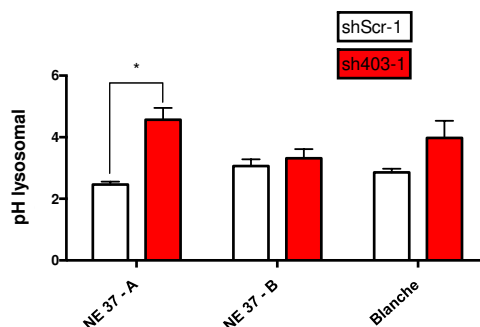


Figure 74 | Evaluation in vitro de l'acidification du pH lysosomal. Le pH lysosomal a été mesuré sur des cellules M17 témoins (*shScr-1*) et dépourvues d'*ATP13A2* (*sh403-1*) à 24h.

4. Solubilité du nucléolipide dans l'huile

Dans le but d'améliorer l'acidification engendrée par notre prodrogue nucléolipidique, le travail a été poursuivi et la quantité maximale qu'il était possible de solubiliser et de formuler en nanoémulsion a été déterminée. La concentration maximale dans l'huile du composé **37** a ainsi été évaluée. Une évaluation grossière de la solubilité des composés a été réalisée par appréciation visuelle de la limpidité de l'huile. À partir d'une concentration massique importante de nucléolipide dans du Miglyol® 812N (100 mg pour 200 mg d'huile), une dilution progressive par ajout d'huile est effectuée pour atteindre la concentration la plus élevée pour laquelle il ne subsiste ni trouble ni précipité. La concentration massique s'est avérée être de l'ordre de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, soit 10 mg de nucléolipide pour 200 mg d'huile. Le même essai avec une phase huileuse contenant l'émulsifiant (Lipoid® E80) en mélange préalablement dispersé dans le Miglyol® 812N, dans les mêmes proportions que la formulation de la NE, n'a pas conduit à une amélioration de la solubilité.

Un chargement plus important en NL pour apporter plus d'acidité est donc exclu en raison de la limite de solubilité du composé dans l'huile. Le chargement maximal a donc été atteint à $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, soit dans les conditions des évaluations biologiques réalisées. Pour favoriser la solubilité du dérivé nucléolipidique dans l'huile, nous avons alors émis l'hypothèse

que l'insertion d'une chaîne lipidique plus longue pourrait augmenter sa lipophilie et qu'il serait alors possible de charger la NE de manière plus importante.

5. Modulation de la chaîne lipidique

Afin d'obtenir le nucléolipide portant une chaîne plus longue, la synthèse a été reproduite pour obtenir l'intermédiaire **11**, *N*-benzylé, protégé en 5'. La position 3' libre a permis l'estérification avec un acide gras de chaîne plus longue que l'acide palmitique : l'acide arachidique (C₂₀H₄₀O₂) de sorte à avoir une augmentation significative de la longueur de chaîne et pouvoir étudier son influence sur la solubilité dans l'huile. L'estérification pour accéder au composé **31** a été réalisée dans les conditions de couplage de Steglich, préalablement discutées, et la déprotection de l'éther silylé a aisément permis l'obtention du composé **33**. Néanmoins, malgré nos efforts, la substitution de l'alcool primaire par l'oxalyle s'est avérée infructueuse et aucune conversion n'a été observée. Cette impossibilité à obtenir la formation de l'ester a également été observée pour le composé portant une chaîne lipidique plus courte, en C12, composé **32** (Figure 75).

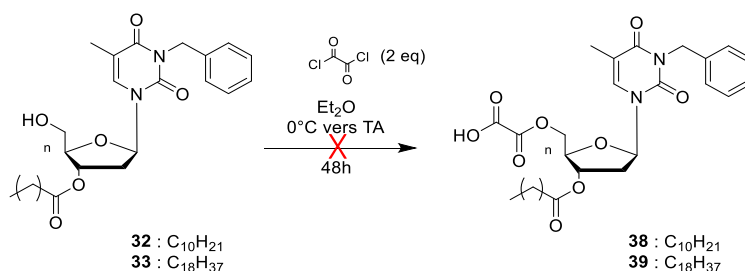


Figure 75 | Approche synthétique pour l'obtention des nucléolipides - acide oxalique dont la chaîne lipidique est modulée.

Le résultat négatif concernant la formation de l'oxalate en C20 pourrait s'expliquer par un encombrement plus important en 3'. En effet, d'autres travaux du laboratoire ont mis en évidence des difficultés à fonctionnaliser la position 5' avec certains groupements encombrants en position 3'. En revanche, nous n'avons pas d'explication rationnelle pour le cas du composé en C12.

Ainsi, l'acide oxalique, bien que présentant des pKa intéressants pour un potentiel pouvoir acidifiant s'est avéré inadéquat dans le développement d'une prodrogue pouvant restaurer le pH lysosomal. Plusieurs limitations sont apparues. Le composé oxalate s'est avéré instable sans doute en raison d'une très forte électrophilie du fait des deux groupements

carbonyles voisins. Cela a compliqué son obtention, puisqu'il n'a pas été possible de le purifier, et son utilisation. L'acidification du lysosome, bien qu'intéressante reste insuffisante et le chargement de la NE ne peut pas être augmenté. De plus, l'obtention d'un composé analogue avec une chaîne grasse plus longue n'a pas été possible. Pour finir, la nanoémulsion a induit une cytotoxicité, possiblement en raison de son pH acide. Deux choix s'offraient alors à nous : l'utilisation d'un autre diacide biocompatible ou bien la fonctionnalisation de l'acide terminal pour le « masquer » de façon à ne pas avoir à réajuster le pH.

III. Cas de l'acide oxaloacétique

Les premiers résultats encourageants nous ont conduits à poursuivre le développement de nucléolipides prodrogues portant un diacide, avant d'envisager une stratégie de protection des acides libres. Le second acide organique a donc été choisi de telle sorte à éviter l'obtention d'un composé instable, même s'il présente des pKa légèrement plus élevés que ceux de l'acide oxalique afin de vérifier si la présence d'un acide plus faible permettrait d'éviter une cytotoxicité tout en conservant des propriétés d'acidification. L'acide oxaloacétique également biocompatible a alors été choisi. Celui-ci intervient en effet en tant qu'intermédiaire du cycle de Krebs et du cycle de l'urée et fait donc partie des voies métaboliques. Il participe également à la biosynthèse des acides aminés et des acides gras. Ce diacide présente par ailleurs des pKa également intéressants : $pK_{a1} = 2.22$ et $pK_{a2} = 3.89$.

Afin de pouvoir comparer l'impact de la modification de l'acide sur la solubilité du nucléolipide dans l'huile, le potentiel d'acidification ainsi que la cytotoxicité des formulations, mais également en raison de la non-obtention des dérivés oxaliques **38** et **39** en C12 et C20, la synthèse du composé en série C16 a été entreprise (**Figure 76**). Un essai d'estérification dans des conditions de couplage de Steglich avec l'utilisation d'EDC dans du DCM a été effectuée. Ces conditions se sont avérées insuffisantes pour l'obtention de la molécule cible et ce même après chauffage de la réaction à 40°C et augmentation du nombre d'équivalents (**Tableau 8**). Des conditions d'estérification de Fischer par une catalyse acide à l'APTS dans du DMF et en présence de 5 équivalents d'acide s'est également montrée infructueuse. Les différents essais n'ont conduit à aucune conversion et les substrats de départ ont été récupérés.

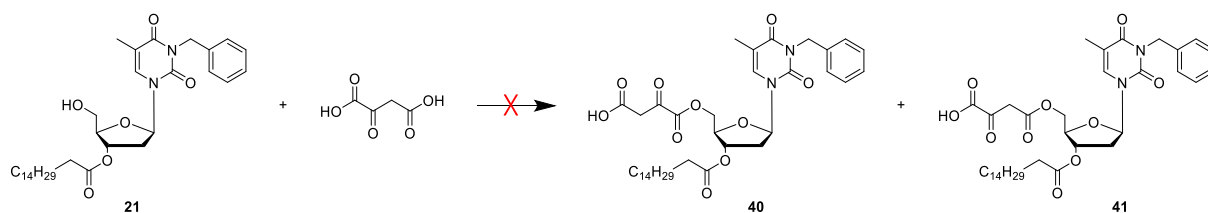


Figure 76 | Estérification pour fonctionnaliser la position 5' avec l'acide oxaloacétique.

Tableau 8 | Conditions des estérifications de Steglich pour l'obtention du dérivé oxaloacétique.

Entrée	Acide	EDC. HCl	DMAP	Chauffage	Conversion
1	1.2 eq	1.2 eq	0.5 eq	TA	-
2	2.4 eq	2.4 eq	1 eq	30°C	-
3	3.6 eq	3.6 eq	1.5 eq	40°C	-

Ces quelques essais infructueux nous ont laissés présager de la difficulté pour aboutir à une estérification, qui serait de plus potentiellement non sélective. Aucun dérivé chloré de l'acide n'est commercial pouvant permettre d'envisager une réaction similaire à celle réalisée lors de la synthèse du composé **37**. Le passage par le chlorure d'acyle, qui serait à synthétiser, ne résoudrait pas la problématique de la sélectivité, les essais n'ont donc pas été poursuivis sur cet acide et des stratégies alternatives ont été envisagées.

IV. Cas de l'acide succinique

1. Approche synthétique

Par suite des difficultés d'estérifications sélectives des précédents diacides envisagés, le recours à l'ouverture d'un anhydride en vue de fonctionnaliser la position 5' du nucléolipide nous est parue moins hasardeuse.

L'anhydride succinique mène à l'acide succinique à la suite d'une ouverture de cycle. Ce diacide respecte toujours le cahier des charges car il est biocompatible et d'ailleurs présent dans toutes les cellules vivantes. En effet, il s'agit d'un intermédiaire métabolique, également précurseur de nombreux bicomposés tels que les lipides, les glucides ou encore certains acides aminés. Sa biocompatibilité se traduit par sa LD₅₀ qui est de 2260 mg.kg⁻¹ quand celle de l'acide oxalique était de 600 mg.kg⁻¹. L'acide succinique est un acide plus faible que l'acide oxalique et que l'acide oxaloacétique : ses pKa sont de 4.2 et 5.6. Néanmoins, le PLGA, capable

d'acidifier efficacement le lysosome, présente des pKa de 3.8 et 3.9, donc plus élevés que ceux de l'acide oxalique et a permis une acidification plus importante. En effet, le taux de chargement en substance active est également à prendre en compte et des pKa plus élevés ne sont alors pas assurément un signe d'une meilleure acidification.

L'ouverture de l'anhydride succinique a été réalisée dans des conditions de désymétrisation, comme décrit par Catry *et al.*¹⁹⁰ (**Figure 77**). La réaction de l'alcool primaire du nucléolipide avec l'anhydride en présence de DMAP a permis l'obtention du composé sous forme de succinate. Cela passe par l'ouverture du cycle et la formation d'un intermédiaire acyl pyridinium pouvant réagir avec l'alcool. La réaction a été menée sur les composés **32**, **21** et **33** permettant l'obtention des composés **42**, **43** et **44** possédant respectivement des longueurs de chaîne lipidiques en C12, C16 et C20. Ces composés présentent donc une chaîne de longueur moyenne (C16), identique aux différents composés obtenus jusqu'alors, une chaîne plus longue (C20), en vue d'améliorer potentiellement la liposolubilité et d'une chaîne plus courte (C12) afin d'en estimer l'impact. Une diminution plus importante de la chaîne lipidique n'est pas envisagée car des lipides plus courts sont réputés plus toxiques.

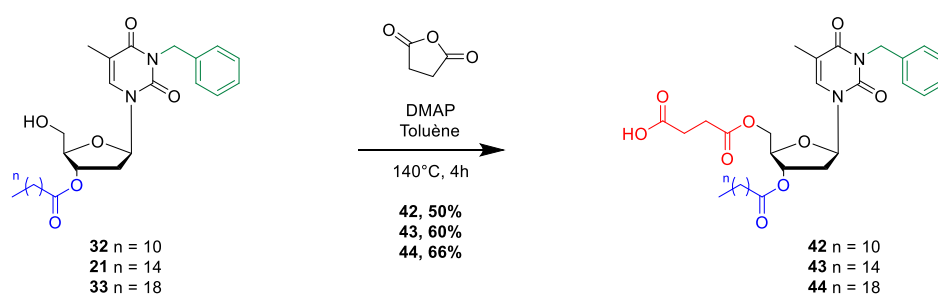


Figure 77 | Synthèse des prodrogues portant l'acide succinique, par réaction d'ouverture de cycle de l'anhydride.

Il est tout de même essentiel de noter que les réactions ne sont pas complètes et qu'il reste systématiquement une très faible quantité de substrat de départ. Cela complique les purifications lors de la chromatographie sur gel de silice. En effet, la présence d'acide libre conduit le composé à accrocher à la silice et ainsi à diffuser, ce qui conduit à des fractions de mélange. Les rendements peuvent donc être améliorés par plusieurs purifications successives. Finalement, les nucléolipides ont été obtenus avec trois longueurs de chaîne ce qui a permis

¹⁹⁰ Catry, M. A., Madder, A. *Molecules*. **2007**, 12, 114-129.

d'évaluer leur différence de solubilité dans l'huile et d'envisager l'étude de leur cytotoxicité respective.

2. Solubilité des nucléolipides dans l'huile

Comme pour le cas du nucléolipide oxalate, la concentration en dérivés nucléosidiques au sein de la nanoformulation s'est avérée dépendante de leur solubilité dans l'huile. La solubilité maximale des composés **42**, **43** et **44** dans les triglycérides à chaînes moyennes (Miglyol® 812N), en présence de lécithines d'œufs a été évaluée dans les conditions similaires à celles utilisés lors du processus de formulation. Les composés ont été solubilisés dans la phase huileuse à 70°C et aux ultrasons, en faisant varier leur concentration. Les solubilités ont été suivies sur 2 jours afin d'observer un éventuel recul de solubilité. Les composés **42** et **44** se sont avérés solubles jusqu'à 30 mg dans 200 mg de phase huileuse, soit un pourcentage de chargement maximal de 3 % (m/m) dans les nanoémulsions finales. Le composé **43** a quant à lui pu être solubilisé jusqu'à 70 mg pour 200 mg de phase huileuse, soit 7 % (m/m) dans la formulation finale.

Ces résultats sur la solubilité des nucléolipides en phase huileuse sont inattendus et à l'opposé de notre hypothèse d'origine selon laquelle une augmentation de la longueur de la chaîne lipidique permettrait une amélioration de la solubilité. De plus, une simulation des log P, c'est-à-dire du coefficient de partage octanol/eau, des composés finaux a été réalisée grâce à l'outil de prédiction développé par le *Swiss Institute of Bioinformatics*¹⁹¹. Plus la valeur du log P est élevée, plus la molécule est lipophile. Au contraire une valeur négative correspondra à une molécule hydrophile. La prédiction prend en compte plusieurs méthodes de calcul pour en extraire une valeur moyenne. Les valeurs obtenues suivant ce modèle montrent une augmentation de la lipophilie des composés avec l'augmentation de la longueur de leur chaîne grasse (**Tableau 9**). Néanmoins, l'expérimentation va à l'encontre du modèle prédictif informatique en mettant en évidence que la solubilité maximale est obtenue pour le composé **43** et que la solubilité des composés **42** et **44** est similaire.

¹⁹¹ *Swiss Institute of Bioinformatics*. <http://www.swissadme.ch/index.php> (accessed 2022-08-02)

Tableau 9 | Estimation informatique de la lipophilie des nucléolipides en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée.

	CLog P
Composé 42 (C12)	4.92
Composé 43 (C16)	6.34
Composé 44 (C20)	7.67

Ces observations sont en corrélation avec des observations sur d'autres travaux du laboratoire portant sur la conception de nucléolipides oléogélateurs¹⁹². Une autre hypothèse alternative peut être avancée au vu de la composition de la phase huileuse elle-même qui est composée de triglycérides à chaînes moyennes, en C8 et C10 (avec un ratio d'environ 60/40%) (**Tableau 10**). Ceci ne favoriserait peut-être pas la solubilité de composés à chaîne C20. Par ailleurs, les lécithines utilisées sont composées de 80% de phosphatidylcholine, qui comportent deux chaînes carbonées lipidiques : une chaîne oléique (C18:1) et palmitique (C16). La présence de tels lipides pourrait améliorer la solubilité de composés présentant une chaîne de même longueur, apportant ainsi une explication possible quant à la solubilité accrue du composé **43**, de chaîne carbonée en C16.

Tableau 10 | Composition en acides gras du Miglyol® 812N.

Nature des acides gras	Pourcentage
Acide caproïque (C6:0)	< 2.0 %
Acide caprylique (C8:0)	50.0 - 65.0 %
Acide caprique (C10:0)	30.0 - 45.0
Acide laurique (C12:0)	< 2.0
Acide myristique (C14:0)	< 1.0

3. Formulation des nanoémulsions

Les trois composés ont été solubilisés à 1% (m/m) afin d'avoir une comparaison avec les résultats des évaluations biologiques du composé **37**, portant l'acide oxalique. Au vu des solubilités, les composés **42** et **44** ont été formulés également à 3% et le composé **43** à 3% mais

¹⁹² Klufits-Edel, A. Travaux de thèse **2019-2022**.

aussi à 7%. La composition des nanoémulsions formulée est similaire à celle du composé **37** (Tableau 11).

Tableau 11 | Compositions des nanoémulsions chargées avec les nucléolipides acides.

Nanoémulsion composition	
Nucléolipide	1-7%
Lipoïd® E80	1.2%
Miglyol® 812N	20%
Tween® 80	2.5%
Glycérol	2.25%
H ₂ O <i>qsp</i>	100%

Les nanoémulsions ont été produites selon le même procédé que décrit précédemment. Une nanoémulsion non chargée a également été préparée pour servir de contrôle lors des évaluations biologiques de cytotoxicité et d'acidification. Les analyses de la répartition granulométrique par DLS ne montrent pas d'impact négatif de l'incorporation des nucléolipides dans le système. Les caractéristiques granulométriques montrent des formulations monodisperses dont les diamètres moyens des globules d'huile sont inférieurs à 200 nm, et dont le potentiel ζ est inférieur à -30 mV. Ces conditions sont corrélées à une excellente stabilité dans le temps avec un recul de plus d'un an sans modification substantielle de la granulométrie.

Tableau 12 | Caractéristiques des nanoémulsions chargées en nucléolipides acides 44.

	Diamètre (nm)	PdI	Potentiel ζ (mV)
NE 44-1%	156.5 ± 2.7	0.099	-34.4 ± 1.0
NE 44-3%	198.8 ± 2.7	0.135	-33.8 ± 0.8
NE contrôle	175.2 ± 1.4	0.125	-31.2 ± 1.8

4. Dosage des composés nucléolipidiques acides

Pour s'assurer de l'intégrité du composé nucléolipidique sous sa forme acide au sein des NE et de la possibilité de cliver la liaison ester en 5' afin d'en libérer l'acide, un titrage des composés formulés en NE a été réalisé. Le titrage acido-basique des formulations à 1% de 1 mL a été opéré par ajout progressif de soude à 0.5 mol.L⁻¹ (paliers de 2 μ L) et agitation

manuelle. Les mesures des valeurs de pH ont été réalisées par pH-mètre, avec une électrode en verre, après chaque ajout de soude. Les titrages des NE des composés **42**, **43** et **44** ont montré la présence de deux sauts de pH, caractéristiques des diacides et traduisant la consommation des deux fonctions acides issues de l'acide succinique (**Figure 78**). Le premier saut de pH débute dès le premier ajout de soude, du fait de la disponibilité « immédiate » du premier acide. Le second saut de pH correspond à la seconde fonction acide, libérée dans un second temps, à la suite du clivage de la liaison ester avec le nucléolipide. Il est à noter que les pKa ainsi retrouvés ne correspondent pas tout à fait aux valeurs attendues mais présentent un décalage vers les valeurs plus élevées. Nous avons fait l'hypothèse que ce décalage pourrait être dû à l'encapsulation des prodrogues acides au sein des globules d'huile des nanoémulsions et que la mesure du pH dans une solution non totalement aqueuse se trouve légèrement altérée. Ces titrages effectués sur des nanoémulsions similaires à celles qui ont été utilisées pour les évaluations *in vitro* permettent de valider le caractère acidifiant au sein de la formulation des nucléolipides synthétisés.

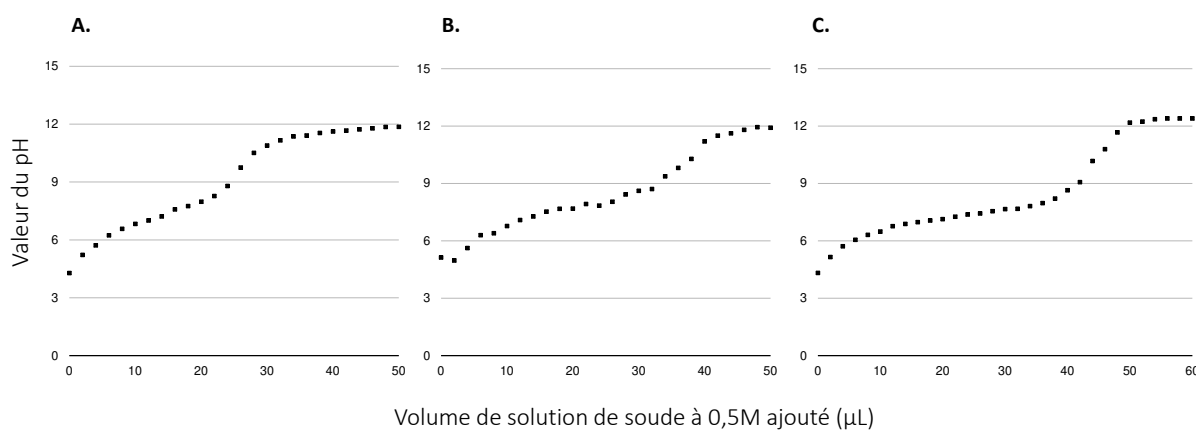


Figure 78 | Courbes de dosage acido-basique des nucléolipides acides formulés au sein de nanoémulsions à 1% m/m. A. Composé 42 (nucléolipide en C12). B. Composé 43 (nucléolipide en C16). C. Composé 44 (nucléolipide en C20).

5. Évaluation biologique

5.1. Évaluation de la viabilité cellulaire

Pour évaluer la toxicité cellulaire de nos formulations et donc de nos nucléolipides, leur cytotoxicité a été étudiée sur des cellules de neuroblastomes humains exposées avec 1 µL dilué à 1/1000. La viabilité cellulaire a été mesurée sur deux lignées cellulaires de neuroblastomes humains BE(2)-M17 après traitement avec 1 µL de NE diluée au 1/1000. Les évaluations ont

donc été réalisées sur la lignée cellulaire saine shScr-1 et sur des cellules dont le gène ATP13A2 a été déplété (sh403-1) pour obtenir un pH lysosomal élevé. Les évaluations réalisées par le Dr. Benjamin Dehay, ont mis en évidence une cytotoxicité dès 24h de la NE – **43**, dès 3% et ce pour les deux types de cellules. De plus, la NE moins chargée (**43** à 1%) s’est avérée toxique à 48h. En revanche, les nanoémulsions blanches, et celles chargées avec les composés **42** et **44** n’ont présenté aucune toxicité à 24h et à 48h (**Figure 79**).

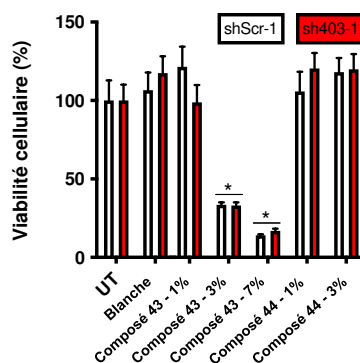


Figure 79 | Viabilité cellulaire des cellules M17 contrôles (shScr-1) et déplétées du gène ATP13A2 (sh403-1), en l'absence (UT) ou en présence des nanoémulsions chargées 43 et 44 après 24h * p < 0.05 par rapport aux cellules non traitées.

Cette différence de toxicité en fonction de la longueur de chaîne lipidique du nucléolipide est difficile à expliquer. En effet, dans la cellule, lorsque le globule huileux a libéré le nucléolipide, il peut être dégradé. C’est d’ailleurs en tenant compte des liaisons clivables que ces prodrogues ont été conçues. Sous l’effet des enzymes de type estérases et lipases, la position 5’ est déprotégée pour libérer l’acide succinique et « régénérer » la fonction OH libre du nucléolipide naturel. En position 3’, les lipases permettent la libération de l’acide gras qui pourrait également contribuer à l’acidification du milieu. Les différents nucléolipides sont donc en théorie aussi biodégradés pour conduire à l’intermédiaire thymidine *N*-benzylée **28** de départ. (**Figure 80**) À ce stade et dans le cadre de notre étude, il est néanmoins impossible de déterminer des cinétiques de déprotection en position 5’ et 3’. Plusieurs paramètres peuvent influencer sur l’action enzymatique. Tout d’abord, deux types d’enzymes peuvent intervenir : les lipases qui peuvent cliver l’ester lipidique et les estérases qui peuvent cliver les deux liens esters. Les liens sont par ailleurs sur des positions différentes de sucre. Le lipide est sur l’alcool secondaire en 3’ quand l’acide organique est sur l’alcool primaire en 5’. Le clivage sur l’alcool primaire est donc potentiellement plus rapide que sur l’alcool secondaire. Néanmoins, la

position 5' est en *cis* par rapport à la nucléobase ajoutant un encombrement pouvant perturber l'action des estérases. Le lipide, bien qu'en *trans* par rapport à la nucléobase, peut, par sa chaîne carbonée, rendre difficile l'accès à la liaison ester. Il est donc impossible de prévoir les cinétiques de déprotection. Aussi plusieurs intermédiaires de dégradation peuvent être obtenus. Dans le cas où l'action des lipases est plus rapide que celle des estérases, la dégradation peut conduire au composé *N*-benzyle, portant l'acide en 5' et à la libération du lipide. L'action des estérases est nécessaire pour libérer le diacide organique. Si les estérases ont une action plus rapide que les lipases, le clivage enzymatique permet l'obtention du nucléolipide 5'-OH, et donc la libération de l'acide succinique. Quant à l'action conjointe des lipases et estérases, elles permettraient la récupération rapide du nucléolipide benzylé.

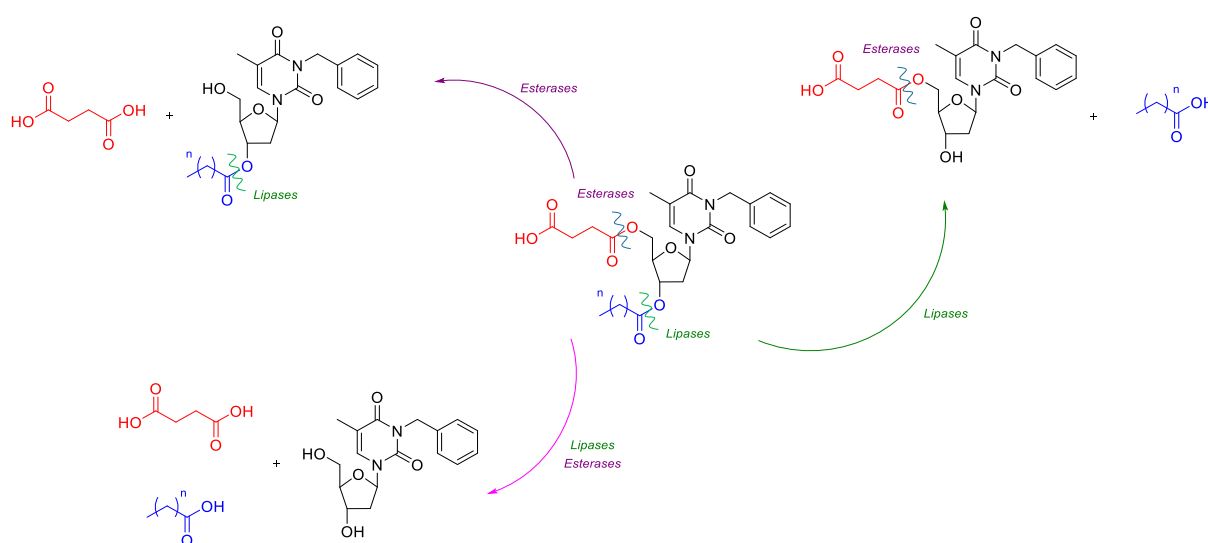


Figure 80 | Schéma des produits de dégradation du nucléolipide-acide par suite du clivage des esters par les enzymes.

Afin de vérifier si les produits de dégradation, correspondant donc aux intermédiaires réactionnels, engendrent une cytotoxicité ou une acidification, certains ont pu être évalués *in vitro*. C'est le cas des composés nucléolipidiques en C16 et C20 conservant leur position 5' libre et ne présentant donc aucun acide organique. Pour cela les composés **21** et **33** ont été formulés en nanoémulsions à 3% m/m, dont les caractéristiques granulométriques sont précisées en **Tableau 13**.

Tableau 13 | Caractéristiques des nanoémulsions chargées en composés non acides.

	Diamètre (nm)	PdI	Potentiel ζ (mV)
NE 21- 3%	174.3 \pm 1.6	0.119	-36.1 \pm 1.6
NE 33- 3%	159.0 \pm 0.8	0.098	-31.1 \pm 2.0
NE contrôle	164.1 \pm 1.3	0.094	-33.6 \pm 0.2

Par ailleurs, les composés encapsulés au sein des nanoémulsions correspondent aux produits de dégradation des composés nucléolipidiques acides associés. À la suite du contact des émulsions concernées avec les cellules sh403-1 et shScr-1, la viabilité cellulaire n'a pas été impactée quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée du lipide (**Figure 81**). Cela permet de mettre en évidence que les produits issus du clivage du diacide succinique n'engendreront pas de toxicité, cet intermédiaire étant biocompatible.

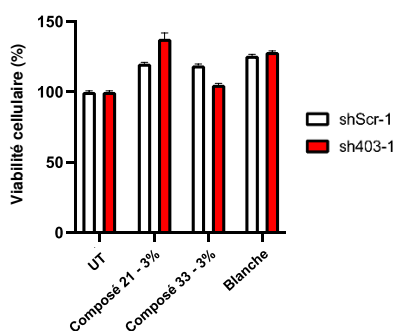


Figure 81 | Viabilité cellulaire des cellules M17 contrôles (shScr-1) et déplétées du gène ATP13A2 (sh403-1), en l'absence (UT) ou en présence des nanoémulsions chargées en nucléolipides 5'-OH, après 24h.

5.2. Evaluation du pouvoir acidifiant

Les mesures *in vitro* du pH lysosomal des cellules neuronales traitées avec les nanoémulsions non chargées et chargées en prodrogues **43** et **44** mettent en évidence un pouvoir acidifiant du composé avec la plus longue chaîne lipidique. Les composés **43** et **44** chargés à 1% (m/m) n'ont pas mis en évidence un pouvoir acidifiant statistiquement significatif, de même que la nanoémulsion blanche contrôle, non chargée. Le composé **43** ne peut par ailleurs pas être chargé à une concentration massique plus importante afin d'évaluer le pouvoir acidifiant car il présente une cytotoxicité dès 3% (m/m). Néanmoins, le composé **44** chargé à 3% (m/m) au sein de la nanoémulsion ne permet pas seulement d'acidifier les cellules sh403-1 présentant un pH altéré mais également d'en restaurer intégralement le pH (**Figure 82**). De plus la

restauration de l'acidité est visible dès 24 heures. Il est ainsi abaissé de pH = 5.5 à pH = 3 en engendrant une diminution de 2.5 unités pH que nous pouvons attribuer au clivage du diacide organique. Cette diminution de pH est même supérieure à celle obtenue dans les travaux antérieurs à la suite de la libération de PLGA au sein du lysosome (diminution de 2.28 unités pH). Ainsi, bien que l'acide succinique soit un diacide moins fort que l'acide oxalique et le PLGA, il permet une meilleure acidification. Par ailleurs et de façon prévisible, le pH des cellules saines (pH =2) n'est pas modifié par nos composés.

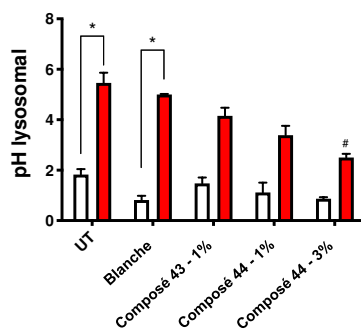


Figure 82 | Evaluation du pH lysosomal des nanoémulsions de nucléolipides d'acides succinique. Les valeurs du pH lysosomal ont été mesurées dans des cellules M17 contrôle (*shScr-1*) et déplétées d'*ATP13A2* (*sh403-1*), en l'absence ou en présence des nanoémulsions. *, $p < 0.05$ par rapport aux cellules non traitées *ShScr-1* ; #, $p < 0.05$ par rapport aux cellules non traitées *sh403-1*.

Le pouvoir acidifiant des composés nucléolipidiques 5'-OH **21** et **33** a également été évalué. L'acide succinique n'étant pas liposoluble, il n'a pas pu être solubilisé en phase huileuse. L'évaluation de son activité biologique une fois formulé au sein d'une nanoémulsion n'a donc pas pu être réalisée. Par ailleurs, solubilisé en milieu aqueux, il engendrerait très probablement une mort cellulaire sans pouvoir atteindre le lysosome. Les évaluations effectuées à partir de formulations des composés **21** et **33** ont mis en évidence une absence d'acidification des lysosomes par les composés nucléolipidiques « nus », prouvant que la diminution du pH lysosomal, observé pour les analogues acides **43** et **44** ne résulte pas de la libération de l'acide gras. De manière similaire à la nanoémulsion non chargée, aucune acidification du lysosome n'est à noter pour les nucléolipides 5'-OH en C16 et C20. (**Figure 83**).

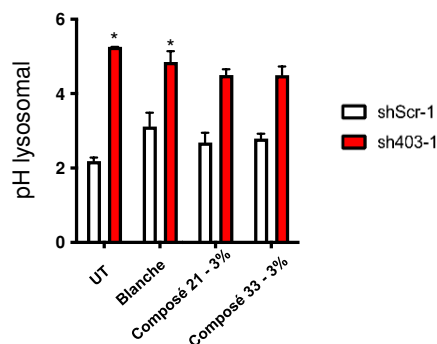


Figure 83 | Evaluation du pH lysosomal des nanoémulsions de nucléolipides 5'-OH. Les valeurs du pH lysosomal ont été mesurées dans des cellules M17 contrôle (*shScr-1*) et déplétées d'*ATP13A2* (*sh403-1*), en l'absence ou en présence des nanoémulsions. *, $p < 0.05$ par rapport aux cellules non traitées *ShScr-1*.

Ainsi, la dégradation de ces composés et le clivage de la liaison de l'ester palmitique ne sont visiblement pas à l'origine de la restauration du pH relevé lors de l'évaluation du composé **44**. Cette acidification est donc bien issue de l'apport des diacides organiques. Une concentration en prodrogue de 40 μM par millilitre permet donc une restauration totale du pH des lysosomes dysfonctionnels. Ces résultats particulièrement intéressants ont fait l'objet d'une publication en 2021, dans le journal *Frontiers in Chemistry*¹⁹³. L'utilisation de telles prodrogues portant un acide organique biocompatible est donc une approche prometteuse pour permettre une acidification et restaurer la fonction lysosomale *in vitro* sur des cellules parkinsoniennes modèles.

¹⁹³ Brouillard, M. Barthélémy, P., Dehay, B., Crauste-Mancie, S., Desvergnès, V. *Front. Chem.* **2021**, 9.

4. Approche synthétiques à des dérivés multimériques

En parallèle de ce travail sur les nucléolipides-acidifiants, nous avons voulu concevoir des composés multimériques qui porteraient plusieurs nucléolipides sur un même cœur carboné. L'idée était d'apporter une même quantité d'unités acides en réduisant la quantité de matière de prodrogue et donc en réduisant la concentration en principe actif. En effet, dans le but d'une approche translationnelle, il est important d'envisager un apport en substance active la plus faible possible pour obtenir une efficacité. Ces molécules ont été imaginées par analogie structurale avec les composés « dits » multivalents et notamment les dendrimères. L'idée est donc d'étudier si de tels composés multimériques permettraient une acidification comparable à celle engendrée par plusieurs unités nucléolipidiques monomériques ou si même ils conduiraient à une amélioration de l'acidification en engendrant un effet synergique.

I. Origine de l'approche : analogie avec la multivalence

La multivalence se définit par ses interactions multiples et simultanées entre des ligands et des récepteurs spécifiques. Ce phénomène est notamment observé dans les interactions sucré-lectines en surface des cellules¹⁹⁴. Ces interactions sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques cellulaires comme la réponse immunitaire ou les inflammations. Les lectines présentent cependant une faible affinité avec leurs cibles. La liaison de plusieurs sites simultanément permet d'accentuer considérablement la constante d'affinité et la sélectivité pour conduire à une réponse biologique, en empêchant des interactions non souhaitées, en imposant une forme spécifique... L'interaction entre un virus et sa cellule hôte repose par exemple sur la multivalence¹⁹⁵. À la suite de la liaison du virus aux glucides en surface de la cellule, des liaisons supplémentaires vont être créées par la courbure de la membrane cellulaire en raison de la forme globulaire du virus. S'ensuit l'endocytose du virus au sein de la cellule hôte.

L'affinité, entre les ligands multivalents et leurs cibles repose sur leur interaction¹⁹⁶. Le multivalent peut se lier à son récepteur cible par effet chélate, c'est-à-dire par sa liaison à plusieurs sites de fixations du même récepteur. Par ailleurs, le multivalent peut lier le récepteur

¹⁹⁴ Mammen, M. Choi, S-K., Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.

¹⁹⁵ Fasting, C., Schalley, C. A., Weber, M. Seitz, O., Hecht, S., Koksche, B., Dervedde, J., Graf, C., Knapp, E-W., Haag, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10472-10498.

¹⁹⁶ Decroocq, C. Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt thérapeutique : chimie click, multivalence et maladies génétiques rares. Ph.D. Dissertation, Université de Strasbourg, 2012.

à la fois par un site de fixation principal et par un site de fixation secondaire. L'affinité de ligand pour ce récepteur est ainsi accrue. Il est possible que le ligand se lie à plusieurs récepteurs et induise ainsi une agrégation des récepteurs. C'est l'effet cluster.

L'exemple le plus connu de multivalent synthétique est le dendrimère. Les dendrimères sont des molécules construites à partir d'un cœur central auquel est lié des groupements terminaux pouvant être des ligands de récepteurs, mais aussi des substances actives (**Figure 84**)¹⁹⁷. Les ramifications peuvent être plus ou moins nombreuses, chaque couche étant ainsi désignée sous le terme de « génération ». Aussi, ces molécules peuvent véhiculer des substances actives liées en surface ou encapsuler des molécules (notamment des acides nucléiques) au sein de cavités formées par la structure. L'utilisation de tels systèmes pour véhiculer des substances actives a été présentée au cours du chapitre II. Notre approche s'inspire de ces objets mais est beaucoup plus modeste. Il s'agit de synthétiser des petits arbres portant des branches sur lesquelles seront fixés les nucléolipides acides. A notre connaissance, aucune molécule de ce type n'est décrite dans la littérature. Compte tenu du fait que nos composés ne présentent pas de quelconque interaction avec une cible biologique, nous préférons parler de multimères. En revanche, il serait possible d'envisager de greffer des ligands en périphérie, afin de permettre une interaction de la molécule avec des transporteurs spécifiques pour faire du ciblage et ainsi de pouvoir réaliser des évaluations *in vivo*. En l'occurrence un ligand de transporteurs de dopamine (DAT) serait intéressant dans notre cas.

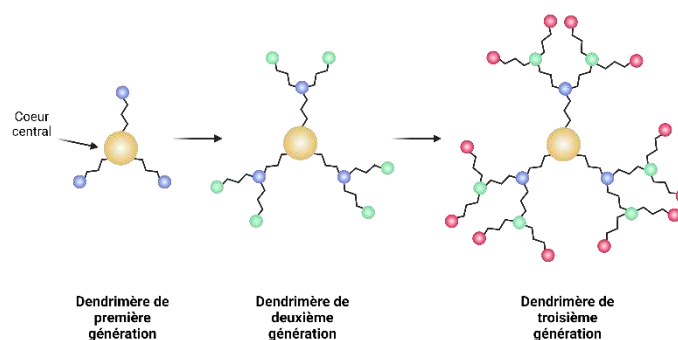


Figure 84 | Approche synthétique des dendrimères. A partir du cœur central et pour l'obtention du dendrimère de troisième génération droite, les enchaînements d'unités répétitives sont ajoutés de même que les fonctions périphériques. Adapté de Moreno et al.¹⁹⁷

¹⁹⁷ Moreno, P., Bouillon, C., Quéléver, G., Peng, L. *L'act. Chim.* **2014**, 381, 13-20.

À partir de ce principe, nous avons fait l'analogie sur la possibilité d'obtenir une efficacité thérapeutique accrue par l'apport d'un multimère de nos nucléolipides. Aucun complexe de type ligand-récepteur n'est impliquée dans notre cas mais nous souhaitons étudier un possible effet synergique lors de l'apport d'unités acides au sein du lysosome.

II. La chimie click pour la formation de liaisons triazoles

La première approche envisagée repose sur l'utilisation de la chimie click pour créer des liaisons covalentes entre un azoture et un alcyne. Le concept de chimie click, introduit en 2001 par Sharpless regroupe un ensemble de réactions simples, efficaces et modulables présentant de bons rendements et qui ont été largement exploitées pour la bioconjugaison. Cette famille de réactions comprend la cycloaddition de Diels-Alder, la réaction thiol-maléimide ou encore les cycloadditions dipolaires. L'une des réactions les plus utilisées est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne vrai et un dérivé azoture qui conduit aux deux isomères triazoles 1,4 et 1,5-disubstitués (**Figure 85**).

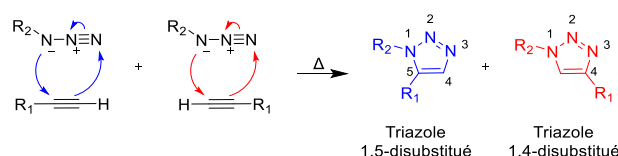


Figure 85 | Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire thermique de Huisgen.

1. La CuAAC

La cycloaddition de Huisgen a ensuite été adaptée en utilisant une catalyse au cuivre (I)^{198,199} afin d'obtenir un seul des deux isomères. C'est la célèbre CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*) (**Figure 86**). Tout d'abord, l'alcyne forme un Cu-acétylure, **A** activé qui réagit avec l'azoture pour former le métallocycle au cuivre **B**. Ce métallocycle à 6 chaînons subit une contraction pour conduire au cuivre triazole. La protonation du cuprate triazole permet de former le triazole 1,4 et de libérer le cuivre. Cette catalyse, en plus de conduire à la formation du seul isomère 1,4, permet d'accélérer la réaction, tout en diminuant la température de réaction. Ce lien intramoléculaire est très utilisé dans la synthèse de

¹⁹⁸ Tornøe, C., Christensen, C., Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

¹⁹⁹ Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. R. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2569-2599.

biomolécules en raison de sa stabilité et sa capacité à engendrer des interactions π -stacking résultant du cycle aromatique.

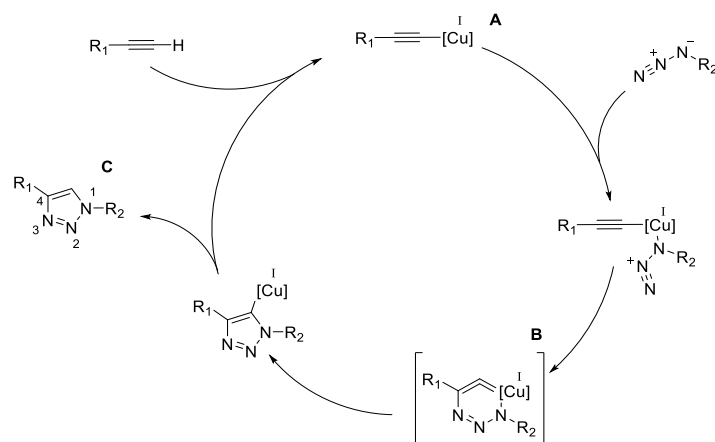


Figure 86 | Mécanisme simplifié de la 1,3-cycloaddition catalysée au Cu(I), proposé par Himo *et al.*²⁰⁰

Plusieurs conditions sont recensées dans la littérature pour mettre en œuvre cette réaction. Le cuivre peut être apporté directement sous forme de sels de cuivre (I), par l'introduction de iodure de cuivre par exemple, en présence de base telle que la triéthylamine ou la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA). Néanmoins, les CuAAC sont souvent réalisées en milieu aqueux ce qui ne permet donc pas l'utilisation de cuivre (I), instable. Il est donc le plus souvent généré *in situ* par la réduction des sels de cuivre (II), de type cuivre pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou d'acétate de cuivre ($[\text{Cu}(\text{OAc})_2]$) grâce à un réducteur en excès, généralement l'ascorbate de sodium. Une troisième possibilité consiste en l'utilisation de cuivre métallique par l'ajout d'un large excès de tournure de cuivre.

La méthode usuellement utilisée consiste en la génération de cuivre (I) *in situ*. Bien qu'efficace, la réaction peut être accélérée par l'ajout de ligands. Ils permettent de complexer le cuivre pour le stabiliser en tant que cuivre (I) et le conserver disponible pour le mécanisme réactionnel. Parmi ces ligands, on retrouve par exemple le THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine) ou le TBTA (Tris(benzyltriazolylméthyl)amine) (**Figure 87**).

²⁰⁰ Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.

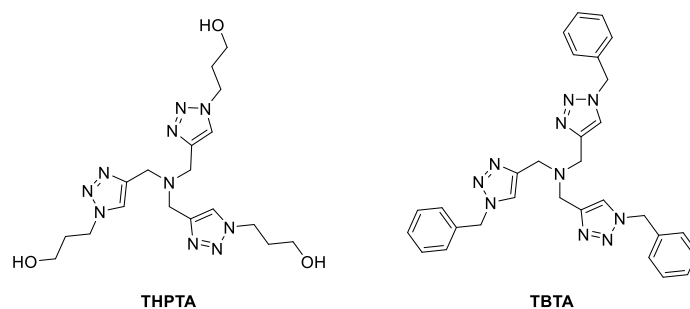


Figure 87 | Exemples de ligands utilisés pour stabiliser le cuivre lors de la CuAAC.

Une seconde stratégie pour accélérer la réaction de CuAAC consiste en l'utilisation des micro-ondes. La synthèse assistée par micro-ondes permet d'atteindre rapidement des températures très élevées permettant d'accélérer la cinétique de réaction. Ainsi plusieurs auteurs rapportent l'utilisation de ce chauffage pour réduire le temps de réaction ou même pour obtenir un produit inaccessible lors de conditions sur paillasse²⁰¹.

2. La RuAAC

Une méthodologie a également été développée afin d'obtenir sélectivement l'isomère 1,5 en utilisant un complexe de ruthénium comme catalyseur, c'est la RuAAC (*Ruthenium-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*)²⁰². De plus, cette stratégie peut également être utilisée pour des alcynes internes et non plus uniquement pour des alcynes terminaux ouvrant la possibilité à l'obtention de triazoles trisubstitués.

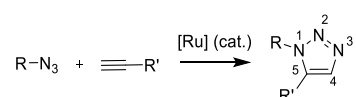


Figure 88 | Cycloaddition 1,5 par RuAAC.

3. Cycloaddition sans cuivre

La formation d'une liaison triazole régiospécifique nécessite l'utilisation de métaux en quantités catalytiques, ce qui présente plusieurs limitations. Le ruthénium est particulièrement cher et son utilisation n'est ainsi pas des plus courantes et cette réaction de chimie click est ainsi majoritairement réalisée avec du cuivre. Néanmoins, dans le cadre d'obtention de molécules

²⁰¹ Kappe, C. O, Eycken, E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1280-1290.

²⁰² Johansson, J. R., Beke-Somfai, T., Stålsmeden, A. S., Kann, N. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 14726-14768.

pour des applications biologiques, des quantités résiduelles de cuivre peuvent être problématiques. Ce métal est azophile, c'est-à-dire qu'il présente une affinité pour les atomes d'azote. Or en conditions physiologiques, les amines sont répandues parmi les biomolécules comme les protéines ou les peptides et le cuivre peut donc être chélaté par ces fonctions. Par ailleurs, un lien a été fait entre les taux de cuivre et le stress oxydatif notamment. En engendrant un stress oxydatif cellulaire, les mécanismes de création de ROS (*Reactive Oxygen Species*) sont toxiques pour les organismes et ils accentuent notamment le processus pathologique dans la maladie de Parkinson par exemple (chapitre I). Ces inconvénients ont conduit au développement d'une cycladdition qui s'affranchit de l'utilisation de catalyseur métallique. L'approche principale permettant une réaction click sans cuivre est la SPAAC (*Strain-Promoted Azide Alkyne Cycloaddition*). Développée par Bertozzi *and coll.* cette réaction implique des cyclooctynes substitués et des dérivés azotures (**Figure 89**)²⁰³. Bien que biocompatible, cette réaction est plus lente que la CuAAC et non régiosélective.

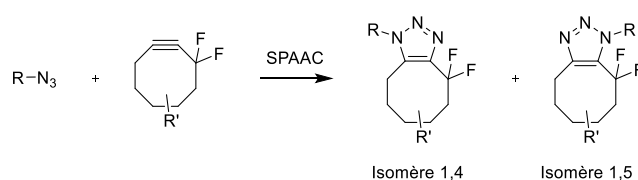


Figure 89 | Réaction SPAAC pour la formation d'un triazole.

Au cours de notre travail, le but était d'obtenir les molécules cibles. Nous avons donc dans un premier temps utilisé la CuAAC en cherchant les conditions les plus adéquates, les substrats étant aisément accessibles.

III. Première approche synthétique pour l'obtention d'un multimère

1. Synthèse du cœur carboné des composés multimériques

Dans un premier temps, des conditions classiques ayant fait leurs preuves ont été choisies afin d'obtenir notre cible synthétique. L'objectif premier était d'obtenir le composé quand bien même les conditions réactionnelles ne soient pas optimales.

La synthèse d'un composé tétramérique de quatre unités nucléolipidiques nécessite un cœur carboné central. Le pentaerythritol est le plus simple des cœurs carbonés. L'obtention du

²⁰³ Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.

partenaire azoture a été envisagée selon deux approches. La première consiste en la réaction d'azoture de sodium sur l'analogue bromé, à chaud (**Figure 90**)²⁰⁴. Cette réaction est plutôt efficace mais la purification s'est avérée extrêmement difficile. Des purifications successives sur gel de silice n'ont pas permis d'obtenir un composé isolé. Il semblerait qu'en plus de la molécule tetraazoture de départ, des dérivés intermédiaires mono, di ou tri-substitués aient été obtenus en faible quantité. Cela a été observé bien que la réaction ait été laissée 15h de plus à TA. La seconde approche consiste en la synthèse d'un intermédiaire pentaerythritol tetrakis (*p*-toluènesulfonyl) substitué par l'azoture de sodium pour obtenir le pentaerythritol tetraazoture²⁰⁵. L'azidation directe des alcools présentant de bons rendements, la première voie de synthèse a été privilégiée. Le cœur azoté a ensuite été utilisé sans purification, les différents essais n'ayant pas amélioré la pureté du produit.

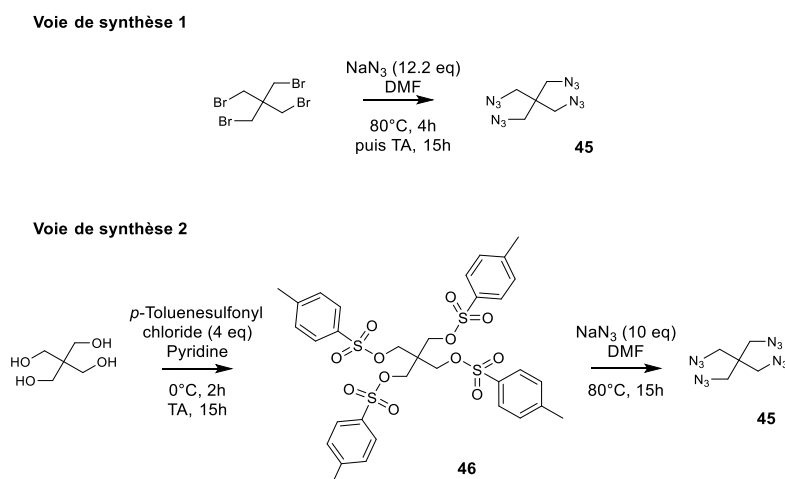


Figure 90 | Voies de synthèse pour l'obtention du cœur carboné tetraazoture de pentaérythrityle.

2. Conception et synthèse de nucléolipide tétramérique

Dans un premier temps, la réaction de chimie click sur le cœur azidé devait être réalisée avec le composé **48** (**Figure 91**). Les étapes d'estérification en 3', de déprotection l'éther silylé et de fonctionnalisation par l'acide organique étaient envisagées en un second temps pour éviter un encombrement trop important de la molécule au moment du couplage des deux partenaires.

²⁰⁴ Hayes, W., Osborn, H. M. I., Osborne, S. D., Rastall, R. A., Romagnoli, B. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 7983-96.

²⁰⁵ Fei, Y., Liu, C., Chen, G., Hong, C. *Polym. Chem.* **2019**, 10, 3895-3901.

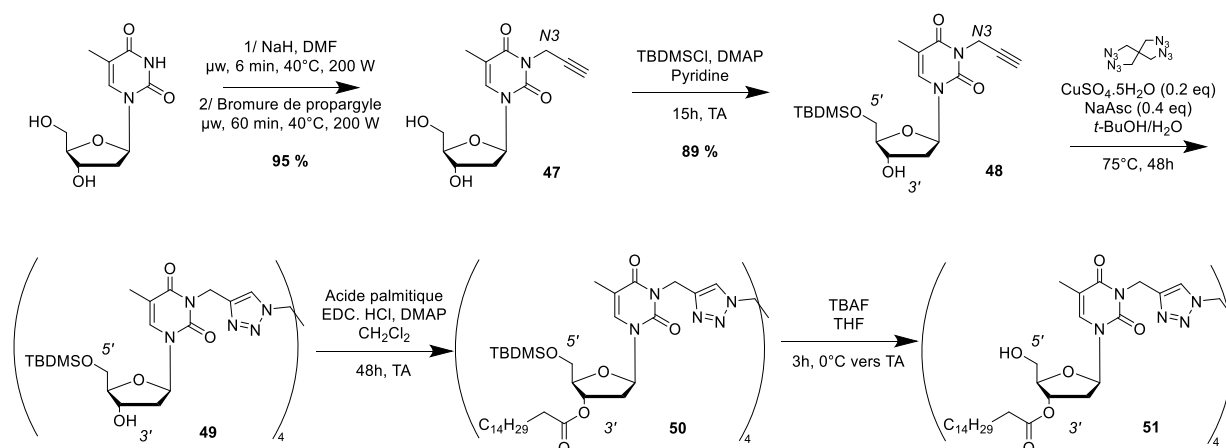


Figure 91 | Première voie de synthèse du multimère.

La réaction CuAAC à partir du composé **48** a conduit à l'obtention du composé **52** trimérique (et non tétramérique) avec un rendement de 43% seulement. Les conditions de réaction pouvant être optimisées nous avons tout de même poursuivi la séquence réactionnelle mais l'estérification des position 3' s'est avérée incomplète (**Figure 92**). Les analyses HRMS ont montré l'obtention du composé majoritairement substitué sur une seule des trois positions et une faible proportion du tétramère a été doublement estérifié. Par ailleurs, l'isolement des composés n'a pas été possible. L'encombrement de la molécule qui se forme doit être un élément limitant l'accès des positions libres. Ces premières difficultés nous ont conduit à modifier l'approche synthétique de ces composés.

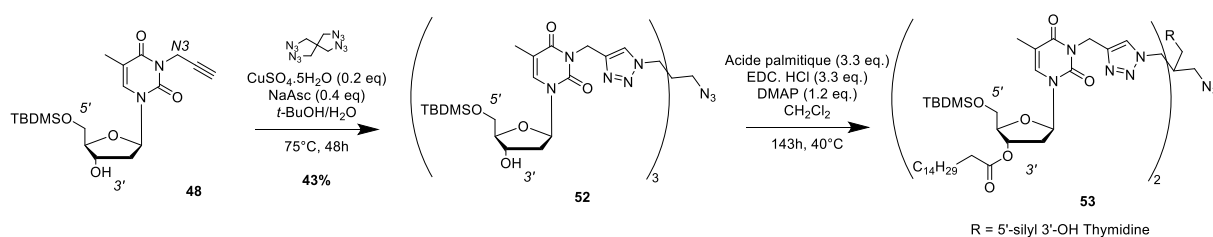


Figure 92 | Synthèse du premier composé multimérique.

La seconde approche, dérivée de cette première stratégie a été d'envisager l'estérification en 3', qui semblait gênée par l'encombrement stérique, avant la réaction de CuAAC. Une fois l'objet tétranucléolipide formé, il était alors prévu d'effectuer la réaction d'ouverture de l'anhydride succinique (**Figure 93**). Pour éviter toute réaction secondaire potentielle due au groupement acide, nous avons choisi de l'introduire lors de la dernière étape.

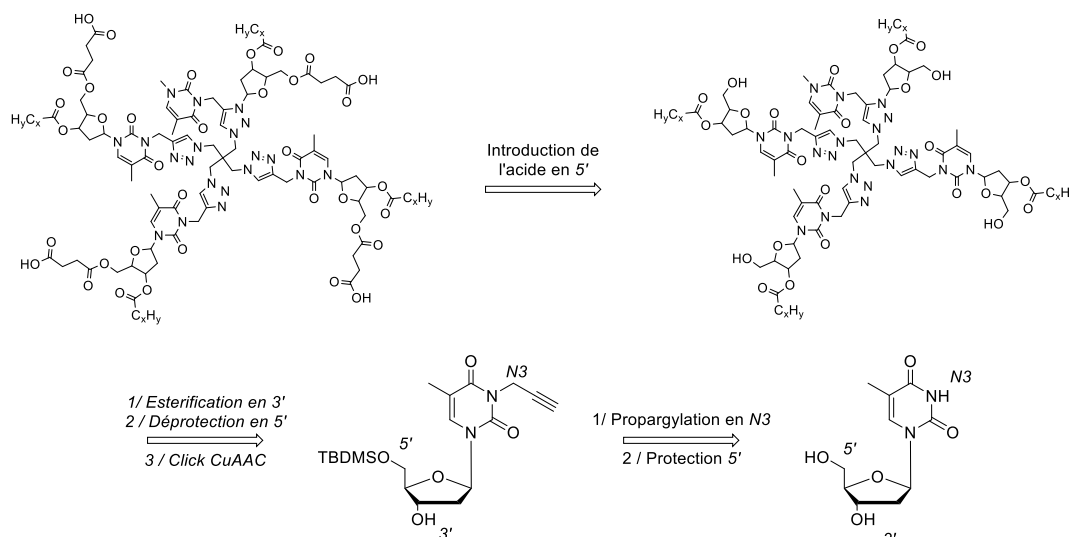


Figure 93 | Schéma rétrosynthétique de la synthèse du premier dérivé multimérique.

La synthèse a donc débuté par la fonctionnalisation de la position *N3* de la thymidine par réaction assistée aux microondes, en présence de bromure de propargyle et de NaH (**Figure 94**) dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la benzoylation de cette même position. La protection de la position 5' sous forme d'éther silylé et l'estérification sur l'alcool secondaire libre dans des conditions de couplage de Steglich ont conduit à l'obtention des composés **54**, **55** et **56** portant respectivement une chaîne lipidique en C12, C16 et C20. La déprotection de l'alcool libre en 5' en présence de TBAF a conduit aux composés **57**, **58** et **59** avec de bons rendements globaux.

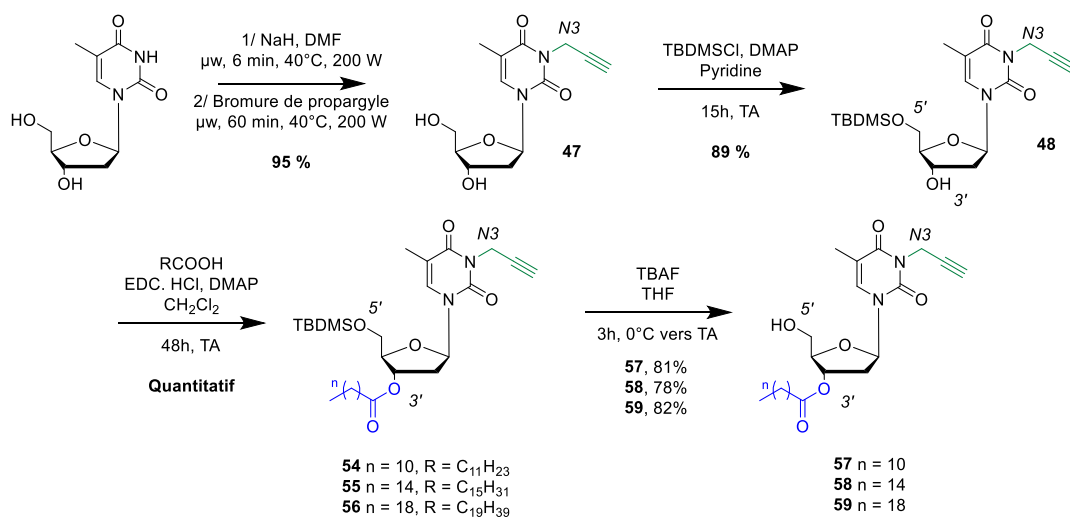


Figure 94 | Voie de synthèse des nucléolipides pour l'obtention des multimères.

La réaction de chimie click a été effectuée entre le brut réactionnel du tetraazoture et le nucléolipide propargylé. En premier lieu la synthèse du multimère avec le composé **58** a été effectuée dans du *t*-BuOH et de l'eau (**Figure 95**). Afin de privilégier la formation d'un tétramère au dépend de produits secondaires trimériques ou dimériques, 6 équivalents de nucléolipides ont été directement introduits. Les conditions de réaction choisies sont celles le plus couramment utilisées : du sulfate de cuivre (II) en quantités catalytiques en présence d'ascorbate de sodium, à 75°C. Au bout de 24 heures, une évolution de la réaction est visible en suivi CCM, mais la présence d'intermédiaires réactionnels nous a conduit à rajouter deux équivalents de composé **58**. 48 heures après le début de la réaction, celle-ci est arrêtée, permettant d'obtenir après une double purification laborieuse sur colonne de silice, le composé **60** avec un bon rendement de 82%. Il est à noter que de façon surprenante une petite fraction récupérée en sortie de colonne correspond au nucléolipide dont la position *N3* est libre. Le composé **60**, premier multimère nucléolipidique, a été totalement caractérisé sans aucune ambiguïté par RMN et HRMS.

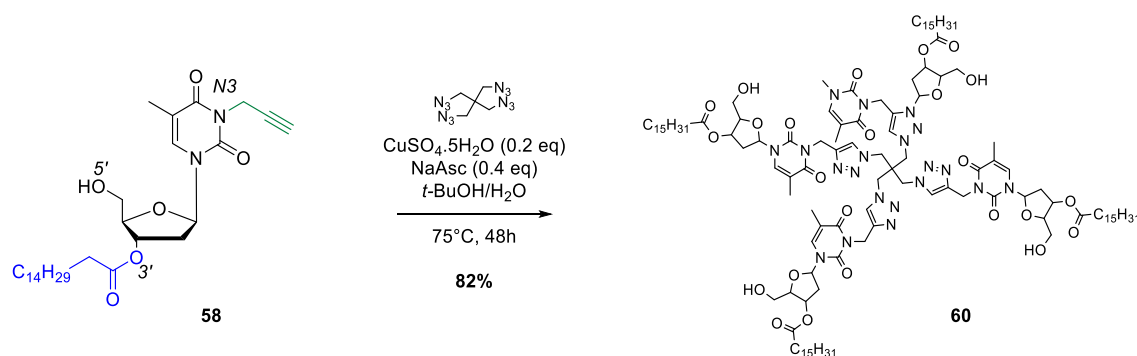


Figure 95 | Synthèse du premier composé multimérique d'analogue de nucléoside.

Sans que nous puissions l'expliquer, malgré tous nos efforts et en forçant les conditions de réaction, la même réaction sur les substrats **57** et **59** (chaînes lipidiques en C12 et C20) n'a pas conduit à l'obtention des composés désirés. Les stœchiométries ont été augmentées en vain. L'augmentation de la température tout comme le temps de réaction n'ont pas non plus eu d'effet. De façon très surprenante, sur CCM, aucune conversion n'a été observée et les produits de départ ont intégralement été récupérés. Néanmoins, une vérification ultérieure a mis en évidence que le partenaire azoture utilisé pour les essais portant sur les nucléolipides en C12 et en C20 et qui n'était pas issu de la même synthèse que celui utilisé pour le partenaire en C16, était moins « propre ». Ce composé étant utilisé brut, il semblerait que la qualité du *batch* utilisé puisse grandement influencer la réaction de couplage.

Par ailleurs, la littérature mentionnant la possibilité d'accélérer l'étape de chimie click par l'utilisation de réactions en conditions micro-ondes, des essais de couplage du pentaerythritol tetraazoture avec le nucléoside ont été menés. Des essais ont d'abord été effectués avec le composé modèle *N*-propargylé **47** (Figure 96).

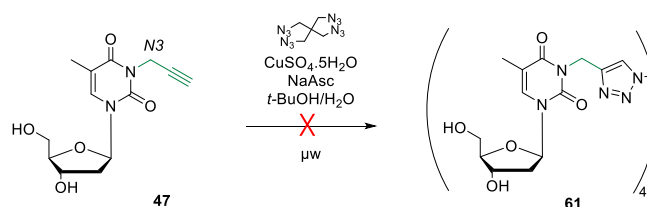


Figure 96 | CuAAC assistée par micro-ondes pour l'obtention du partenaire multimérique.

Le nucléoside solubilisé en présence du cœur carboné, du sulfate de cuivre et de l'ascorbate de sodium n'a conduit à aucune réaction après 30 minutes aux micro-ondes à 60°C. L'ajout du même nombre d'équivalents de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium pour essayer d'initier la réaction en plaçant le vial de réaction aux micro-ondes 30 minutes supplémentaires à engendrer la dégradation du composé et la récupération de la thymidine. L'essai réalisé avec la thymidine propargylé estérifiée par une chaîne en C16 en position 3' **58** s'est également avéré infructueux (Tableau 14).

Tableau 14 | Conditions de réaction click au micro-onde pour obtenir le partenaire multimérique. - signifie aucune conversion, * représente la dégradation du composé nucléosidique et la récupération de la thymidine.

Entrée	Nucléoside	Cœur carboné	CuSO ₄ .5H ₂ O	NaAsC	Durée	Conversion
1	1 eq	0.25 eq	0.1 eq	0.2 eq	30'	-
2	1 eq	0.25 eq	2 x 0.1 eq	2 x 0.2 eq	2 x 30'	*
3	NL : 1 eq	0.25 eq	2 x 0.1 eq	2 x 0.2 eq	2 x 30'	*

La dernière étape a finalement été réalisée sur le composé **60** par l'introduction des succinates sur les alcools primaires (Figure 97) par ouverture des anhydrides. Le composé final **62** a été obtenu avec un rendement limité de 30%. Cette difficulté à obtenir le tétramère voulu peut s'expliquer par un encombrement important limitant la réaction entre les positions 5' et les intermédiaires pyridiniums issus de l'ouverture des anhydrides par la DMAP. Une seconde

explication, pourrait provenir de la concentration du milieu réactionnel. En effet, le composé **60** s'est avéré insoluble dans le volume de toluène initialement prévu et une dilution importante a été nécessaire. Ces difficultés n'ont cependant pas empêché l'obtention du composé cible en quantité suffisante pour sa caractérisation et les essais physico-chimiques suivants.

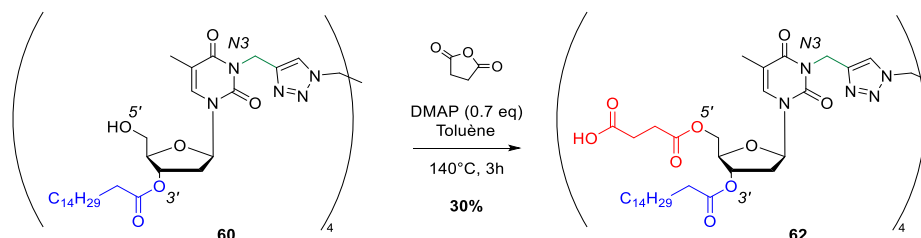


Figure 97 | Synthèse des multimères prodrogues par couplage des succinates sur les alcools libres du tétramères *via* l'ouverture des anhydrides succiniques.

3. Solubilité et formulation du multimère dans l'huile

En vue de son évaluation biologique *in vitro*, le tétramère a été formulé au sein d'une nanoémulsion L/H. Pour cela sa solubilité à chaud dans la phase huileuse a tout d'abord été évaluée.

Le composé s'est avéré insoluble que ce soit dans le Miglyol® 812N avec ou sans lécithines, même à une concentration de 1 mg pour 200 mg de phase huileuse qui correspondrait à une concentration de 0.1% (m/m) dans la formulation finale. Afin de pouvoir le formuler, le tétramère a été solubilisé dans un premier temps dans un minimum de solvant organique, dans lequel il était soluble, afin de favoriser sa solubilisation ultérieure dans l'huile. L'acétone, l'éthanol ou encore l'heptane n'ayant pas permis de solubiliser le composé, le dichlorométhane a été utilisé. Après solubilisation et homogénéisation du composé **62** dans le solvant organique, le volume correspondant à 10 mg de composé a été prélevé et ajouté à 200 mg de phase huileuse. L'évaporation du solvant organique à l'évaporateur rotatif a été effectuée avec soin de sorte à obtenir le composé dans l'huile (**Figure 98 B.**). La formulation de la nanoémulsion est ensuite réalisée dans les conditions usuelles, en utilisant la sonde à ultrasons après inversion de phase par ajout de la phase aqueuse (**Figure 98 A.**).

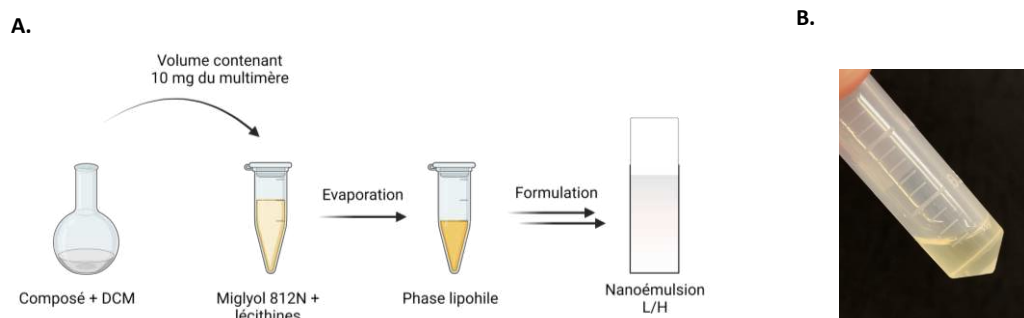


Figure 98 | Protocole simplifié de la formulation du composé 62 au sein d'une nanoémulsion L/H. **A.** Production de la nanoémulsion par solubilisation du multimère dans du dichlorométhane et la phase huileuse avant évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif. **B.** Aspect à chaud de la phase huileuse contenant le composé 62 et après évaporation du solvant organique.

La nanoémulsion ainsi obtenue a été caractérisée par DLS. Les caractéristiques granulométriques mesurées se sont avérées satisfaisantes et la nanoémulsion stable à plus de 5 mois. La cytotoxicité et le pouvoir acidifiant de ce composé n'ont toutefois pas encore été évalués à ce jour. Un dosage de la quantité résiduelle de DCM pourrait également être envisagé afin de pouvoir interpréter les résultats biologiques, les traces de solvant organiques pouvant être à l'origine de cytotoxicité.

Bien que le composé 62 ait pu être synthétisé et formulé avec efficacité tout en conservant une stabilité dans le temps, le recours à l'utilisation d'un solvant organique n'est pas souhaitable pour des applications biologiques. De plus, le composé multimérique acide 62 en C16 est le seul à avoir été obtenu, ne permettant pas une étude comparative avec les trois longueurs de chaînes utilisées pour les monomères. Ces difficultés nous ont conduits à envisager une autre approche.

IV. Approche alternative pour la synthèse de composés multimériques

Nous avons cherché à améliorer la solubilité des composés dans l'huile en modulant la structure chimique du multimère. Pour cela, notre approche a été d'introduire une chaîne carbonée plus longue au niveau du cœur carboné en espérant ainsi augmenter la liposolubilité. Dans ce but, une chaîne carbonée de quatre carbones portant un azoture, composé 63 a été insérée sur le partenaire nucléolipidique tandis que le pentaerythritol a été propargylé. La thymidine a d'abord été substituée en N3 par un azoture de bromobutane (obtenu à partir du dibromobutane correspondant). La synthèse du dérivé azoture a été réalisée selon le protocole

de Pradère²⁰⁶. La réaction est efficace mais il est à noter que le produit obtenu est volatil et qu'une évaporation à froid du solvant doit être effectuée.

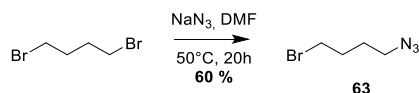


Figure 99 | Azidation du dibromobutane.

La fonctionnalisation de la position *N3* a été réalisée en conditions microondes, similaires aux précédentes réactions de substitution de cette position. La suite de la synthèse est analogue aux synthèses précédentes, soit la protection de la position 5' puis le couplage de Steglich en 3' pour insérer l'acide gras et finalement la déprotection en 5' pour obtenir le partenaire de réaction de chimie click **67**. Dans un premier temps, uniquement les analogues en C20 ont été synthétisés pour que le produit final multimérique puisse être comparable avec le monomère efficace **44**.

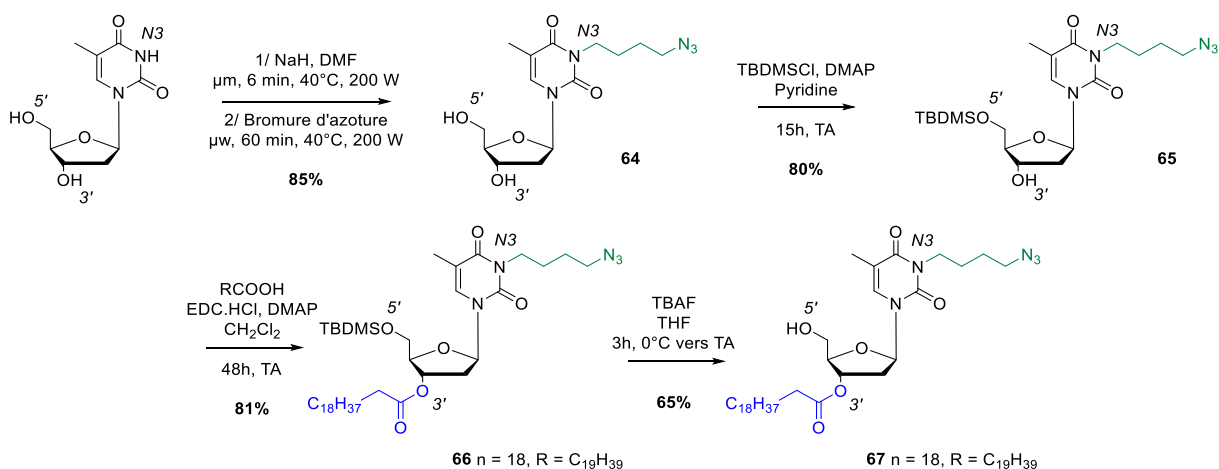


Figure 100 | Voie de synthèse des partenaires nucléolipidiques azidés.

Une fois le composé nucléolipidique obtenu **67**, le partenaire alcyne **68** a pu être synthétisé. Pour cela, les alcools du pentaerythrytol ont été substitués à chaud par des groupements propargyles, selon l'approche de Papp *et al.* (Figure 101)²⁰⁷

²⁰⁶ Pradère, H. Hall, J. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 681-687.

²⁰⁷ Papp, I., Dervedde, J., Enders, S., Haag, R. *Chem. Commun.* **2008**, 5851-5853.

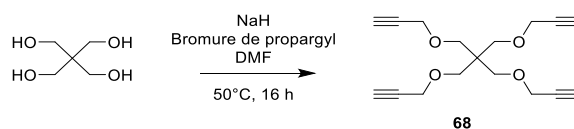


Figure 101 | Propargylation du pentaerythritol.

Les partenaires **67** et **68** en mains, la réaction click de l'azoture avec l'alcyne du pentaerythrile a pu être envisagée. En premier lieu, le composé en C20 a été utilisé (**Figure 102**). Des conditions classiques sur paillasse et par activation aux micro-ondes ont été essayées.

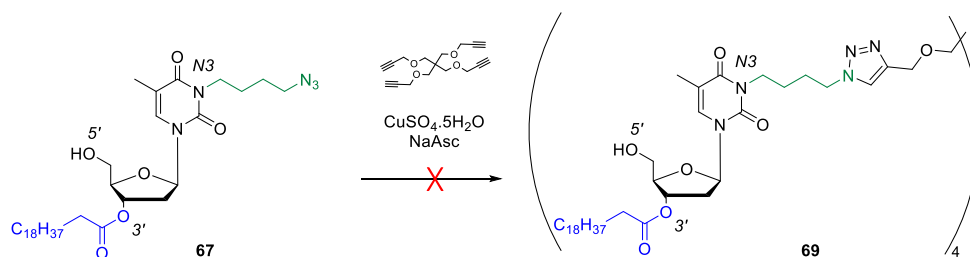


Figure 102 | Approche synthétique pour l'obtention d'un multimère plus flexible.

Tout d'abord les conditions classiques de catalyse au cuivre ayant permis l'obtention du composé **62** ont été essayées. Néanmoins, l'absence totale de conversion et l'apparente mauvaise solubilité des composés dans le co-solvant utilisé a conduit à une modification des conditions de réaction. Tout d'abord, le *t*-BuOH a été remplacé par du DMF, permettant une meilleure solubilité des substrats. Ensuite un essai de réaction assistée par micro-ondes a été réalisé (**Tableau 15**). Cependant les approches se sont avérées infructueuses et aucune conversion n'a été observée, les substrats de départ étant récupérés. Les raisons de cette absence totale de réactivité ne sont pas expliquées. À la suite de ces essais décevants, la réaction de couplage n'a pas été essayée sur les dérivés aux chaînes lipidiques en C12 et C16.

Tableau 15 | Essais de CuAAC entre le coeur propargylé et les nucléolipides azotures.

Entrée	CuSO ₄ .5H ₂ O	NaAsc	Solvant	Température	Durée	Conversion
1	0.4 eq	0.7 eq	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	80°C	48h	-
2	0.4 eq	0.8 eq	DMF/H ₂ O	μw : 80°C	40'	-

Malgré tous nos efforts, aucune condition testée n'a conduit ne serait-ce qu'à un début de conversion et les produits de départ ont systématiquement été récupérés. Au vu des essais, il

nous est apparu que les réactions de chimie click qui n'ont pas été efficaces avaient été réalisées à partir de substrats dont une des fonctions hydroxyles était libre. Il aurait sans doute été pertinent d'essayer cette étape à partir des substrats protégés sous forme d'éthers silylés pour émettre une hypothèse sur les raisons de ces échecs.

V. Synthèse de multimères acides masqués

1. Conception et synthèse

En raison des difficultés de synthèse des composés multimériques précédents et de la mauvaise solubilité du seul composé obtenu, une autre approche a été développée en s'affranchissant de l'étape de chimie click. Une synthèse simple, basée uniquement sur des liens esters a été envisagée, de façon à conduire à des composés dont la partie acide est protégée (**Figure 103**). La voie de synthèse repose sur l'estérification des monomères **42**, **43** et **44** par le cœur de pentaerythritol de façon à générer une seconde fonction ester qui en plus de masquer les fonctions acides, permet d'envisager une libération prolongée de diacide au niveau de la cible biologique. En effet, la protection des acides conduit au cas similaire du PLGA pour lequel les acides lactiques et glycoliques étaient « masqués » et clivés *in vitro* par les estérases pour réacidifier le lysosome.

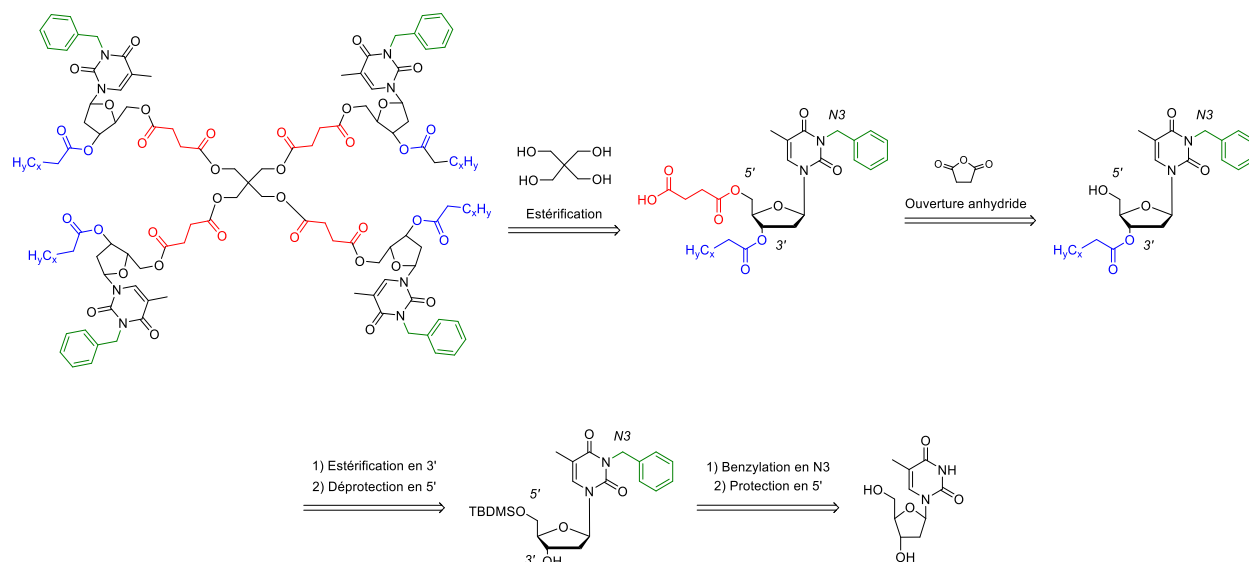


Figure 103 | Schéma de rétrosynthèse des multimères dont les acides sont protégés pour un potentiel effet acidifiant retardé.

La synthèse de ces trois multimères aux chaînes lipidiques en C12, C16 et C20 a été réalisée avec l'aide de Marie Joyeux, dans le cadre de son stage de master 1²⁰⁸. Après obtention des monomères composés **42**, **43** et **44**, les estérifications avec le cœur de pentaerythritol ont été réalisées dans les conditions de couplage de Steglich (**Figure 104**) avec des stœchiométries qui ont dues être optimisées de sorte à favoriser la formation des composés tétramériques et limiter l'obtention des intermédiaires trimériques ou dimériques.

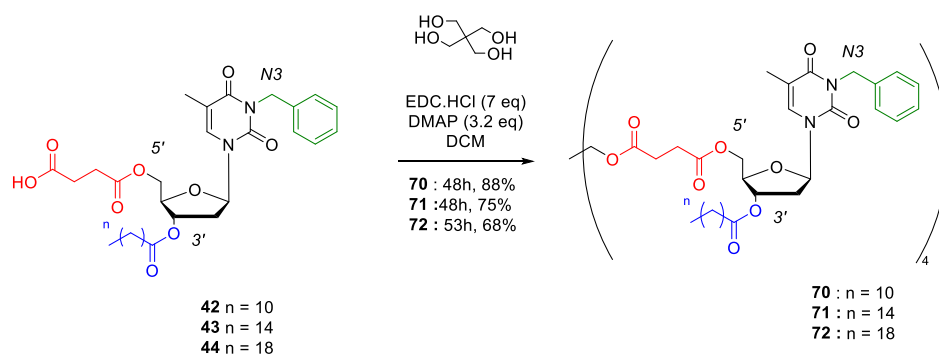


Figure 104 | Réaction finale pour l'obtention des multimères de choix.

Après plusieurs tentatives, 10 équivalents de nucléolipides ont donc été introduits pour 1 équivalent de cœur carboné. Les trois composés cibles ont ainsi été obtenus, à l'issue d'un suivi CCM rigoureux qui a permis d'optimiser les conditions de réactions. Il est à noter que l'estérification du partenaire **44** a nécessité à 48 heures un ajout supplémentaire de carbodiimide (0.5 eq) et de DMAP (0.2 eq) (**Tableau 16**).

Tableau 16 | Nombres d'équivalents utilisés pour l'estérification en fonction de la longueur de chaîne du nucléolipide. 1. correspond au composé 70 (C12), 2. au composé 71 (C16) et 3. au composé 72 (C20).

Entrée	Cœur carboné	Nucléolipide	EDC.HCl	DMAP	Durée
1	1 eq	10 eq	7 eq	3.2 eq	48h
2	1 eq	10 eq	7 eq	3.2 eq	48h
3	1 eq	10 eq	7.5 eq	3.4 eq	53h

Les composés bruts ont été purifiés sans traitement intermédiaire pour éviter tout risque de clivage des liaisons esters. Bien que les conditions aient été favorables à la formation du composé tétramérique, la présence d'intermédiaires de réaction a été visible sur CCM, ce qui a

²⁰⁸ Joyeux, M. Stage de Master 1, Université de Montpellier, 2022.

compliqué les purifications. Les multimères finaux ont été obtenus avec de bons rendements supérieurs à 70%. Les tétramères **70**, **71** et **72** ont été synthétisés en 6 étapes simples à partir de la thymidine et avec des rendements globaux de 24 %, 27% et 27% respectivement. Les trois composés multimères ont été totalement caractérisés par RMN, IR et HRMS.

2. Solubilité et formulation en nanoémulsions

Dans le but d'étudier l'effet de ces molécules sur l'acidification du pH lysosomal et de comparer leur action à celle des monomères correspondants, la concentration de ces composés devait correspondre au même nombre d'unités acides équivalent que le nombre délivré par les monomères. Nous avons considéré notamment le cas optimal du composé **44** (en C20). Les multimères délivrant en théorie quatre unités succiniques, nous souhaitons logiquement tester des formulations contenant quatre fois moins de composé que pour les nanoémulsions des monomères. Le taux d'encapsulation d'origine a été choisi pour correspondre à une concentration molaire quatre fois moindre que celles des composés **43** et **44**.

Les composés **71** et **72** ont donc été solubilisés à 3 % (m/m), soit une concentration de 10 µM dans la phase huileuse de lécithines 80 dispersées dans le Miglyol® 812N. En parallèle la phase aqueuse de polysorbate et de glycérol dans de l'eau milli-Q a été préparée de sorte à obtenir des nanoémulsions dont la composition est rapportée dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 | Compositions des nanoémulsions chargées avec les composés multimériques.

	Nanoémulsion composition (m/m)
Composé	3%
Lipoid® E80	1.2%
Miglyol® 812N	20%
Tween® 80	2.5%
Glycérol	2.25%
H ₂ O <i>qsp</i>	100%

Cette composition similaire à celle utilisée dans les formulations précédentes de ce travail de thèse, a permis la formulation des composés au sein de nanoémulsions dont les caractéristiques physico-chimiques se sont avérées parfaitement satisfaisantes. Les analyses granulométriques (**Tableau 18**) ont montré un diamètre moyen des globules aux alentours de

180 nm. Les mesures ont également mis en évidence une distribution monodisperse dont le potentiel ζ est inférieur à - 30 mV, laissant présager une bonne stabilité dans le temps. Le suivi par DLS a montré pour le moment, un recul de plus d'un mois sans modification substantielle de la granulométrie.

Tableau 18 | Caractéristiques des nanoémulsions chargées en composés multimériques.

	Diamètre (nm)	PdI	Potentiel ζ (mV)	pH
NE 71- 3%	179.3 \pm 3.4	0.099	-30.2 \pm 0.4	4.8
NE 72- 3%	171.9 \pm 1.7	0.112	-33.9 \pm 1.2	5.3
NE contrôle	164.1 \pm 1.3	0.094	-33.6 \pm 0.2	5.9

Le pH de ces nanoémulsions a également été mesuré. Les formulations des multimères ont présenté des pH plus élevés que les nanoémulsions des monomères (**Tableau 19**). Cette variation est particulièrement notable pour les composés en C20. Cette différence prévisible peut s'expliquer par l'absence d'acides libres au sein de la formulation pour les composés multimériques. Les dosages acido-basiques des formulations afin d'étudier la libération des acides n'ont pas pu être réalisés pour le moment.

Tableau 19 | Comparaison du pH des nanoémulsions des nucléolipides monomériques et multimériques chargées à 3% m/m.

	Monomère	Multimère
Composé 71 (C16)	4.2	4.8
Composé 72 (C20)	3.9	5.3

3. Évaluation biologique

3.1. Évaluation de la viabilité cellulaire

Les évaluations de la viabilité cellulaire et donc de la cytotoxicité des composés ainsi que de leur pouvoir acidifiant ont été réalisées par le Dr. Benjamin Dehay, dans les mêmes conditions que pour les essais portants sur les monomères. Les cellules de neuroblastomes humains ont été traitées avec 1 μ L de nanoémulsion dilué à 1/1000. La viabilité cellulaire a été estimée par des essais MTT à 24 et 48 heures sur des cellules saines BE(2)-M17 (shScr-1) et

sur des cellules au pH artificiellement élevé, déplétées du gène ATP13A2 (sh403-1). Les résultats ne montrent aucune cytotoxicité des composés évalués sur le temps d'expérimentation et ce jusqu'à 72 heures après l'exposition des cellules ce qui est remarquable (**Figure 105**). De plus, il est essentiel de relever que le composé multimérique dont la chaîne lipidique est en C16, ne présente aucune toxicité quand le monomère acide analogue **43** chargé à 3% dans sa nanoémulsion était cytotoxique dès 24h. Le multimère nucléolipidique conduit donc à une réelle amélioration de la viabilité cellulaire dans le cas du nucléolipide en C16.

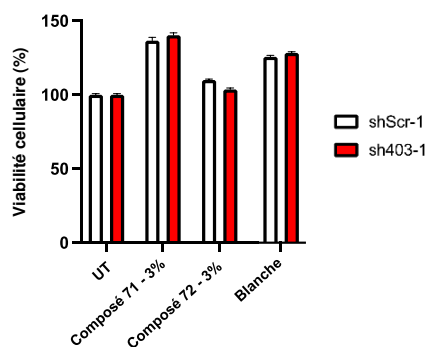


Figure 105 | Viabilité cellulaire des cellules M17 contrôles (shScr-1) et déplétées du gène ATP13A2 (sh403-1), en l'absence (UT) ou en présence des nanoémulsions chargées en multimères 71 et 72 à 3% (m/m) après 24h * p < 0.05 par rapport aux cellules non traitées.

3.2. Evaluation du potentiel acidifiant

Le pH lysosomal des cellules neuronales saines et des cellules pathologiques a été mesuré 24 heures après traitement avec les nanoémulsions contrôle ou chargées en composés **71** et **72**. Les résultats mettent en évidence une acidification statistiquement significative du pH lysosomal des cellules sh403-1 par le composé multimérique dont la chaîne lipidique est en C20. Le multimère en C16 **71** permet également d'acidifier le pH lysosomal quand le monomère acide précurseur **43** ne présentait aucune efficacité. De plus, une restauration totale du pH lysosomal est observée sous l'action du composé multimérique C16 **71** (**Figure 106**), puisque le milieu est passé de pH = 5.3 à pH = 2.8. Le multimère C20 **72**, quant à lui, engendre une acidification plus modeste de 1.6 unité pH. Cette variation de potentiel acidifiant pourrait être attribué à un encombrement du composé qui pourrait rendre difficile l'accès des estérases aux liaisons à cliver. L'acidification est donc potentiellement retardée comparé à l'analogue en C16. Pour compléter l'évaluation de l'acidification lysosomale, la mesure de l'acidification pourrait être réalisée à 48 et 72h, de sorte à étudier une possible libération prolongée des unités acides. Toutefois, à 24h, l'apport des prodrogues nucléolipidiques acides sous forme de

multimères s'est avéré particulièrement performant. L'acidification est aussi efficace qu'avec les monomères mais avec une concentration molaire « thérapeutique » quatre fois moins élevée. Il est d'ailleurs à noter qu'une diminution de pH de 5.0 à 4.5 engendre une activité 3 fois plus importante des protéases cathepsines D²⁰⁹. L'amélioration de l'activité enzymatique est également marquée pour les lipases dont l'activité est multipliée par 2 lorsque le pH lysosomal passe de 5.2 à 4.5²¹⁰. Cette stimulation des activités enzymatiques permet d'initier la restauration de la fonction lysosomal et d'accroître le clivage des nucléolipides par les estérases. De cette façon, un cercle vertueux est engendré permettant de libérer de manière plus efficace et importante les unités acides, qui vont acidifier à leur tour le milieu et accroître l'activité enzymatique. Il est à noter que comme attendu, l'acidification n'est effective que pour les cellules sh403-1, de façon similaire au cas des monomères.

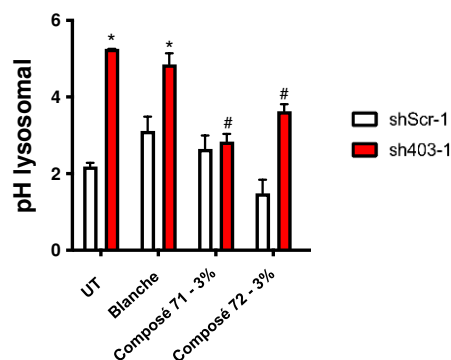


Figure 106 | pH lysosomal mesuré à la suite de l'exposition des cellules par les composés multimériques. Les nanoémulsions acides restaurent le pH lysosomal in vitro. Les valeurs sont mesurées dans des cellules M17 témoins (*shScr-1*) et dépourvues d'*ATP13A2* (*sh403-1*) en l'absence ou en présence des nanoémulsions. *, $p < 0.05$ comparé aux cellules non traitées *shScr-1* ; #, $p < 0.05$ comparé aux cellules non traitées *sh403-1*.

²⁰⁹ Barret, A. *Protinases in mammalian cells and tissues*; Dingle JT, editor. New York:Elsevier/North-Holland Biomedical press, 1977; pp 220-224.

²¹⁰ Ameis, D., Merkel, M. Eckerskon, C., Greten, H. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 219, 905-914.

5. Synthèse des résultats et conclusion

Afin de développer une approche thérapeutique dans le contexte de la maladie de Parkinson, notre approche avait pour but de restaurer la fonction lysosomale en réacidifiant le pH du lysosome anormalement élevé. Pour cela nous avons synthétisé des prodrogues monomériques et multimériques liposolubles pour les encapsuler au sein de nanoémulsions L/H. La nature de la chaîne lipidique des nucléolipides a été modifiée afin de moduler la solubilité et l'efficacité *in vitro* de nos composés.

Nous avons ainsi développé les premiers nanosystèmes acidifiants composés de nucléolipides originaux conçus comme des prodrogues et formulés au sein de nanoémulsion L/H (**Figure 107**). Les expérimentations *in vitro*, ont montré que la nanoémulsion contenant le monomère **44** ($c = 3\%$ (m/m), $c = 40 \mu\text{M}$ en substance active) était internalisé efficacement au sein de cellules neuronales humaines et ce, sans engendrer de cytotoxicité. Il a également été mis en évidence que cette formulation permettait de restaurer intégralement l'acidité du lysosome lors d'évaluations sur un modèle cellulaire génétique de la maladie de Parkinson.

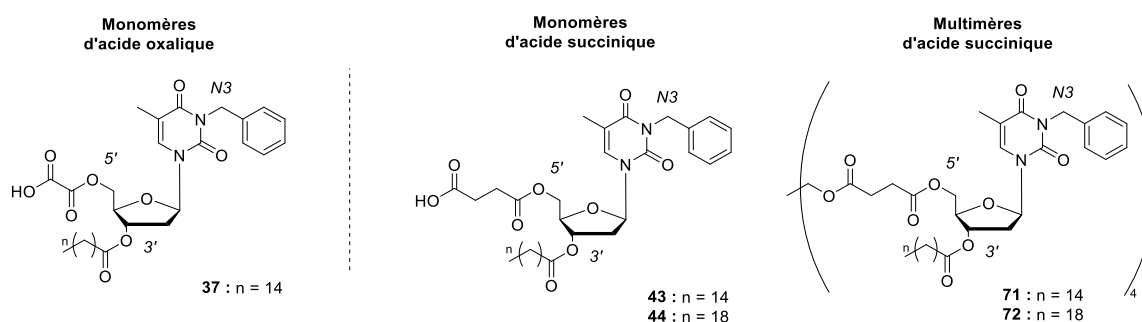


Figure 107 | Composés nucléolipidiques acides évalués *in vitro*.

Dans un second temps, plusieurs voies de synthèse ont été explorées pour conduire à des analogues multimériques. Les composés **70**, **71** et **72** ont ainsi été formulés avec succès au sein de nanoémulsions stables pour être évalués *in vitro*. Aucun objet multimérique n'a présenté de cytotoxicité, et ce jusqu'à 72 heures après le traitement des cellules par les nanoémulsions. Par ailleurs le monomère portant l'acide palmitique en tant que lipide avait engendré une toxicité dès 24 heures. De plus, les multimères chargés à 3% (m/m) ont restauré l'acidité du lysosome. Ces résultats permettent de mettre en évidence une acidification équivalente du multimère en regard du monomère, alors que la concentration en substance active est 4 fois inférieure ($c = 10 \mu\text{M}$).

Tableau 20 | Comparaison des évaluations biologiques des nanoémulsions de PLGA de référence, du nucléolipide C16 acide oxalique à 1% (m/m) et des nucléolipides d'acides succiniques à 3% (m/m).

	PLGA	Acide oxalique	Acide succinique C16		Acide succinique C20	
			Monomère	Multimère	Monomère	Multimère
Cytotoxique	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non
Δ unités pH	- 2.3	- 1.3	-	- 2.4	- 2.5	- 1.6
Molécule n°		37	43	71	44	72

Les analogues en C12 n'ont pour le moment pas pu être évalués *in vitro*. De même, l'évaluation de l'acidification dans le temps pourra être envisagé pour les composés multimériques afin de déterminer si la libération de l'acidité est intégrale en 24 heures ou si un effet prolongé dans le temps est observable.

En résumé, ce chapitre a présenté la synthèse, la formulation en nanoémulsions et l'utilisation *in vitro* de composés originaux de type nucléolipides, bioinspirés, biocompatibles et biodégradables pour l'acidification efficace du lysosome de cellules neuronales altérées.

Chapitre IV

Application de notre approche à la synthèse de nucléoside-peptides à visée anti-Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative pour laquelle les approches thérapeutiques restent aujourd'hui limitées. Tout comme pour la maladie de Parkinson, les causes exactes du développement pathologique ne sont pas complètement élucidées et la barrière hémato-encéphalique est un obstacle majeur pour les approches étudiées. Pourtant, aujourd'hui plus d'un million de personnes sont touchées par cette maladie en France et le coût sociétal que cela engendre nécessite un effort de recherche pour aboutir à un traitement efficace.

Dans cette optique, nous souhaitons développer de nouvelles molécules nucléolipidiques pouvant être formulées au sein de nanoémulsions lipophile dans hydrophile afin d'atteindre le système nerveux central. La substance active ici utilisée est un peptide qui s'est avéré efficace à réduire la toxicité des peptides amyloïdes dans des cellules neuronales primaires mais qui en raison de son insolubilité aqueuse et de sa faible stabilité ne peut pas atteindre le cerveau. Coupler ce peptide d'intérêt avec nos dérivés nucléolipidiques et les encapsuler au sein de nanoémulsions permettrait de concilier les avantages thérapeutiques du peptide avec les bénéfices de transfection des nucléolipides et la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique des nanosystèmes.

1. La maladie d'Alzheimer

I. Définition et description

1. Historique et contexte

La maladie d'Alzheimer constitue un enjeu de santé majeur. L'épidémiologie montre une augmentation continue du nombre de patients et des coûts sociétaux induits. Cette pathologie impacte non seulement la vie des malades, car le développement de la démence les rend dépendants, mais également celle de leur entourage qu'ils soient ou non des « aidants ». *The World Alzheimer Report 2018* évaluait le coût global de la maladie à 1 trillion de dollars par an et l'OMS l'a estimé à 1.3 trillion de dollars en 2019. Ce coût était déjà estimé à 818 milliards de dollars en 2015, ce qui représentait une hausse de 35% depuis la précédente estimation de 2010. La recherche sur la maladie d'Alzheimer est un réel enjeu sociétal dont l'objectif est de mieux cerner les causes de la maladie et de développer des thérapies pour lutter contre cette maladie, qui, rappelons-le, n'est toujours pas curable à ce jour.

Aloïs Alzheimer, neuropsychiatre, a décrit pour la première fois, en 1907, la maladie neurodégénérative qui portera ensuite son nom²¹¹. À la suite du décès d'une femme présentant des problèmes de mémoire, de langage et de comportement, l'analyse du tissu cérébral a montré des agglomérats anormaux. Aujourd'hui connus sous le nom de plaques amyloïdes et de dégénérescence neurofibrillaires, ces deux lésions représentent les marqueurs caractéristiques du cortex cérébral dans la maladie d'Alzheimer²¹². Tout comme la maladie de Parkinson, il s'agit d'une maladie liée à l'âge, chronique, évolutive et incurable. Sa fréquence est plus importante avec le vieillissement de la population. Ainsi, 2 à 4% des personnes de 65 ans sont touchés par la maladie d'Alzheimer, alors qu'ils représentent 15% de la population à 80 ans. Il est ainsi estimé qu'environ 1 million de patients sont atteints par cette maladie, ce qui en fait la principale cause de démence chez les personnes âgées (estimé à 70% des cas de démence).

Les causes du déclenchement et du développement de cette maladie ne sont pas établies avec certitude, bien que divers facteurs semblent être corrélés à un risque accru de développer la maladie²¹³. Les femmes sont notamment plus touchées que les hommes²¹⁴ (après 65 ans, deux

²¹¹ Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., Murtagh, F.R. *Clin Anat.* **1995**, 8, 6, 429-31.

²¹² Selkoe, D. J., Schenk, D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, 43, 545-584.

²¹³ Armstrong, R. A. *Folia Neuropathol.* **2019**, 57, 2, 87-105.

²¹⁴ Henderson, AS. *Acta. Psychiatr. Scand.* **1988**, 78, 257-275.

fois plus de femmes que d'hommes). L'âge, la génétique et les antécédents familiaux de démence, les risques psychosociaux tels la dépression²¹⁵, ainsi que l'environnement constituent des facteurs semblant favoriser la maladie. Les facteurs environnementaux semblent particulièrement importants tout comme la sédentarité, les traumatismes crâniens, les anesthésies répétées et les maladies cardiovasculaires : hypertension artérielle²¹⁶, diabète de type 2²¹⁷, obésité²¹⁸, qui sont considérés comme des facteurs favorisant la maladie d'Alzheimer. Au contraire, plusieurs facteurs semblent avoir un effet protecteur, retarder le développement de la maladie et en diminuer la sévérité : avoir une vie sociale active²¹⁹, une activité professionnelle stimulante, avoir une activité physique régulière²²⁰, ou encore suivre un régime alimentaire Méditerranéen²²¹ aideraient selon diverses études scientifiques.

La maladie d'Alzheimer est majoritairement sporadique. Moins de 2% des cas sont d'origine héréditaire et présentent un développement précoce, c'est-à-dire avant 65 ans. Ces formes familiales impliquent la transmission de mutations génétiques²²² pour lesquelles trois gènes ont à ce jour été identifiés. Les mutations conduisent à une augmentation de la production d'une protéine : la protéine A β . Il en résulte une accumulation plaquettaire protéique, ce qui est une des lésions caractéristiques de la maladie. La deuxième caractéristique retrouvée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer est un mauvais repliement de la protéine tau, conduisant à la neurodégénérescence fibrillaire.

Lorsque la maladie évolue, une multitude de modifications s'opère au niveau cérébral. Sous-jacentes à la maladie, ces modifications peuvent débuter 10 ans avant l'apparition des symptômes. Il en résulte la perte de connexions neuronales, une dystrophie neuronale et à terme la mort cellulaire²²³. Celle-ci mène à une atrophie cérébrale, ainsi qu'à la dilatation des

²¹⁵ Li, G., Wang, L. Y., Shofer, J. B., Thompson, M. L., Peskind, E. R., McCormick, W., Bowen, J. D., Crane, P. K., Larson, E. B. *Arch. Gen. Psychiatry*. **2011**, 68, 9, 970-977.

²¹⁶ Posner, H. B., Tang, M-X., Lantigua, R., Stern, Y., Mayeux, R. *Neurology*. **2002**, 58, 8, 1175-1181.

²¹⁷ Biessels, G. J., Staekenberg, S., Brunner, E., Brayne, C., Scheltens, P. *Lancet Neurol*. **2006**, 5, 64-74.

²¹⁸ Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E-L., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A. *Arch. Neurol*. **2005**, 62, 1556-1560.

²¹⁹ Verghese, J., Lipton, R. B., Katz, M. J., Hall, C. B., Derby, C. A., Kuslansky, G., Ambrose, A. F., Sliwinski, M., Buschke, H. *N. Engl. J. Med*. **2003**, 348, 2508-2516.

²²⁰ Kirk-Sanchez, N. J., McGough, E. L. *Clin. Interv. Aging*. **2014**, 9, 51-62.

²²¹ Gu, Y., Nieves, J. W., Stern, Y., Luchsinger, J. A., Scaermeas, N. *Arch Neurol*. **2010**, 67, 6, 699-706.

²²² Cacace, R., Slegers, K., Van Broeckhoven, C. *Alzheimers Dement*. **2016**, 12, 733-748.

²²³ Jakob-Roetne, R., Jacobsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, 48, 3030-3059.

ventricules cérébraux et à l'élargissement des sillons corticaux^{224,225}. Par conséquent, la densité cérébrale du cortex et de l'hippocampe diminue plus rapidement et plus intensément que chez une personne non atteinte²²⁶ (**Figure 108**).

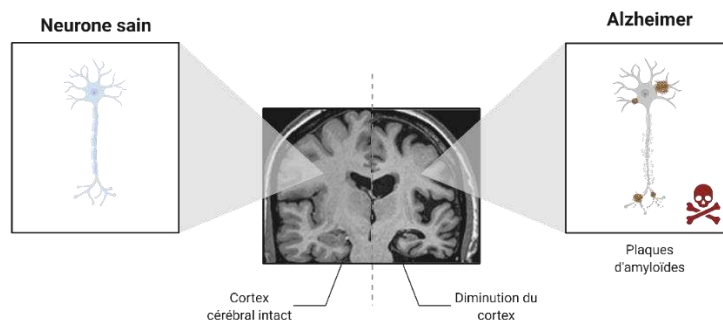


Figure 108 | Mise en évidence de la neurodégénérescence chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Adapté de Wang et al.²²⁶

2. Symptômes de la maladie d'Alzheimer

La perte progressive et irréversible des connexions neuronales, suivie de la mort cellulaire neuronale, engendre inévitablement l'apparition de symptômes à plus ou moins long terme. Leur apparition est corrélée aux voies de propagation et au degré de perte des fonctions neuronales²²⁷. La progression se fait de l'hippocampe vers le système limbique et le cortex (**Figure 109**). L'atteinte de chaque zone engendre des symptômes spécifiques qui sont liés aux rôles physiologiques de ces aires :

- **Atteinte du processus de mémorisation** : L'atteinte neuronale débute généralement au niveau de l'hippocampe, qui est impliqué dans le processus de mémorisation. Cela va donc se caractériser par des difficultés croissantes dans l'enregistrement, la restitution et l'organisation des souvenirs du patient.

²²⁴ Bobinski, M., de Leon, M. J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L. A., Rusinek, H., Wisniewski, H. M. *Neuroscience*. **2000**, 95, 3, 721-725.

²²⁵ Whitwell, J. L., Dickson, D. W., Murray, M. E., Weigand, S. D., Tosakulwong, N., Senjam, M. L., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Jack Jr, C. R., Josephs, K. A. *Lancet Neurol*. **2012**, 11, 10, 868-877.

²²⁶ Wang, X., Michaelis, M. L., Michaelis E. K. *Curr. Genom*. **2010**, 11, 618-633.

²²⁷ Braak, H., Braak, E. *Acta. Neuropathol*. **1991**, 82, 239-259.

- **Troubles émotionnels et comportementaux** : Le développement de la maladie se poursuit au niveau du système limbique. Cette zone est majoritairement impliquée dans la maîtrise des émotions. Ce système régule également le sommeil et l'appétit.
- **Atteinte des fonctions cognitives** : Lorsque le cortex est atteint, divers autres symptômes apparaissent. La difficulté d'orientation dans le temps et l'espace en est la principale. Les lésions du cortex pariétal engendrent une diminution graduelle de la maîtrise de l'espace et du contrôle gestuel ; celles de la zone temporale du cortex conduisent à une atteinte du langage et de la mémoire ; les lésions de la zone frontale du cortex agissent sur les fonctions exécutives.

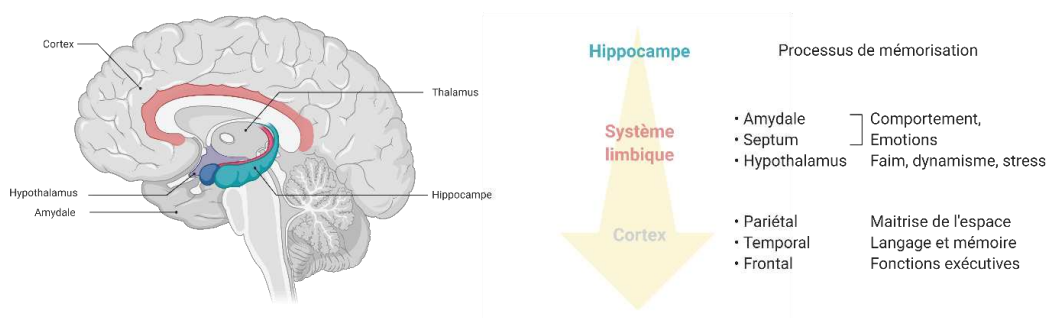


Figure 109 | Progression de la neurodégénérescence et conséquences sur les fonctions neuronales associées.

La progression de la maladie et des symptômes n'est cependant pas commune à tous. Le schéma évolutif présenté n'est donc ni une fatalité, ni une prédiction des fonctions neuronales qui seront atteintes ultérieurement.

II. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

1. Mécanismes pathogéniques : l'hypothèse amyloïde

Tout comme pour le développement de la maladie de Parkinson, l'évolution de la maladie d'Alzheimer présente divers mécanismes pathogéniques, pouvant devenir autant de cibles thérapeutiques en recherche. Majoritairement, on retrouve deux lésions caractéristiques de la maladie au sein du SNC : des dépôts amyloïdes extracellulaires – aussi appelés plaques

amyloïdes – et des dégénérescences neurofibrillaires, au sein des neurones²²⁸. La première lésion résulte de l'agrégation des peptides A β , et la seconde est une conséquence du mauvais repliement et de l'enchevêtrement de la protéine tau.

Depuis les années 90, la cause de la maladie d'Alzheimer repose sur une hypothèse massivement partagée et fondée à partir du modèle des formes familiales de la maladie. Proposée par Hardy et Higgins, elle repose sur le rôle central des peptides A β dans le déclenchement et le développement de la maladie^{229,230} (**Figure 110**). La cascade d'évènements initiée par les peptides A β conduirait également à la dérégulation de la protéine tau et à son agrégation neurotoxique au sein des neurones et au développement de ce qui est communément appelé la pathologie tau. Il s'agit de l'hypothèse la plus largement adoptée, bien qu'elle présente des limites. En effet, les lésions dues à la protéine tau, sont également retrouvées dans d'autres pathologies (tauopathies), et ce, sans que les peptides A β ne soit impliqués.

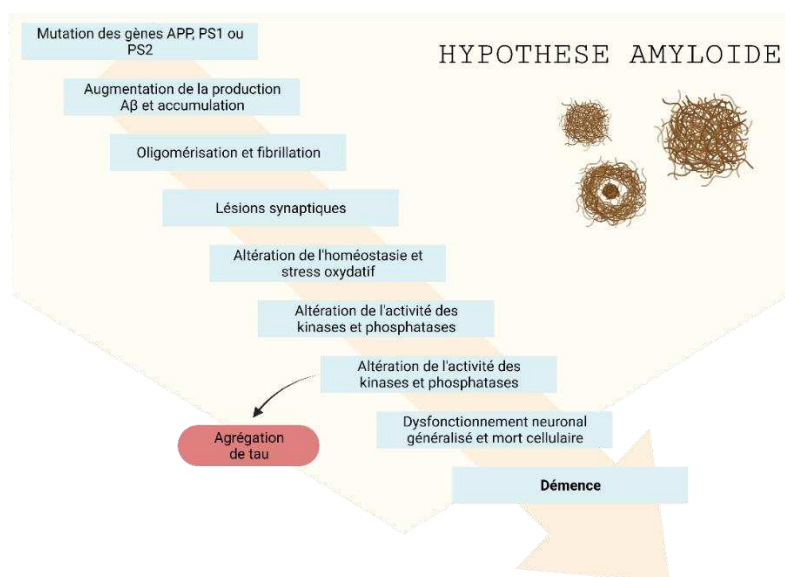


Figure 110 | Cascade amyloïde, hypothèse principale du développement de la maladie d'Alzheimer.

²²⁸ Blennow, K., de Leon, M. J., Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet*. **2006**, 368, 387-403.

²²⁹ Hardy, J. A., Higgins, G. A. *Science*. **1992**, 256, 184-185.

²³⁰ Hardy, J., Selkoe, D. J. *Science*. **2002**, 297, 353-356.

2. Les peptides A β

Les peptides A β sont issus de la protéolyse de la protéine transmembranaire *Amyloid Precursor Protein* (APP). Ces protéines retrouvées au niveau des membranes de cellules neuronales et non neuronales (cœur, poumons, foie...) ²³¹, jouent un rôle particulièrement important dans le bon fonctionnement du système nerveux central. Bien qu'impliquées dans la neurotoxicité dans la maladie d'Alzheimer, physiologiquement elles ont une fonction neuroprotectrice ²³² et sont un facteur de croissance des cellules neuronales ²³³.

Sous l'action de sécrétases, la protéine APP peut être clivée selon deux voies (**Figure 111**) ²³⁴ : une voie non-amyloïdogénique et une voie amyloïdogénique. À la suite du clivage par l' α -sécrétase, au niveau extracellulaire, la première voie permet la libération du fragment soluble, sAPP α (*soluble α -amyloid protein*) et du peptide p3, après l'effet d'une γ -sécrétase. Présent en moindre mesure chez les patients atteints d'Alzheimer, par rapport aux contrôles ²³⁵, le fragment sAPP α conduit à des effets bénéfiques pour la mémoire, la neuroprotection, mais sert également à contrer les effets de A β ₄₂ ^{236,237}. La seconde voie de clivage de l'APP implique l'action d'une β -sécrétase et conduit à la libération du fragment soluble sAPP β . À la suite du clivage par une γ -sécrétase, cette voie conduit à la formation de peptides A β . L'APP peut donc libérer d'une part un peptide soluble, sAPP α ou sAPP β , à la suite d'une coupure enzymatique et d'autre part les peptides A β et p3, résultant d'une seconde coupure.

²³¹ Selkoe, D. J. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1994**, 10, 373-403.

²³² Gralle, M., Gralle Botelho, M., Wouters, F. S. *Int. J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 22, 15016-15025.

²³³ Conti, L., Cattaneo, E. *Trends Neurosci.* **2005**, 28, 2, 57-59.

²³⁴ Coronel, R., Palmer, C., Bernabeu-Zornoza, A., Monteagudo, M., Rosca, A., Zambrano, A., Liste, I. *Neural Regen. Res.* **2019**, 14, 10, 1661-1671.

²³⁵ Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L-O., Winblad, B., Benedikz, E. *Neurosci. Lett.* **2000**, 278, 169-172.

²³⁶ Bell, K. F.S., Zheng, L., Fahrenholz, F., Cuello, A. C. *NeuroBiol. Aging.* **2008**, 29, 554-565.

²³⁷ Hartl, D., Klatt, S., Roch, M., Konthur, Z., Klose, J., Willnow, T. E., Rohe, M. *PLoS One.* **2013**, 8, 6.

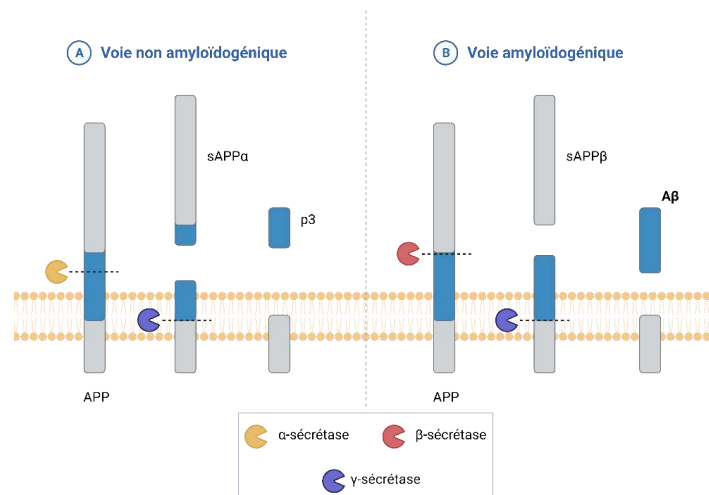


Figure 111 | Protéolyse de l'APP par la voie non amyloïde et amyloïde. Adapté de Coronel et al.²³⁴

Les peptides A β sont constitués de 39 à 43 acides aminés. Si la séquence A β ₄₀ est majoritairement retrouvée (90%), c'est le fragment A β ₄₂ (10%) qui est le plus massivement impliqué dans les plaques amyloïdes, dû à son caractère particulièrement amylogène²³⁸. A β ₄₀, sous forme de monomère joue un rôle neuroprotecteur, en contrastant la neurotoxicité induite par A β ₄₂²³⁹. Cependant, lorsqu'il est retrouvé à des niveaux trop importants, il est susceptible de conduire à la formation d'oligomères, puis de fibres. Il devient dès lors toxique, bien qu'à moindre niveau qu'A β ₄₂. Physiologiquement, un équilibre existe, permettant de conserver les effets bénéfiques de ces peptides, en s'épargnant leur effet délétère. Néanmoins, sous l'effet de mutations portant sur le gène APP, une augmentation de la production du fragment à 42 acides aminés est observée, au détriment du fragment qui en comporte 40²⁴⁰. De ce fait, le ratio A β ₄₂ : A β ₄₀ augmente, devenant dès lors un facteur important dans le développement de la maladie²⁴¹.

Physiologiquement, les deux voies de clivage de l'APP coexistent. Une balance entre la production et la dégradation continue du peptide A β ₄₂ permet de conserver sa concentration à un seuil non pathologique. Cette dégradation du peptide est reliée à l'implication de nombreuses enzymes, clivant le peptide à de multiples positions²⁴². De plus, la concentration d'A β au sein

²³⁸ Glenner, G. G., Wong, C. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120, 3, 885-890.

²³⁹ Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J-S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S., Matsuzaki, K., Lee, B., Yanagisawa, K., Michikawa, K. *J. Neurochem.* **2003**, 87, 609-619.

²⁴⁰ Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X-D., Odaka, A., Otvos Jr. L., Eckman, C., Golde, T. E., Younkin, S. G. *Science.* **1994**, 264, 1336-1340.

²⁴¹ Johnson, R. D., Schauerte, J. A., Chang, C-C., Wissner, K. C., Althaus, J. C., Carruthers, C. J. L., Sutton, M. A., Steel, D. G., Gafni, A. *Biophys. J.* **2013**, 104, 894-903.

²⁴² Ries, M., Sastre, M. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, 8, 160.

du SNC est régulée par des échanges au travers de la BHE²⁴³. Des récepteurs permettent de conserver un flux vers le système sanguin ou bien vers le SNC. Au cours de l'évolution de la maladie, tous ces paramètres sont déséquilibrés : l'expression des enzymes diminue fortement, certains récepteurs permettant un flux vers le système sanguin voient également leur expression diminuer avec l'âge (chez la souris)²⁴⁴.

Cette dérégulation toxique semble cependant être un état transitoire, déclenchant une cascade d'effets dont la combinaison induirait la mort cellulaire²⁴⁵. L'absence de corrélation entre la sévérité des troubles cognitifs induits et la quantité de plaques amyloïdes recensée *post mortem*, abonde dans ce sens. La toxicité des oligomères de peptides A β conduit donc à une altération des processus cellulaires, qui conduit alors aux troubles cognitifs^{246,247}. En synergie avec la défaillance de la protéine tau, les peptides A β mènent à la mort cellulaire *via* les dysfonctionnements consécutifs engendrés.

3. Vers une remise en cause de la théorie amyloïde ?

La théorie de la cascade amyloïde et de son rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer est une piste largement explorée au cours des dernières décennies.

En août 2021, le neurologue Matthew Schrag a mis en cause plusieurs études provoquant un immense emballement médiatique. Il est notamment question de résultats falsifiés dans des travaux majeurs publiés en 2006 dans la *Nature* par Sylvain Lesné. L'étude rapportait la découverte d'un oligomère de bêta-amyloïde toxique : A β *56 formé de l'agrégation de peptides amyloïdes et nommé ainsi en raison de sa masse moléculaire de 56 kDa. Selon Sylvain Lesné et ses collaborateurs, son accumulation serait responsable du déclin cognitif, suite notamment à l'observation de troubles de la mémoire après injection de A β *56 chez des rats. Une enquête menée par *Science*, et révélée en juillet 2022, conteste les résultats, par ailleurs non reproduits depuis, de cette publication et de plusieurs autres. Les auteurs sont soupçonnés d'avoir manipulé de nombreuses images de Western-Blot, ce qui remet en cause les conclusions de ces études.

²⁴³ Wang, Y-J., Zhou, H-D., Zhou, X-F. *Drug Discov. Today*. **2006**, 11, 19-20, 931-938.

²⁴⁴ Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., Ghiso, J., Zlokovic, B. V. *J. Clin. Invest.* **2000**, 106, 12, 1489-1499.

²⁴⁵ Ittner, L. M., Götz, J. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, 12, 67-72.

²⁴⁶ Hartley, D. M.; Walsh, D. M.; Ye, C. P.; Diehl, T.; Vasquez, S.; Vassilev, P. M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. *J. Neurosci.* **1999**, 19, 20, 8876-8884.

²⁴⁷ Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B. *Nat. Neurosci.* **2012**, 15, 3, 349-357.

Ces doutes ont été relevés dans le contexte d'une autre investigation portant sur les résultats du Simufilam, une molécule en cours d'essais cliniques et développée par le laboratoire *Cassava Sciences*, qui aurait pour effet de stabiliser les protéines A β et ainsi exercer une activité contre Alzheimer. Dans ce cas, les résultats découlent des seules études du laboratoire en question et plusieurs rapports font état de possibles fraudes quant aux résultats, ce qui a conduit à une demande d'enquête auprès de la FDA.

En 2021, un médicament avait déjà été mis sur le marché aux Etats-Unis malgré l'opposition d'une partie de la communauté scientifique et du comité scientifique de la FDA. L'aducanumab est un anticorps monoclonal anti-amyloïde dont l'effet est de combattre les peptides amyloïdes afin de réduire les effets de la maladie d'Alzheimer, sans pour autant la guérir. Néanmoins les résultats cliniques de l'aducanumab n'ont jusque-là pas permis d'apporter la preuve de son efficacité.

Ces différentes révélations ne remettent pour autant pas en cause l'intégralité de l'hypothèse amyloïde ni même la toxicité des oligomères d'A β dont plusieurs autres ont été identifiés. Par ailleurs, compte tenu de la complexité des mécanismes biologiques mis en jeu dans cette maladie, de nombreuses autres pistes sont explorées en parallèle.

4. La protéine tau

Parallèlement à l'hypothèse amyloïde, une seconde hypothèse a émergé plus récemment et postule que la protéine tau tiendrait le rôle majeur dans la neurodégénérescence²⁴⁸. La protéine tau est une protéine associée aux microtubules²⁴⁹ principalement retrouvée au niveau des axones neuronaux. Les microtubules sont des fibres faisant partie des composantes du cytosquelette. Elles sont constituées par les protéines de tubuline organisées en tiges creuses rigides. Les microtubules sont impliqués dans la morphologie cellulaire, la division cellulaire et dans le transport intracellulaire d'organites. Afin d'assurer la fonction neuronale, et le transport axonal, une stabilisation des assemblages est nécessaire et elle est majoritairement assurée par la protéine tau²⁵⁰. La protéine tau présente 85 sites de phosphorylation. Lorsque la protéine est faiblement ou non phosphorylée, elle promeut l'assemblage des tubulines en microtubules. La protéine tau est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives et joue un rôle central

²⁴⁸ Kametani, F., Hasegawa, M. *Front. Neurosci.* **2018**, 12, 25.

²⁴⁹ Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E-M., Mandelkow, E. *Biochemistry.* **1994**, 33, 9511-9522.

²⁵⁰ Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S., Gong, C-X. *Int. J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 3, 1790-1796.

dans la maladie d'Alzheimer²⁵¹. Dans cette maladie, la protéine perd sa capacité à se fixer aux microtubules. En effet, les résidus peptidiques sont hyperphosphorylés, se délient des microtubules induisant la dissociation du complexe et la désagrégation des microtubules²⁵² (**Figure 112**). Il en résulte une agrégation de la protéine en structures fibrillaires, appelées neurofilaments, au sein même des neurones²⁵³. Dans la maladie d'Alzheimer, l'origine de l'hyperphosphorylation de la protéine n'est pas expliquée pour le moment.

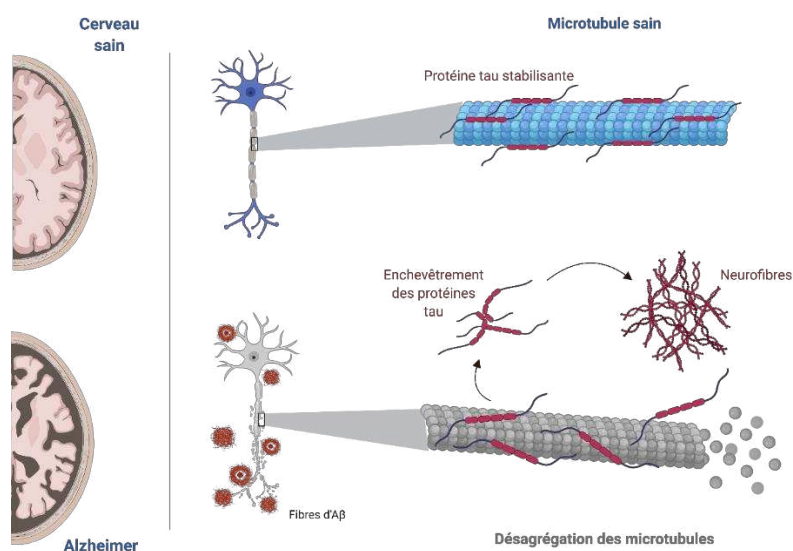


Figure 112 | Implication de la protéine tau dans le processus physiologique et dysfonction pathologique. Adapté de Brunden et al.²⁵⁴

L'hypothèse centrée sur tau postule que des mutations induiraient son hyperphosphorylation et ainsi son agrégation, mais ceci conduirait également à l'altération de l'intégrité mitochondriale et de la fonction synaptique. En effet, dans le processus pathologique, tau induit une altération de la stabilisation de l'actine, c'est-à-dire des fibres protéiques chargées de l'endocytose et de l'exocytose synaptique.

²⁵¹ Gao, Y-L., Wang, N., Sun, F-R., Cao, X-P., Zhag, W., Yu, J-T. *Ann. Transl. Med.* **2018**, 6, 10, 175.

²⁵² Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P. R. *Brain Res. Rev.* **2000**, 33, 95-130.

²⁵³ Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., Ripova, D. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2012**, 2012.

²⁵⁴ Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M-Y. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 783-793.

5. Neuro-inflammation

Une troisième particularité majeure associée aux caractéristiques historiquement connues que sont les processus pathologiques d'A β et de tau, a également été mise en évidence²⁵⁵. Il est aujourd'hui reconnu qu'une réaction inflammatoire locale est associée aux agrégations protéiques²⁵⁶. Le SNC a été longtemps considéré comme protégé des réactions immunitaires. Aujourd'hui, il ne fait plus de doute que les phénomènes inflammatoires ne s'arrêtent pas à la limite de la BHE et touchent également le système nerveux central. Le processus se déclenche lorsque des récepteurs solubles, membranaires ou cytosolaires, appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR – *Patern Recognition Receptor*), détectent une anomalie pathogénique²⁵⁷. La stimulation des PRR induit alors une cascade de signalisation conduisant à l'activation des mécanismes de défense.

Bien que cette neuro-inflammation soit considérée comme caractéristique du développement de la maladie, son implication n'est pas bien définie à ce jour et pourrait être un élément central des recherches futures portant sur le développement de la maladie²⁵⁸. Récemment, une avancée notable a tout de même été rapportée. L'étude, centrée sur le suivi de l'inflammation, a mis en évidence son apparition en amont du développement de la maladie et son rôle protecteur²⁵⁹. En effet, il semblerait que cette inflammation cérébrale puisse avoir un effet positif si elle se développe avant l'apparition des premiers signes de la maladie. Par ailleurs il n'est pas exclu qu'elle devienne néfaste et toxique au cours de l'évolution pathologique. Il s'agit en fait de l'hypothèse la plus partagée : le préjudice de l'inflammation apparaîtrait à plus long terme, lorsque la réponse devient chronique. Impliqués dans les processus inflammatoires au niveau du SNC, les microglies relarguent alors divers produits pro-inflammatoires et toxiques (radicaux libres, cytokines, monoxyde d'azote...) ²⁶⁰. Par ailleurs, une diminution de cette inflammation semble se produire lorsque les premiers symptômes de la maladie apparaissent²⁶¹.

²⁵⁵ Duyckaerts, C., Delatour, B., Potier, M-C. *Acta. Neuropathol.* **2009**, 118, 1, 5-36.

²⁵⁶ Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., Lamb, B.T. *Alzheimers Dement.: Transl. Res. Clin. Interv.* **2018**, 575-590.

²⁵⁷ Renaud, J., Thérien, H-M, Plouffe, M., Martinoli, M-G. *Med. Sci.* **2015**, 11, 31, 979-988.

²⁵⁸ Heneka, M. T., et al. *Lancet Neurol.* **2015**, 14, 4, 388-405.

²⁵⁹ Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., de Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M.C., Bottlaender, M., Sarazin, M. *Brain.* **2016**, 139, 1252-1264.

²⁶⁰ Kim, Y. S., Joh, T. H. *Exp. Mol. Med.* **2006**, 38, 4, 333-347.

²⁶¹ Ismail, R., Parbo, P., Madsen, L. S., Hansen, A. K., Hansen, K. V., Schaldemose, J. L., Kjeldsen, P. L., Stokholm, M. G., Gottrup, H., Eskildsen, S. F., Brooks, D. J. *J. Neuroinflammation.* **2020**, 17, 151.

6. Dysfonctionnements associés

Tout comme pour la maladie de Parkinson, le développement de la maladie d'Alzheimer est très complexe et implique le dérèglement d'une multitude de processus physiologiques neuronaux. La protéine tau et les peptides A β agrégés ont notamment un effet néfaste sur le bon fonctionnement mitochondrial²⁶², la fonction autophagique et lysosomale²⁶³ et participent également à l'accroissement du stress oxydant²⁶⁴. L'altération de la fonction mitochondriale affecte notamment la production d'ATP, l'homéostasie calcique, essentielle à la fonction cellulaire ou encore la production des ROS. L'inhibition de la fonction autophagique et lysosomale stoppe le processus de recyclage cellulaire des organites et des protéines menant à leur accumulation et à terme à une toxicité neuronale. L'accroissement du stress oxydant, donc des radicaux libres impacte directement les structures et fonctions neuronales.

III. Approches thérapeutiques actuelles

À ce jour, l'approche thérapeutique, demeure limitée. Les mécanismes sous-jacents au développement de la maladie n'étant pas parfaitement connus, seuls des traitements limitant la dégradation ou stabilisant l'état général du patient sont utilisés. Commercialisées depuis les années 90, les chimiothérapies sont aujourd'hui controversées du fait de leur bénéfice non significatif²⁶⁵ d'un point de vue clinique. Les molécules administrées ont pour rôle d'augmenter la disponibilité de l'acétylcholine au niveau cérébral, ou de bloquer un récepteur au glutamate. L'acétylcholine est un neurotransmetteur permettant de faciliter la communication neuronale. L'inhibition de l'acétylcholine estérase, l'enzyme dégradant l'acétylcholine, permet d'améliorer sa disponibilité. Bloquer le récepteur au glutamate, permet de réduire sa disponibilité neuronale. En effet, ce neurotransmetteur excitateur est délétère pour les cellules neuronales lorsqu'il est en excès, conduisant à la mort cellulaire. En inhibant ses récepteurs, il est possible de réguler le taux de glutamate. Cependant, les résultats révèlent un manque d'efficacité de ces différents traitements²⁶⁶.

²⁶² Bell, S. M., Barnes, K., De Marco, M., Shaw, P. J., Ferraiuolo, L., Blackburn, D. J., Venneri, A., Mortiboys, H. *Biomedicines*. **2021**, 9, 63.

²⁶³ Orr, M. E., Oddo, S. *Alzheimer's Res. Ther.* **2013**, 5, 53.

²⁶⁴ Huang, W-J., Zhang, X., Chen, W-W. *Biomed. Rep.* **2016**, 4, 519-522.

²⁶⁵ Marucci, G., Buccioni, M., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Volpini, R., Amenta, F. *Neuropharmacology*. **2021**, 190.

²⁶⁶ Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., Wu, Y. *Front. Neurosci.* **2019**, 13, 43.

Face à l'augmentation continue du nombre de malades atteints par la maladie d'Alzheimer et en prévision d'un fort accroissement dans un avenir proche, la recherche de traitements s'accélère. Il est à noter une augmentation des essais cliniques. À ce jour, 234 essais cliniques portant sur la maladie d'Alzheimer sont en cours, en recrutement ou bientôt en phase de recrutement (source Clinicaltrials.gov). Les essais cliniques présentés sur ClinicalTrials.gov ne sont pas exhaustifs mais il est tout de même possible d'en tirer une tendance de l'évolution de la recherche.

Sur les 234 essais cliniques référencés, plusieurs choses sont à noter. Tout d'abord, il est à noter un nombre d'essais cliniques majoritairement en phase 2 (52% des essais), les essais cliniques de phase 1 n'étant pas tous répertoriés sur ce site. Toutefois, la représentation des essais cliniques de phase 3 est particulièrement faible comparé aux essais cliniques de phase 2 (21% des essais). De nombreux candidats-médicaments révèlent leurs limites au cours des études, et n'arrivent pas jusqu'au stade final des essais. Cela peut être dû à l'apparition d'effets secondaires trop importants, une efficacité clinique non significative comparée à un placebo. Ces nombres reflètent donc les nombreux échecs.

Les mécanismes dysfonctionnels présents dans la maladie d'Alzheimer sont variés, les traitements en cours d'essais le sont donc également²⁶⁷. Ils visent les symptômes de la démence, les troubles cognitifs, ou bien sont des thérapies à visée neuroprotectrice, anti-amyloïde, anti-tau ou anti-inflammatoire. En dépit de la variété des approches thérapeutiques, un grand nombre de molécules échoue en raison de leur incapacité à atteindre le système nerveux central.

²⁶⁷ Huang, L-K., Chao, S-P., Hu, C-J. *J. Biomed. Sci.* **2020**, 27, 18.

2. La maladie d'Alzheimer et le peptide KLVFFA

La coupure protéolytique de la protéine transmembranaire APP conduit à l'obtention des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les mutations génétiques conduisent à une augmentation du ratio de l'A β ₄₂ engendrant un accroissement du processus de formation des fibres amyloïdes. Des stratégies ont ainsi été développées pour inhiber la formation des fibres.

I. Molécules organiques inhibitrices de la formation des fibres A β

La recherche sur l'inhibition de la fibrillation amyloïde pathologique est majoritairement centrée sur le développement de petites molécules organiques, majoritairement des hétérocycles aromatiques. De nombreux exemples sont mentionnés dans la littérature, parmi lesquels sont retrouvés entre autres des dérivés de colorants, des polyphénols, des hétérocycles aromatiques^{268,269,270}. La majorité de ces composés interfère avec le peptide pathologique *via* leur partie aromatique. La formation d'interactions hydrophobes avec les résidus hydrophobes et aromatiques nécessaires à la fibrillation du peptide est à l'origine de leur action. Cependant leur efficacité est particulièrement compliquée à estimer. Par exemple, il a été rapporté que le rouge Congo est capable d'inhiber la fibrillation (avec un IC₅₀ = 0.9 μ M), tout en réduisant la neurotoxicité induite par les peptides A β pathologiques²⁷¹. Néanmoins, d'autres études plus récentes ont conclu à sa potentielle toxicité, son incapacité à franchir la BHE mais également à son incapacité en réalité à inhiber la formation de fibres d'A β ²⁷². Cette contradiction résulte de la méthode utilisée pour l'évaluation de l'efficacité *in vitro*. La détection de l'agrégation du peptide A β *in vitro* est en effet indirecte et est mesurée par une sonde fluorescente, la thioflavine T (ThT), incubée en présence du peptide. Celle-ci voit sa fluorescence impactée quand elle se fixe à des feuilletts β , structures secondaires caractéristiques des fibres. L'inhibition de l'agrégation par une molécule exogène se traduit donc par une inhibition de cette fluorescence.

²⁶⁸ Levine, H. *Amyloid*. **2007**, 14, 185-197.

²⁶⁹ Hawkes, C. A., Ng, V., McLaurin, J. *Drug Dev. Res.* **2009**, 70, 111-124.

²⁷⁰ Pagano, K., Tomaselli, S., Molinari, H., Ragona, L. *Front. Neurosci.* **2020**, 14.

²⁷¹ Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S. Goedert, M., Hasegawa, M. *Biochemistry*. **2006**, 45, 6085-6094.

²⁷² Buell, A. K., Dobson, C. M., Knowles, T. P., Welland, M. E. *Biophys. J.* **2010**, 99, 3492-3497.

Le processus de fibrillation repose sur un mécanisme nucléation-dépendant²⁷³. Tout d'abord, une phase de latence est observée traduisant l'assemblage des monomères et la formation d'un noyau (nucléation) auquel des monomères et oligomères vont pouvoir s'ajouter. L'élongation des fibres se déroule ensuite selon une croissance exponentielle autour du noyau primaire jusqu'à l'obtention d'un équilibre (**Figure 113**). La présence d'un inhibiteur peut affecter la vitesse d'élongation et/ou la quantité de fibres, induisant respectivement une augmentation du temps de latence et/ou bien une diminution de l'intensité de fluorescence.

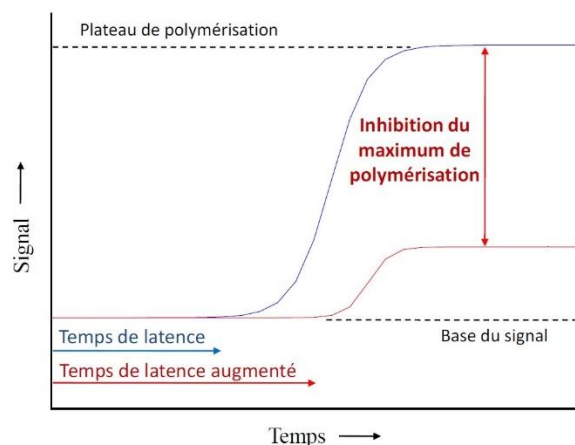


Figure 113 | Evolution de la fibrillation *in vitro* du peptide A β sans inhibiteur (bleu) et avec inhibiteur (rouge). Adapté de Dufour, E.²⁷⁴

L'évaluation est réalisée dans des plaques 96 puits contenant la ThT dans un tampon phosphate, auquel est ajouté le peptide A β ainsi que la molécule inhibitrice (**Figure 114**). Après une excitation à 440 nm, l'émission de fluorescence à 480 nm est mesurée et comparée à l'émission de fluorescence du contrôle (ne comportant pas l'inhibiteur) pour obtenir le pourcentage d'inhibition. Néanmoins, cette diminution ou extinction de fluorescence elle seule ne suffit pas à conclure sur une inhibition de la formation des fibres et peut uniquement traduire un déplacement de la sonde ThT des feuilletts β auxquels elle était liée par la molécule testée comme inhibiteur. Seules la microscopie et une analyse par dichroïsme circulaire permettent de confirmer le résultat.

²⁷³ Jarrett, J. T., Lansbury, Jr, P. T. *Cell*. **1993**, 73, 1055-1058.

²⁷⁴ Dufour, E. Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes beta et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation. Ph.D. Thesis, Université de Grenoble, 2013.

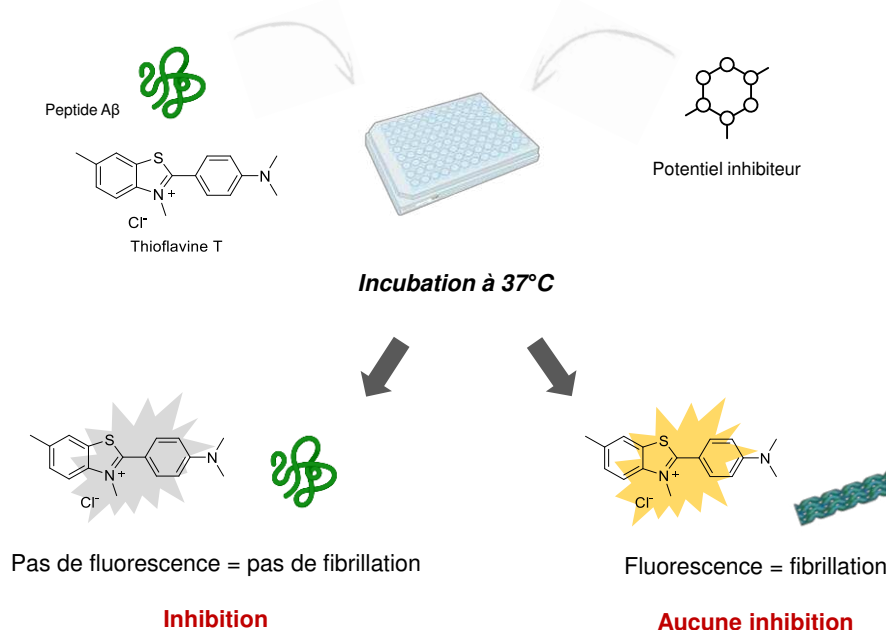


Figure 114 | Evaluation de l'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ par le suivi de l'émission de fluorescence de la ThT. Adapté de Dufour, E.²⁷⁴

Dans le cas du rouge Congo, Buell *et al.* ont rapporté que ce composé déplace la thioflavine T de son site de liaison avec le peptide pathologique mais sans inhiber le processus de fibrillation. Des dérivés du rouge Congo sont tout de même étudiés. C'est le cas de la chrysamine G, (**Figure 115**) un dérivé plus lipophile, capable de franchir la BHE. Il a été rapporté que cette molécule était capable d'inhiber la formation des fibres Aβ, d'en réduire la toxicité et d'accroître leur dégradation par les protéases. Par ailleurs, il est admis que des polyphénols possèdent une activité thérapeutique contre la fibrillation amyloïde. Le curcumin (**Figure 115**), notamment a fait l'objet de nombreuses études présentant sa capacité à impacter la formation fibrillaire, l'agrégation peptidique *in vitro* et *in vivo*²⁶⁹. Néanmoins, il est également connu pour déplacer la ThT des fibres amyloïdes et induire ainsi des biais de fluorescence. Son activité *in vitro* sur l'agrégation d'Aβ est donc remise en cause. Le NDGA (acide nordihydroguaiarétique) (**Figure 115**) est également un polyphénol dont il a été montré qu'il engendrait également *in vivo* une diminution des dépôts amyloïdes²⁷⁵.

Au vu des propriétés spectrales des polyphénols, un important risque de biais de fluorescence peut fausser les résultats des essais de fibrillation à la ThT. Il est donc nécessaire

²⁷⁵ Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., Yamada, M. *Am. J. Pathol.* **2009**, 175, 2557-2565.

Dès 1995, Wood *et al.* ont déterminé que la séquence peptidique $^{17}\text{LVFFAED}^{23}$ issue du peptide A β assurait le rôle de cœur hydrophobe indispensable à la fibrillation du peptide²⁷⁸. À la suite, Tjernberg *et al.* ont cherché à établir les séquences qui se lient fortement au peptide²⁷⁹. Les auteurs ont ainsi établi que les séquences $^{16}\text{KLVFF}^{20}$ et $^{15}\text{QKLVFF}^{20}$ (**Figure 117**) présentaient une affinité de liaison importante. En opérant par mutation successive des acides aminés en alanine (Alascan), ils ont pu déterminer que les résidus lysine, leucine et la seconde phénylalanine (motif KL--F) étaient fondamentaux pour conserver cette affinité et son activité. En effet, les auteurs ont déterminé que le peptide incubé en quantité équimolaire avec A β , inhibait la formation de feuilletts β et l'agrégation en fibres amyloïdes. La forte affinité de ce motif a été confirmée et le rôle de casseur de feuilletts β a été mis en avant par Hetény *et al.*²⁸⁰. En parallèle, Soto *et al.* ont développé des inhibiteurs peptidiques dérivés de ce motif²⁸¹. Ils ont choisi une séquence présentant une hydrophobicité similaire à LVFFA, mais qui n'est pas favorable à la formation de feuilletts. Les auteurs ont donc conçu l'inhibiteur iA β 1 de séquence RDLPFVDVPID. Son évaluation *in vitro* (test à la thioflavine) a montré que ce peptide de 11 acides aminés a pu se lier à A β , inhiber l'amyloidogenèse et conduire à un désassemblage partiel des fibres déjà formées. Néanmoins, l'utilisation de peptides pour une approche thérapeutique présente des limites. En plus de devoir franchir la BHE, les peptides peuvent conduire à une réponse immunitaire et sont sensibles à la dégradation enzymatique. Il est possible de s'affranchir en partie des deux premiers problèmes en réduisant le nombre d'acides aminés de la séquence. La dégradation par les protéases a été contournée en synthétisant la séquence inverse (utilisation des acides aminés de configuration D). Soto *et al.* ont donc évalué l'intérêt de séquences plus courtes et le peptide iA β 5, de séquence LPFFD (**Figure 117**), a ainsi été conçu. Cette molécule, en plus de présenter une activité inhibitrice similaire à iA β 1 permet d'éviter la dégradation enzymatique. *In vivo*, sur un modèle de rat présentant une agrégation cérébrale d'A β , iA β 5 a confirmé les observations faites *in vitro* en réduisant significativement les dépôts protéiques et en empêchant complètement la formation de fibres amyloïdes²⁸². En synthétisant l'analogue de configuration D du peptide iA β 1, les auteurs ont obtenu un inhibiteur

²⁷⁸ Wood, S. J., Wetzel, R., Martin, J. D., Hurle, M. R. *Biochemistry*. **1995**, 34, 724-730.

²⁷⁹ Tjernberg, L. O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A. R., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8545-8548.

²⁸⁰ Hétény, C., Körtvélyesi, T., Penke, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1587-1593.

²⁸¹ Soto, C., Kindy, M. S., Baumann, M., Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 226, 672-680.

²⁸² Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castaño, E. M., Frangione, B. *Nat. Med.* **1998**, 4, 822-826.

de même efficacité que le composé de configuration L, mais qui a présenté une résistance accrue aux protéases.

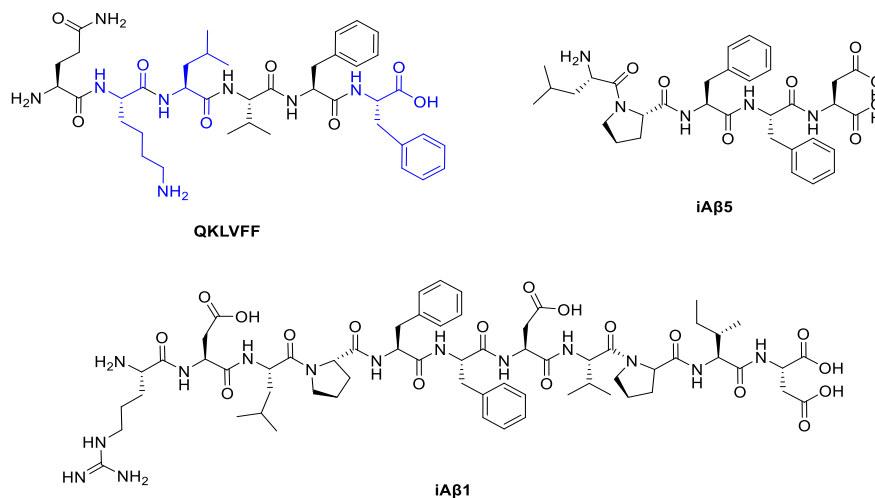


Figure 117 | Structure des peptides QKLVFF et iAβ5.

Dès 1999, Findeis *et al.* ont proposé la conception d'inhibiteurs peptidiques dérivés du motif d'Aβ modifié par l'insertion de résidus organiques en N-terminal²⁸³. De tels composés permettent de conserver la capacité de liaison du peptide avec les fibres, tout en insérant une gêne stérique ou conformationnelle empêchant la poursuite de l'interaction pathologique amyloïde. Les auteurs ont ainsi rapporté le développement de dérivés de l'acide cholique liés de manière covalente aux séquences peptidiques d'intérêt. Un de leur composé a notamment présenté une capacité à inhiber à la fois la polymérisation pathologique d'Aβ et la cytotoxicité (**Figure 118**). Constitué de la séquence ¹⁷LVFFA²¹ couplé à un résidu d'acide cholique, le composé a permis une inhibition totale lorsqu'introduit en équimolaire avec Aβ, à 50 μM et présente une inhibition de 33% dès 5 μM. Ce composé s'est cependant avéré instable mis en solution avec le fluide cérébrospinal de singes et s'est totalement dégradé en 24 heures. Son analogue en série D n'a pas présenté de dégradation sur la même durée, néanmoins, son activité inhibitrice n'a pas pu être évaluée en raison de son insuffisante solubilité dans les conditions d'évaluation.

²⁸³ Findeis, M. A., Musso, G. M., Arico-Muendel, C. C., Benjamin, H. W., Hundal, A. M., Lee, J.-J., Chin, J., Kelley, M., Wakefield, J., Hayward, N. J., Molineaux, S. M. *Biochemistry*. **1999**, 38, 6791-6800.

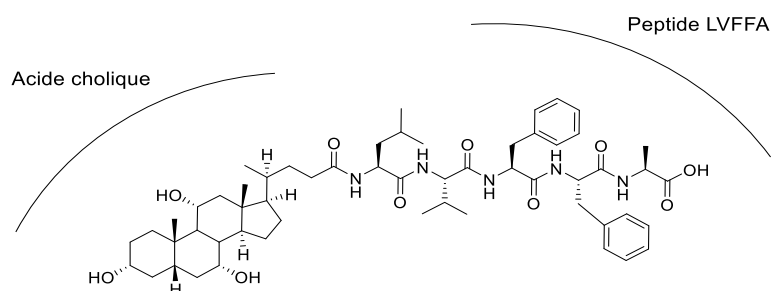


Figure 118 | Composé développé par Findeis *et al.*²⁸³

À partir de ces résultats, une approche multimérique a été développée, reposant sur le postulat que l'apport de plusieurs molécules actives sur un même châssis permet d'augmenter sa concentration locale. Par exemple, un dendrimère portant quatre motifs KLVFF **K4** a été développé par Chafekar *et al.*²⁸⁴ Dans l'objectif d'utiliser un effet de multivalence en apportant quatre unités capables de lier les fibres d'A β ₄₂ et ainsi augmenter l'affinité de liaison et la spécificité (**Figure 119**). Son efficacité d'inhibition de la fibrillation a été évaluée *in vitro* (test à la thioflavine) et une très forte inhibition de la fibrillation de A β ₄₂ comparée au monomère KLVFF, **K1** a été observée. Ainsi, **K4**, à un ratio de 1:4 A β /K, inhibe la fibrillation de A β ₄₂ de manière concentration dépendante en inhibant la fluorescence de plus de 90% quand elle n'est que de 25% avec **K1** introduit dans les mêmes proportions. Au vu de la taille du dendrimère, il n'est pas exclu que l'inhibition résulte de l'encombrement stérique mais la forte augmentation du pouvoir inhibiteur laisse présager d'un effet multivalent. Par ailleurs, **K4** a pu entraîner la déstructuration des fibres déjà constituées suggérant que les étapes de la fibrillation sont réversibles.

²⁸⁴ Chafekar, S. M., Malda, H., Merckx, M., Mejer, E. W., Viertl, D., Lashuel, H. A., Baas, F., Scheper, W. *ChemBioChem*. **2007**, 8, 1857-1864.

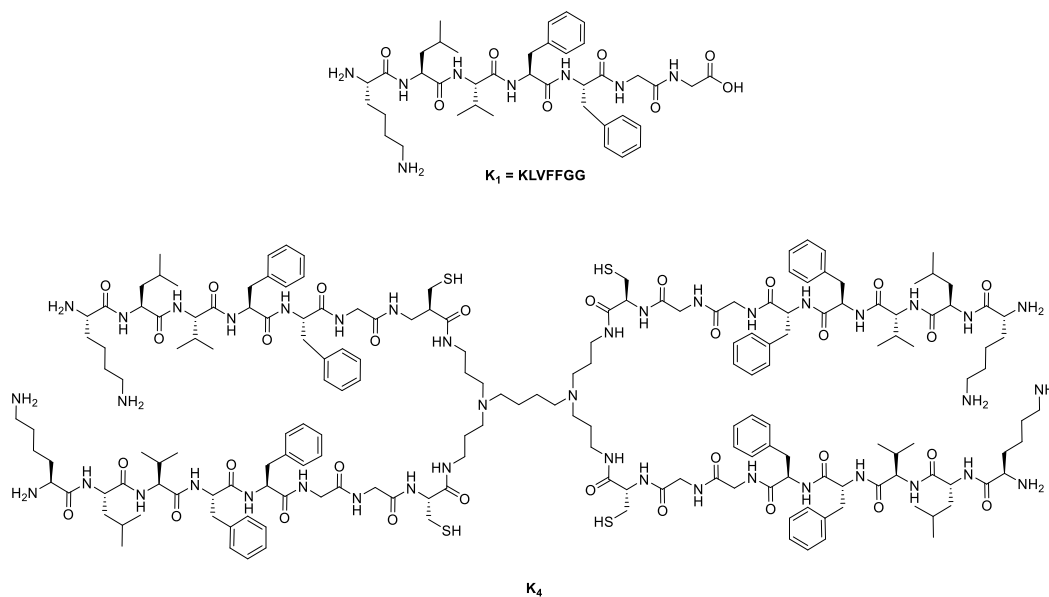


Figure 119 | Structure des molécules peptidiques inhibitrice de la fibrillation d'A β .

III. Cas particulier du peptide KLVFFA

L'équipe I2BM (Ingénierie et Interactions BioMoléculaires, Département de Chimie Moléculaire de Grenoble), avec qui nous avons collaboré pour notre projet, s'est particulièrement intéressée à cet effet de multivalence sur la fibrillation d'A β . Ils ont ainsi étudié l'effet d'un assemblage dimérique de KLVFFA relié à un cyclodécapeptide contraint²⁸⁵ (**Figure 120**). Cet échafaudage développé afin d'inhiber la fibrillation présente les peptides sur une face et quatre résidus arginines sur l'autre face pour augmenter la solubilité du composé. La même structure a été développée avec le curcumin, ligand connu d'A β et inhibiteur de l'amyloïdogenèse. L'échafaudage dimérique de la séquence KLVFFA a montré un puissant effet contre l'agrégation de l'A β *in vitro*. En effet, contrairement aux précédents inhibiteurs rapportés dans la littérature pour lesquels une incubation équimolaire entre le composé et A β était nécessaire pour conduire à une inhibition effective, le dérivé dimérique a induit une inhibition de 95% de la fluorescence de la thioflavine T pour un ratio de 0.02/1. A ce ratio, le peptide seul comme le châssis non fonctionnalisé, utilisés comme contrôles, n'ont montré aucune activité inhibitrice. Le dérivé curcumin a également présenté une action, bien qu'elle soit moindre que celle du dérivé peptidique. Bien que le mécanisme ne soit pas élucidé, il est fortement présumé que la multivalence favorise les interactions entre l'inhibiteur et le peptide A β , et que le châssis moléculaire soit un élément perturbateur dans le processus de fibrillation.

²⁸⁵ Ouberai, M., Dumy, P., Chierici, S., Garcia, J. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2123-2132.

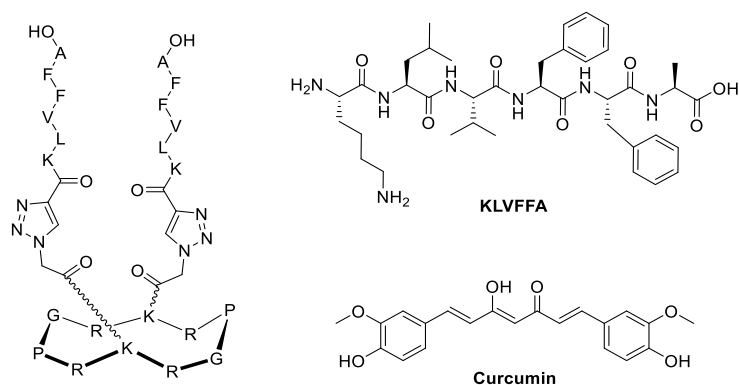


Figure 120 | Représentation du châssis moléculaire cyclodécapeptidique fonctionnalisé par le peptide KLVFFA.

Bien qu'efficace cette approche possède une limitation majeure qui repose sur la structure même de la molécule. La structure cyclodécapeptidique présente un haut poids moléculaire et une polarité rendant impossible son passage de la BHE. L'équipe a donc par la suite développé un dimère de KLVFFA basé sur un châssis dicétopiperazine plus approprié au passage de la BHE mais ce composé bien qu'actif *in vitro* n'a pu être évalué *in vivo*.²⁸⁶ C'est dans la continuité de ce travail portant sur la synthèse d'un inhibiteur peptidique lié à un assemblage encombrant capable de franchir la BHE que notre projet s'inscrit.

²⁸⁶ Dufour, E., Moni, L., Chierici, S., Garcia, J. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 4964.

3. Conception et synthèse de nucléolipides-KLVFFA

I. Etat de l'art sur les nucléosides-peptides d'intérêt biologique

1. Nucléosides-peptides naturels

L'intérêt des nucléosides a été présenté dans le chapitre précédent et celui des peptides dans un objectif thérapeutique n'est plus à prouver. Depuis la synthèse de l'insuline, plus de 80 molécules peptidiques ont été mises sur le marché pour des applications variées²⁸⁷. Les nucléosides sont également majoritairement développés pour la variété de leurs potentiels d'action. Néanmoins, le couplage de ces entités pour synthétiser des nucléosides-peptides n'est que peu étudié. Cette famille de molécules existe à l'état naturel avec des composés présentant des activités majoritairement antibiotiques. Ainsi, en 2002, McDonald *et al.* ont rapportés la découverte de 19 composés muramycines constitués d'une uridine et d'un peptide lié en position 5' (**Figure 121**). L'activité de ces composés isolés des bactéries *Streptomyces* repose sur l'inhibition de l'enzyme *MraY*²⁸⁸. En bloquant cette enzyme, ces molécules naturelles permettent d'inhiber la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne. La Blasticidine S est un autre composé nucléoside-peptide antibiotique constitué d'un squelette cytosine. Son action consiste en l'interférence de la synthèse protéique ribosomale. Les nucléoside-peptides peuvent également présenter une base purine, comme c'est le cas de la puromycine, la cystocine ou encore la chryscandine²⁸⁹ (**Figure 121**). Ces trois composés le fragment peptidique en position 3' ce qui les rend plus résistants à l'hydrolyse. La première molécule agit au niveau ribosomal en impactant la synthèse protéique. La cystocine, qui exerce une activité antitumorale, présente une activité antibiotique deux fois supérieure à celle de la puromycine. La chryscandine ne diffère de la puromycine que par son amine primaire sur sa base. Elle n'est pas uniquement active contre les bactéries, comme la puromycine, mais l'est également contre les *Candida albicans*, des champignons responsables d'un grand nombre d'infections.

²⁸⁷ Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., Fu, C. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, 7.

²⁸⁸ McDonald, L. A., Barbieri, L. R., Carter, G. T., Lenoy, E., Lotvin, J., Petersen, P. J., Siegel, M. M., Singh, G., Williamson, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10260-10261.

²⁸⁹ Roviellio, G. N., Benedetti, E., Pedone, C., Bucci, E. M. *Amino Acids.* **2010**, 39, 45-57.

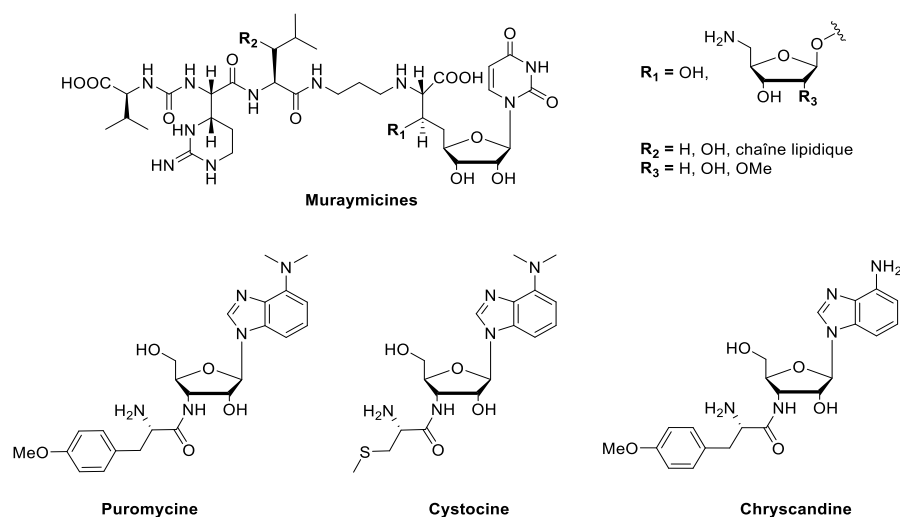


Figure 121 | Sélection de nucléosides-peptides naturels.

Afin de bénéficier de l'intérêt conjugué des nucléosides et des peptides dont le potentiel thérapeutique a été observé pour des composés naturels, des approches bioinspirées portant sur des hybrides synthétiques liant ces deux familles de molécules ont été étudiées.

2. Nucléosides-peptides synthétiques

Les conjugués de nucléosides-peptides synthétiques ont été l'objet d'intérêt pour des approches thérapeutiques. Les peptides eux-mêmes ont un potentiel considérable et un axe de leur développement, grandement exploré depuis les années 90, consiste en leur utilisation comme outil de pénétration cellulaire. Ces peptides de pénétration cellulaire (CPP – *Cell Penetrating Peptide*) permettent de transporter jusque dans les cellules des molécules incapables d'atteindre leur site d'action. De nombreux CPP, d'origine naturelle ou synthétique, permettant de transporter de manière covalente ou non des molécules organiques, des nanosystèmes, des ARN...

Il est donc possible de lier un nucléoside en tant que principe actif avec des peptides CPP. La Gemcitabine (précédemment présentée, chapitre III) fait partie des molécules nucléosides dont la transfection par les CPP est étudiée^{290, 291}. En effet, sans modulation cet anticancéreux est rapidement dégradé et présente une toxicité systémique. Pour améliorer son potentiel thérapeutique, sa conjugaison à un lipide a été présentée (chapitre III), mais d'autres

²⁹⁰ Hawryłkiewicz, A., Ptaszyńska, N. *Molecules*. **2021**, 26.

²⁹¹ Ferreira, A., Lapa, R., Vale, N. *Biomolecules*. **2019**, 9.

humains²⁹³. Les CPP utilisés ont été choisis pour leur caractère cationique pouvant ainsi cibler les cellules tumorales dont les membranes ont un caractère anionique accru. Deux des composés ont conduit à une inhibition accentuée de la croissance cellulaire cancéreuse comparée à l'action de la gemcitabine en diminuant l'IC₅₀ de 74 nM à 15 nM (**CPP6-1**) et 14 nM (**CPP6-3**) (**Figure 123**).

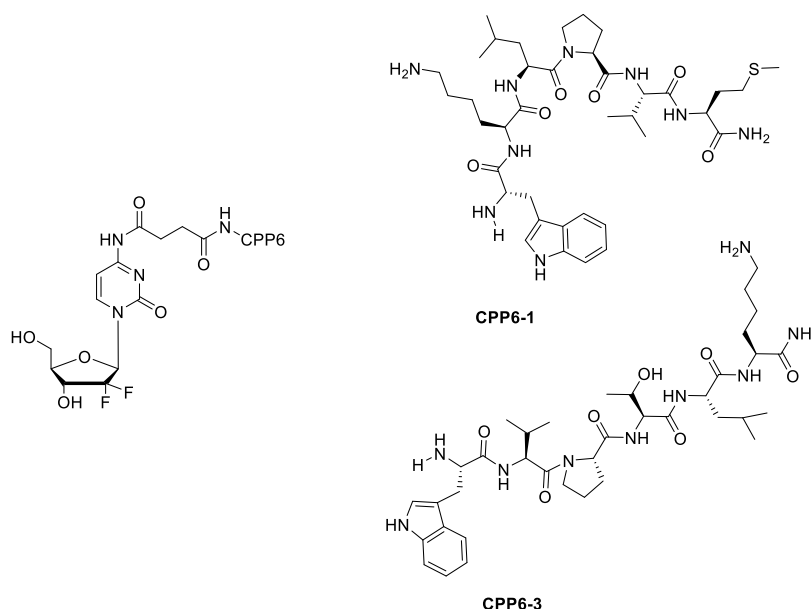


Figure 123 | Nucléoside peptide lié par une liaison amide.

Le couplage de peptides à des nucléosides pour former des analogues d'acides nucléiques est également décrit²⁹⁴. Les acides nucléiques peptides (PNA – *Peptide Nucleic Acid*) présentent en lieu et place du squelette phosphodiester une chaîne peptidique sur laquelle se fixent les nucléobases. Ces structures peuvent ainsi s'hybrider avec les séquences d'ADN ou d'ARN (**Figure 124**). Par ailleurs, étant non chargées elles possèdent une spécificité d'appariement et une stabilité améliorée comparé aux complexes ADN/ADN ou ADN/ARN qui présentent une répulsion électrostatique en raison de leurs charges négatives. De plus, les PNA sont résistants au clivage enzymatique et donc ne sont pas dégradés, leur permettant de conserver une durée d'action importante. Aussi, les PNA ont été utilisés pour des stratégies antigène et antisens de sorte à inhiber la transcription et la traduction des ARN²⁹⁵. Ils ont été développés dans des stratégies de bio-imagerie pour le cancer, des approches thérapeutiques

²⁹³ Correira, C., Xavier, C. P. R., Duarte, D., Ferreira, A., Moreira, S., Vasconcelos, M. H., Vale, N. *RSC Med. Chem.* **2020**, 11, 268-273.

²⁹⁴ Pellestor, F., Paulasova, P., Macek, M., Hamamah, S. *Med. Sci.* **2005**, 21, 753-758.

²⁹⁵ Lee, H. T., Kim, S. K., Yoon, J. W., *J. Microbiol.* **2019**, 57, 423-430.

anticancéreuses, antivirales, antibactériennes par exemple²⁹⁶. Il est par exemple possible de citer les travaux de Bai *et al.* qui décrivent l'utilisation de PPNA06 (5'-(RXR)₄XB-eg1-tttgctccat-3') pour des activités antibactériennes²⁹⁷. Constitué du peptide (RXR)₄XB et de la séquence d'oligonucléotide 3' TACCTCGTTT ce PNA permet une inhibition de l'expression du gène *rpoD* encodant pour une polymérase, décrite comme étant probablement essentielle à la croissance bactérienne. Les évaluations *in vivo* sur un modèle de souris infectées a mis en évidence une activité thérapeutique conduisant à la survie de 50% des souris, montrant le possible intérêt de tels composés.

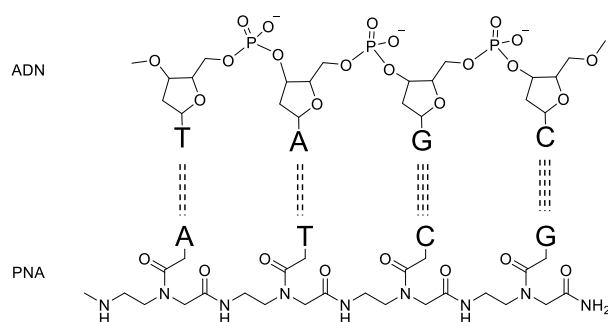


Figure 124 | Interaction d'un acide nucléique peptide avec un ADN. D'après Wu *et al.*²⁹⁸

Les peptides peuvent également être des substances actives d'intérêt du conjugué nucléoside-peptide. Le peptide D-(KLAKLAK)₂ en est un qui présente une activité antimicrobienne par rupture des membranes mitochondriales conduisant à la mort cellulaire. Dans une volonté d'adapter cette stratégie thérapeutique pour le développement d'anti-cancéreux, Rana *et al.* ont synthétisé un bioconjugué nucléolipide peptide afin d'accroître la perméabilité cellulaire en utilisant la capacité des nucléolipides à former des structures stables²⁹⁹. Le composé obtenu (**Figure 125**) a présenté une hydrophobicité plus importante que la séquence peptidique native tout en s'auto-organisant en nanoparticules cationiques. Évalué sur des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire, le nucléolipide-peptide a présenté sur une des lignées, une activité de mortalité cellulaire accrue comparée à la séquence native (léthalité de 31% contre 19% pour le peptide seul). Ces résultats laissent présager l'amélioration thérapeutique que le couplage d'un peptide avec un nucléolipide peut engendrer en permettant de favoriser le passage des membranes biologiques.

²⁹⁶ Gupta, A., Mishra, A., Puri, N. *J. Biotechnol.* **2017**, 259, 148-159.

²⁹⁷ Bai, H., You, Y., Yan, H., Meng, J., Xue, X., Hou, Z., Zhou, Z., Ma, X., Sang, G., Luo, X. *Biomaterials.* **2012**, 33, 659-667.

²⁹⁸ Wu, J-C., Meng, Q-C., Ren, H-M., Wang, H-T., Wu, J., Wang, Q. *Nature.* **2017**, 38, 798-805.

²⁹⁹ Rana, N., Huang, S., Patel, P., Samuni, U., Sabatino, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 3567-3571.

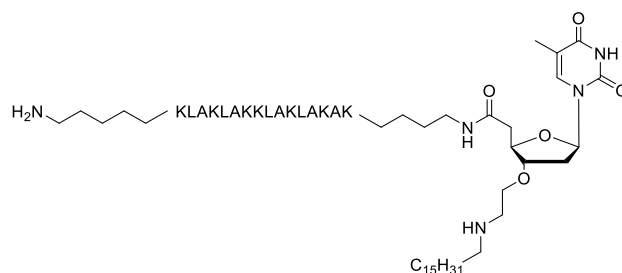


Figure 125 | Nucléolipide peptide pour accroître l'activité biologique peptidique.

Notre travail porte sur une approche similaire en voulant accroître l'activité d'un peptide d'intérêt mais également en modifiant ses propriétés physico-chimiques afin de pouvoir le véhiculer efficacement à travers les membranes biologiques.

II. Stratégie envisagée

Malgré le peu de travaux portant sur la synthèse de nucléosides-peptides, leur développement peut s'avérer potentiellement judicieux. Il a été montré que si les peptides KLVFF et KLVFFA interfèrent avec le processus de fibrillation des peptides A β , ils présentent des difficultés de solubilité en raison de leur hydrophilie insuffisante et ne sont pas non plus suffisamment lipophiles pour pouvoir franchir la BHE³⁰⁰. Bien que ces deux peptides soient également efficaces sur l'agrégation, nous avons choisi d'utiliser le peptide KLVFFA afin de conserver une continuité avec les travaux réalisés précédemment dans l'équipe I2BM. En collaboration avec le Dr. Sabine Chierici du département de Chimie Moléculaire à Grenoble, spécialiste de la synthèse peptidique et qui s'intéresse tout particulièrement à la maladie d'Alzheimer, le projet est de concevoir des hybrides peptide-nucléolipides afin d'accroître la lipophilie de ce peptide et de l'incorporer au sein d'un véhicule de type NE L/H pour lui permettre de franchir les membranes biologiques et donc à terme pénétrer le SNC. Notre hypothèse s'appuie sur le fait que la formation d'un hybride covalent entre le peptide et un nucléolipide pourrait permettre de modifier les propriétés physico-chimiques du peptide et notamment d'augmenter sa lipophilie et sa biodisponibilité. Par ailleurs, si les composés s'avéraient suffisamment lipophiles, ils pourraient être solubilisés dans l'huile et formulés en nanoémulsion L/H afin de favoriser leur distribution au niveau du système nerveux central

³⁰⁰ Pederzoli, F., Ruozi, B., Duskey, J., Hagemeyer, S., Sauer, A. K., Grabrucker, S., Coelho, R., Oddone, N., Ottonelli, I., Daini, E., Zoli, M., Vandelli, M. A., Tosi, G., Grabrucker, A. M. *Pharmaceutics*. **2019**, 11, 572.

(Figure 126). De plus, encombrer la séquence peptidique qui interagit avec les fibres A β devrait permettre d'accroître son potentiel d'inhibition.

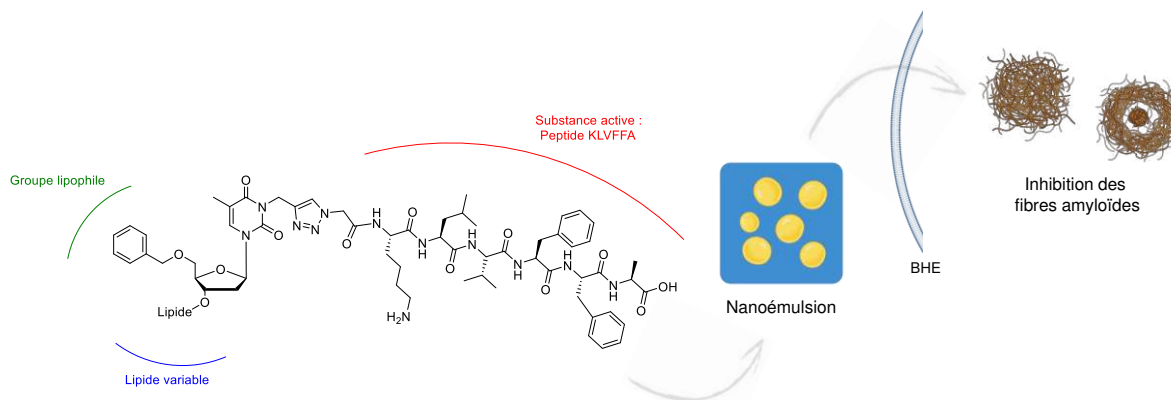


Figure 126 | Approche étudiée pour véhiculer jusqu'au système nerveux central un nucléolipide-peptide inhibiteur des fibres A β .

III. Synthèse des conjugués nucléosides KLVFFA

Dans le cadre de notre étude, plusieurs composés ont été envisagés pour un double objectif : apporter un encombrement *via* le couplage du peptide à un nucléoside (Figure 127) pour accentuer l'action d'inhibition de la fibrillation, comme Findeis *et al.*²⁸³ l'avait observé ; et modifier les propriétés physico-chimiques du composé grâce à un nucléolipide lié à la séquence peptidique afin d'accroître la lipophilie du composé pour le franchissement des membranes biologiques et notamment de la BHE. Le nucléoside-peptide servira de preuve de concept quant à l'intérêt de la moitié nucléosidique sur l'inhibition de la fibrillation d'A β lors des essais *in vitro*.

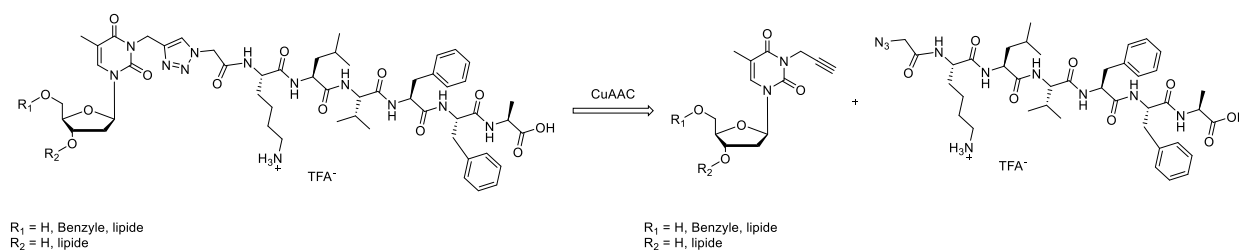


Figure 127 | Schéma rétrosynthétique des conjugués nucléosides KLVFFA.

1. Synthèse du peptide KLVFFA

Le peptide d'intérêt KLVFFA **73** a été synthétisé manuellement par synthèse peptidique en phase solide (SPPS – *Solid Phase Peptide Synthesis*), sur une résine 2-chlorotrityle et par couplage des acides aminés protégés par un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonate (Fmoc) en *N*-term (stratégie Fmoc/*t*-Bu). La synthèse a été réalisée de la position *C*-terminale à la position *N*-terminale (inverse à la synthèse naturelle), selon le cycle de synthèse peptidique présenté en **Figure 128**. La synthèse a débuté par la fixation du premier acide aminé (ici la Fmoc-alanine) sur la résine par une réaction de substitution nucléophile. Le groupement protecteur Fmoc de l'acide aminé juste ajouté a ensuite été coupé par une solution de pipéridine pour permettre la réaction avec l'acide aminé suivant. L'activation de l'acide carboxylique de ce dernier a lieu par un activateur, le PyBOP, en conditions basiques, afin de permettre son couplage avec l'amine libre de l'acide aminé déjà supporté. Les amines n'ayant pas réagi ont alors été acylées afin d'empêcher la poursuite de la synthèse sur ces positions qui aurait abouti à l'obtention de peptides tronqués. L'amine de l'acide aminé juste ajouté a ensuite été déprotégée par une solution de pipéridine pour permettre la réaction avec l'acide aminé activé suivant, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du peptide final **73**.

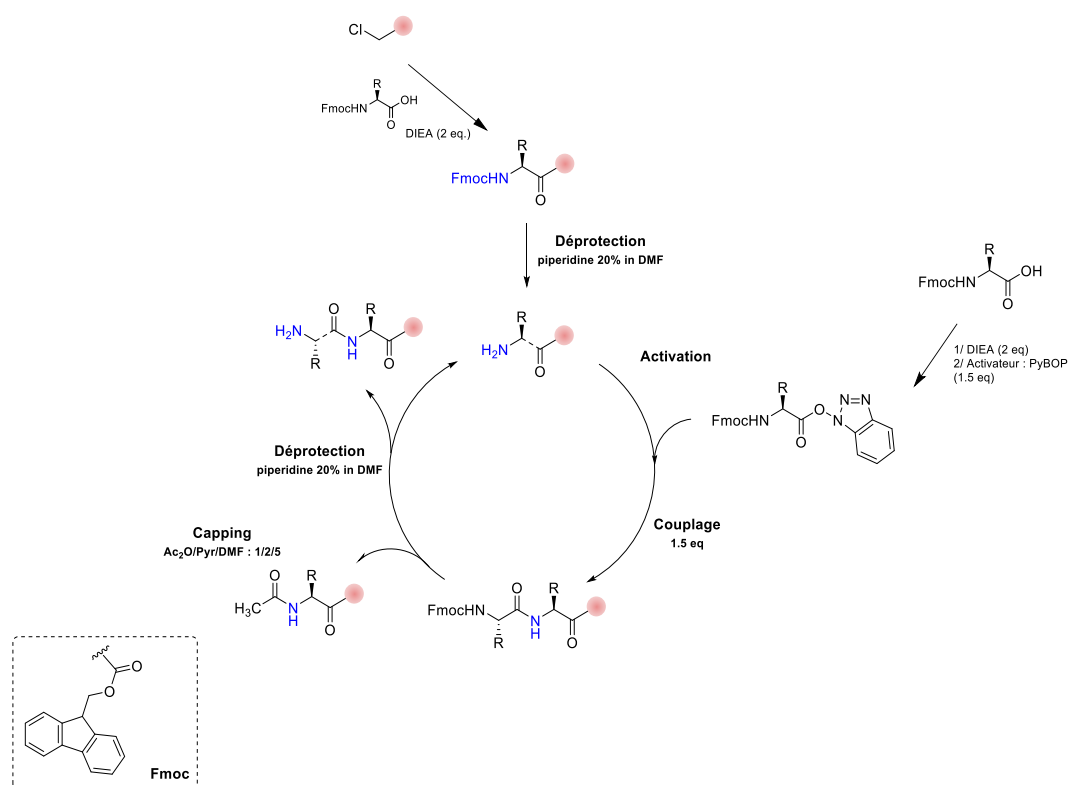


Figure 128 | Cycle de synthèse peptidique sur support solide.

En vue de lier ce peptide, un septième résidu a été inséré en position *N*-terminale. En effet, pour coupler efficacement le peptide à nos dérivés nucléosidiques, un bras azoture était nécessaire. Il a été synthétisé à partir de l'acide iodoacétique et de l'azoture de sodium en milieu aqueux (**Figure 129**). Ce dernier a été sélectionné non pas pour insérer une distance entre les deux moitiés du composé cible mais uniquement pour pouvoir les lier. Une séquence carbonée plus importante n'était donc pas nécessaire. Cet espaceur **75** a été obtenu avec un bon rendement de 76%.

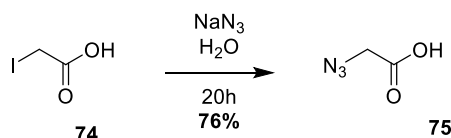


Figure 129 | Azidation de l'acide iodoacétique.

Le bras azoture **75** a ensuite été couplé *via* sa fonction acide avec l'amine terminale de la séquence peptidique en élongation sur le support solide (**Figure 130**). Ensuite, le peptide a été libéré du support et déprotégé par traitement acide puis purifié par HPLC préparative.

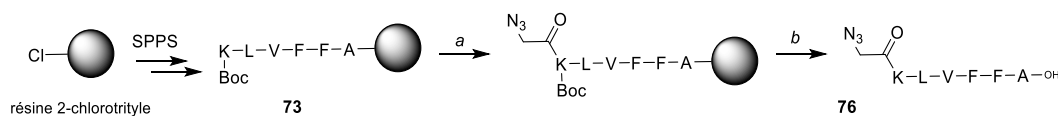


Figure 130 | Schéma de synthèse du peptide KLVFFA. a). $N_3CH_2CO_2H$, HBTU, DIEA, DMF. b). TFA/TIS/ H_2O : 95/2.5/2.5.

Le peptide azoture **76** a ainsi été obtenu avec un rendement global de 37%, sous forme d'un sel de TFA (sur le résidu lysine). Toutefois, le TFA est connu pour être toxique et la forme saline du peptide risque d'impacter fortement la solubilité dans l'huile pour former les nanoémulsions. Cette forme saline pourrait également, en favorisant l'agrégation du peptide, limiter l'efficacité de la réaction de couplage avec le partenaire nucléoside. Pour ces différentes raisons, le peptide KLVFFA azidé a été dessalé selon la méthode de Roux *et al.*³⁰¹ Pour cela, le peptide lyophilisé a été partiellement solubilisé à une concentration de 20 mM dans une solution aqueuse de soude à 100 mM. Après une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes et élimination du surnageant devant contenir le TFA, le peptide a été repris dans de l'eau et centrifugé de

³⁰¹ Roux, S., Zékri, E., Rousseau, B., Paternostre, M., Cintrat, J-C., Fay, N. *J. Pept. Science.* **2008**, 14, 354-359.

nouveau. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que le pH du surnageant ne soit plus basique, traduisant ainsi l'élimination de la soude.

Les analyses HPLC, RMN et UPLC ont montré un profil identique que pour le peptide salé, laissant présager que le traitement à la soude n'a pas impacté la structure de la molécule.

2. Synthèse des nucléosides

Pour cette étude, plusieurs nucléosides, non lipidisé, mono et dilipidisés, ont été synthétisés. Tout d'abord, un nucléoside uniquement propargylé en N3 a été obtenu par une N-alkylation de la thymidine aux micro-ondes dans les mêmes conditions que présentées en chapitre III (**Figure 131**).

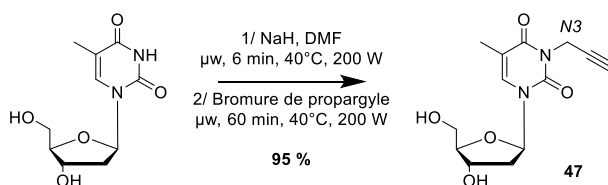


Figure 131 | N-propargylation de la thymidine.

Deux autres nucléolipides ont été synthétisés avec pour vocation d'être suffisamment lipophile pour permettre au peptide une fois conjugué d'être formulé au sein d'une nanoémulsion L/H et ainsi pouvoir franchir les membranes biologiques, voir même la BHE. Le premier composé porte une chaîne grasse en position 3' tandis que sa position 5' est O-benzylée. Pour obtenir ce composé **77** (**Figure 132**) une stratégie de protection des alcools en 5' puis 3', suivie de la déprotection sélective de l'alcool primaire, a permis la O-benzylation de la position 5' dans des conditions de synthèse assistée par micro-ondes. La déprotection de l'alcool secondaire en 3' a permis son estérification avec un lipide de chaîne carbonée moyenne selon les conditions de couplage de Steglich. Il est intéressant de noter que la benzylation en 5' s'est faite avec un rendement moyen. Nous avons remarqué que la position 5' est difficile à alkyler lorsque la position 3' est protégée. Quel que soit le groupement inséré en position 3', la substitution de la position 5' s'avère plus délicate, d'autant plus quand le groupement à l'origine de la gêne stérique est important comme c'est le cas pour le TBDPS. Par ailleurs cette réaction supporte difficilement le *scale-up* : lors de l'utilisation d'un *vial* à micro-onde permettant d'introduire un volume de solvant compris entre 5 et 10 mL, les rendements étaient diminués jusqu'à 50% comparé à la réaction effectuée dans un *vial* de volume compris entre 1 et 5 mL.

La difficile O-benzoylation en 5' est également la raison pour laquelle la synthèse du composé **80** n'est pas réalisée à partir du composé **47**. En effet, la O-benzoylation du composé *N*-propargylé et 3'-TBDPS présentait de faibles rendements de réaction. Le composé **80** a tout de même pu être isolé après 7 étapes simples de synthèse.

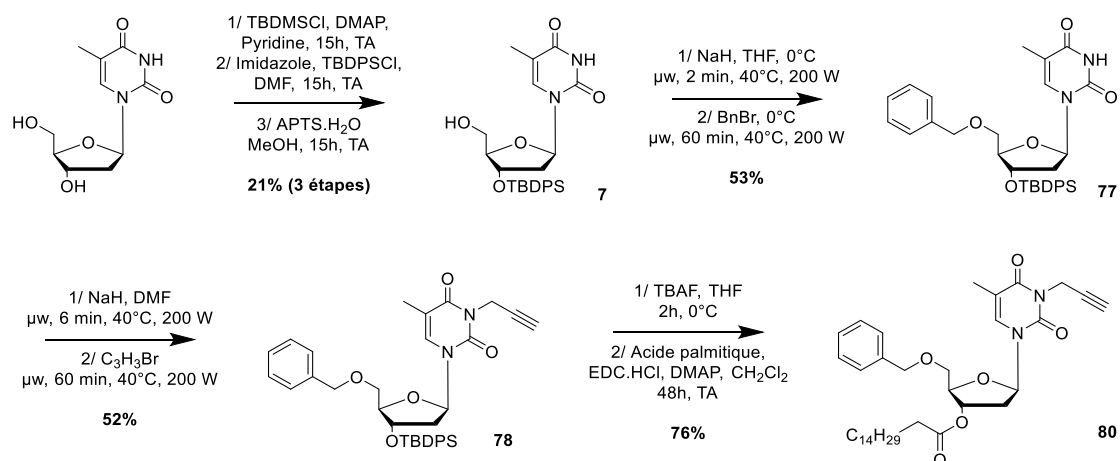


Figure 132 | Voie de synthèse du nucléoside monolipidique propargylé.

La synthèse d'un deuxième conjugué nucléoside portant cette fois deux chaînes lipidiques et donc plus lipophile que le composé **80** a été effectuée. L'idée était d'avoir une solution de repli dans le cas où le composé **80** ne serait pas suffisamment lipophile pour être formulé au sein d'une nanoémulsion L/H. Le dérivé 3',5'-bislipidique **81** a ainsi été synthétisé en deux étapes à partir de la thymidine, avec un rendement de 88% (Figure 133).

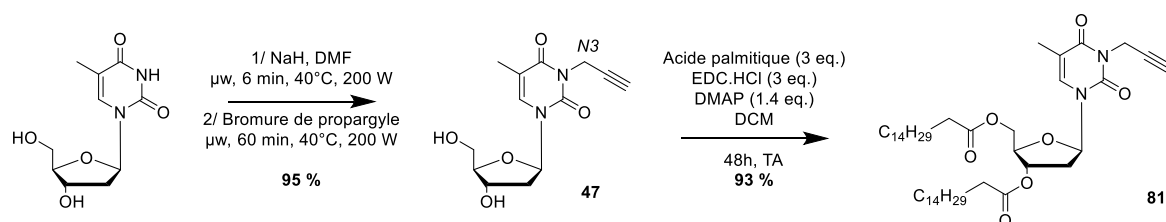


Figure 133 | Synthèse du nucléoside bislipidique propargylé.

3. Conjugaison : accès aux nucléosides KLVFFA

3.1. Synthèse du nucléolipides KLVFFA

Les premiers essais de conjugaison par réaction click CuAAC ont été effectués à partir du composé **80** et du peptide KLVFFA azidé **76** sous forme de sel de TFA (Tableau 22). Après

plusieurs réactions infructueuses dans des conditions classiques (75°C dans du *t*-BuOH et de l'eau), nous avons utilisé du 2,2,2-Trifluoroéthanol (TFE) comme co-solvant²⁸⁵. Le TFE est couramment utilisé pour améliorer la solubilité du peptide. En effet, lors des premiers essais, le mélange réactionnel était insoluble, ce qui a engendré une prise en masse rapide empêchant toute réaction. Bien que le TFE ait amélioré ce défaut de solubilité, les conditions sont restées inefficaces (entrée **1** et **2**). Le remplacement du *t*-BuOH pour du DMSO et l'ajout de tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA), ligand utilisé pour complexer le Cuivre (I) et lui conférer ainsi une durée de vie plus importante, n'ont pas non plus eu d'impact sur la conversion de la réaction (entrée **3**). Néanmoins, après avoir placé ce milieu réactionnel aux micro-ondes, 30 minutes à 80°C, le suivi HPLC a permis de mettre en évidence un début de réaction. Le recours aux micro-ondes s'est donc imposé. De telles réactions de CuAAC au micro-onde avec l'utilisation du cuivre (I) ont d'ailleurs été rapportées pour conduire à des rendements quantitatifs en peu de temps³⁰². La réaction a donc été réalisée aux micro-ondes, dans du DMSO/TFE (entrée **4**). En sortie de micro-onde, le mélange avait pris en masse mais le suivi HPLC a mis en évidence une réduction importante des signaux correspondant au peptide et au nucléolipide de départ, combiné à l'apparition d'un signal à un temps de rétention intermédiaire qui pouvait donc correspondre au produit issu de la cycloaddition entre les deux biomolécules (**Figure 134**). Par ailleurs, ce spectre a mis en évidence l'augmentation du temps de rétention du nucléolipide-peptide, ce qui dans les conditions d'éluion (C5, 25 cm x 10 mm, 10 µm ; 0% B pendant 3 minute, 0-100% B en 15 minutes, maintient pendant 2 minutes et retour à 0% B en 2 minutes) a traduit une augmentation de la lipophilie du composé formé.

³⁰² Guezguez, R., Bougrin, K., El Akri, K., Benhida, R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 4807-4811.

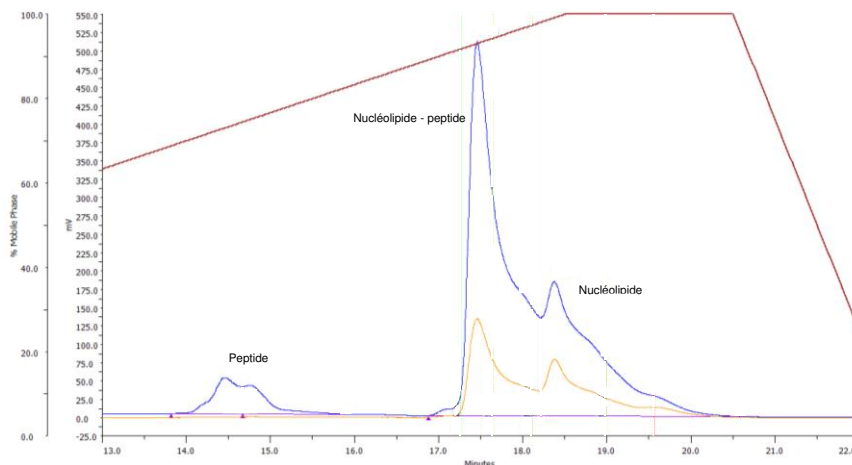


Figure 134 | Spectre d'HPLC résultant de la réaction click efficace.

L'ajout d'un volume d'eau équivalent aux volumes de DMSO et de TFE n'a pas eu d'effet sur la prise en masse en sortie de micro-onde ni sur l'efficacité du couplage (entrées **5** et **6**). L'utilisation de copeaux de cuivre, en lieu et place du sulfate de cuivre, n'a pas permis d'obtenir la moindre conversion (entrées **7** et **8**). Ces essais de réaction nous ont permis d'établir des conditions de réaction optimales : l'utilisation d'une activation par micro-ondes a été indispensable, et a engendré les meilleurs résultats dans le DMSO et le TFE, en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium (**Figure 135**). En effet, la faible solubilité des réactifs impose le recours au DMSO lors de la réaction. Le DMSO a également été utilisé pour solubiliser le produit obtenu en vue de sa purification.

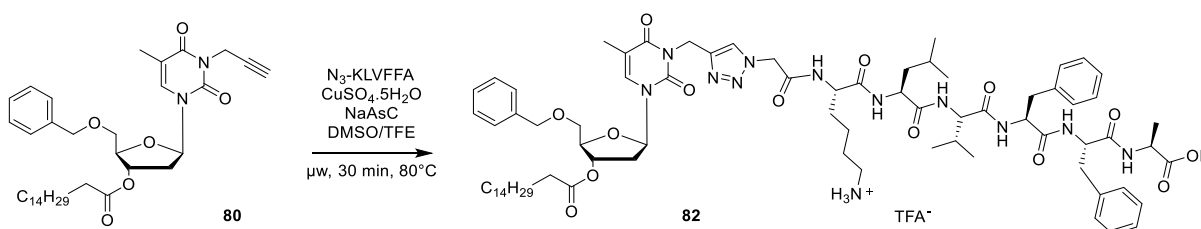


Figure 135 | Réaction de chimie click CuAAC entre le composé nucléolipide **77** et le peptide.

Aussi, le composé **82** solubilisé dans le DMSO a été purifié sur une colonne C5 par HPLC semi-préparative dans des conditions d'élution optimisées de sorte à pouvoir isoler le plus efficacement chaque composé. Mais le temps de rétention du nucléolipide-peptide est resté très proche de celui du nucléolipide dont la lipophilie semble l'emporter sur l'hydrophilie du peptide. Ceci a conduit à la récupération de mélanges en sortie de colonne. Une fraction du composé **82** pur a tout de même été isolé et lyophilisé. L'obtention du composé voulu a été

confirmée par l'analyse RMN et l'analyse en spectrométrie de masse (**Figure 136**). La masse exacte attendue est de 1414.83, ce qui correspond aux spectres obtenus : $[M+H]^+ = 1415.95$ et $[M-H]^- = 1413.88$.

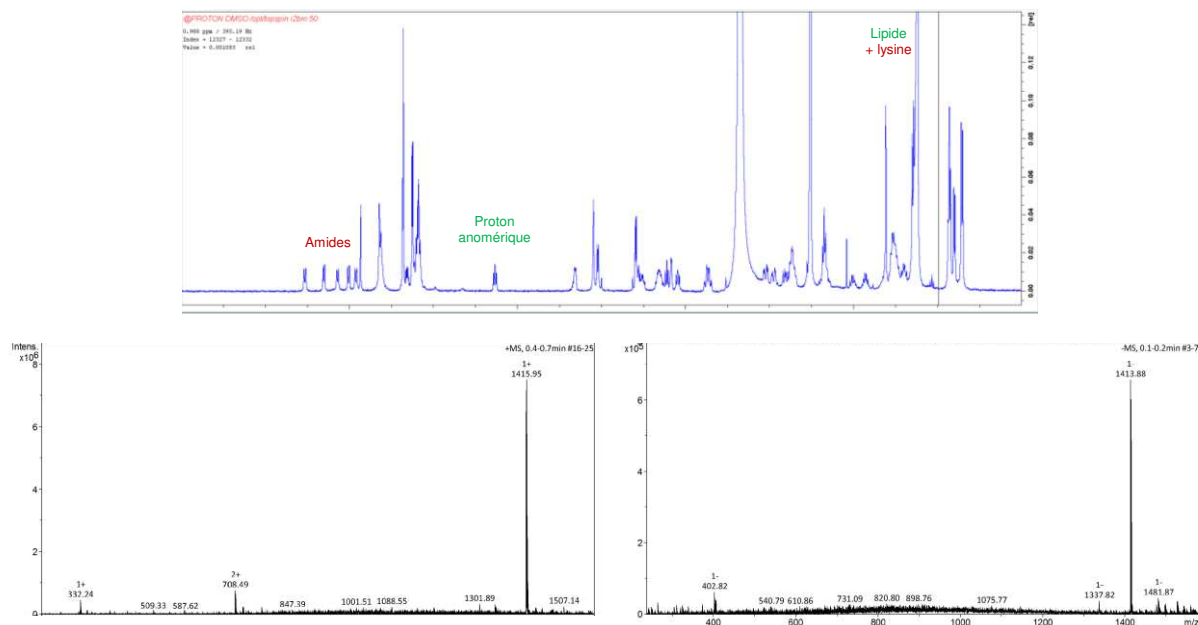


Figure 136 | Spectres de RMN du proton et profil de masse (ESI) du composé **82**. Le spectre RMN a été obtenu dans le DMSO.

Le peptide dessalé a également été engagé dans des réaction CuAAC avec le partenaire nucléolipide selon les conditions efficaces pour le peptide sous forme de sel de TFA. La réaction a été menée dans deux mélanges de solvant différents, en utilisant la même source de cuivre et de base que précédemment (**Tableau 22**, entrées **9** et **10**). Tout comme pour le composé salé, la réaction click dans un co-solvant DMSO/TFE s'est avérée efficace, mais l'utilisation d'un mélange *t*-BuOH/H₂O/TFE a semblé l'être encore plus quand il ne présentait pas de réel intérêt avant l'élimination des sels de TFA. Afin d'éviter l'obtention de nouveaux sels de TFA issus des éluants lors de la purification par HPLC, des essais sur silice ont été effectués. Néanmoins aucune des conditions essayées n'a permis de faire migrer le composé sur CCM. De plus, réaliser l'opération de dessalage après l'obtention du composé pur n'est pas envisageable en raison du risque de clivage des liaisons esters du nucléolipide. Des essais de migration sur CCM en phase inverse doivent encore être réalisés.

Tableau 22 | Optimisation des conditions de réaction pour la formation du triazole. TA = Température ambiante ; $\mu w = 80^{\circ}C$, * = prise en masse, / = aucune réaction.

	Source de cuivre	Additif	Solvants	T ($^{\circ}C$)	Temps	Conversion
1	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (0.2eq)	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O 1 : 1	75	1 h	*
2	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (0.2eq)	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	75,	6 h,	/
				TA	15h	/
3	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq) + 0.1eq CuSO ₄ .H ₂ O	NaAsC (1eq) ; THPTA (0.3eq)	DMSO /H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	TA,	15h,	/
				75	24 h	Oui
4	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (1eq)	DMSO/TFE 1 : 1	μw	30'	Oui *
5	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (1eq)	DMSO/H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	μw	30'	Oui *
6	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (1eq)	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	μw	30'	Oui *
7	Copeau de cuivre	NaAsC (1eq)	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	μw	30'	/ *
8	Copeau de cuivre	NaAsC (1eq)	DMSO/TFE 1 : 1	μw	30'	/
9	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (1eq) ; Peptide déssalé	DMSO/TFE 1 : 1	μw	30'	Oui *
10	CuSO ₄ .5H ₂ O (0.1eq)	NaAsC (1eq) Peptide déssalé	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O/TFE 1 : 1 : 1	μw	30'	Oui

Les conditions de réaction click optimales ont ensuite été utilisées pour le couplage du composé **81** présentant deux chaînes lipidiques (**Figure 137**). Le composé présente une lipophilie sensiblement accrue comparée au composé nucléolipidique-peptide initial, compliquant sa purification. Pour le moment, il n'a pas pu être purifié et son obtention n'a donc pas été validée.

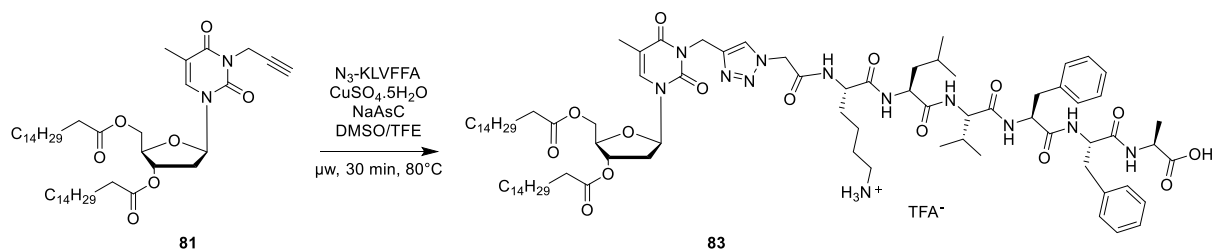


Figure 137 | Réaction de chimie click CuAAC entre le nucléoside bislipidique et le peptide azidé.

3.2. Synthèse du nucléoside-peptide référence

Le nucléoside KLVFFA, composé **84**, ne présentant pas de chaîne lipidique a été préparé en utilisant les conditions de click mises au point précédemment (Figure 138).

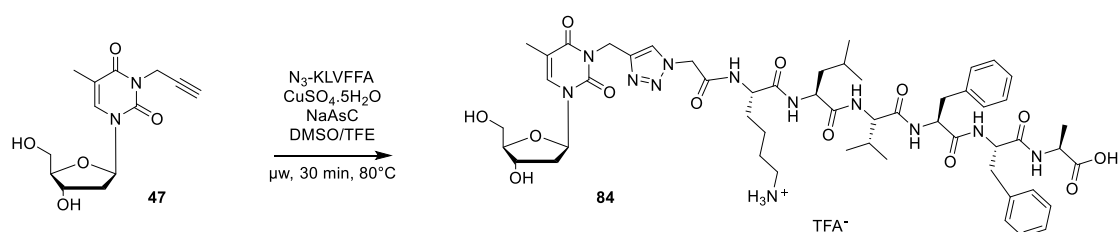


Figure 138 | Réaction de chimie click CuAAC entre le composé nucléoside **48** et le peptide.

Le nucléoside-peptide **84** a été purifié, après solubilisation dans le DMSO, par HPLC semi-préparative, sur une colonne C4. La colonne utilisée étant différente de celle utilisée pour le nucléolipide-peptide **82**, les conditions d'éluion ont dues être optimisées.

Le nucléoside-peptide **84** convenablement obtenu sera prochainement utilisé pour tester son efficacité comparée à celle du peptide seul et déterminer si l'encombrement généré par la partie nucléoside permet ou non un accroissement de l'inhibition du processus de fibrillation. En parallèle, la solubilité du composé dans les huiles sera également évaluée. L'objectif étant d'obtenir une molécule lipophile en vue de sa formulation au sein d'une nanoémulsion huile dans l'eau, sa concentration maximale dans une phase huileuse composée d'une dispersion de lécithines dans du Miglyol® 812N sera déterminée. Bien que le peptide seul soit insoluble dans l'huile, son couplage au nucléolipide pourrait inverser cette tendance. Dans un second temps, la formulation galénique de la nanoémulsion pourra être testée.

4. Synthèse des résultats et conclusion

Afin d'inhiber la fibrillation d'A β marqueur de la maladie d'Alzheimer, nous avons développé des molécules nucléolipidiques couplées au peptide KLVFFA, connu pour être un inhibiteur efficace. Lier de manière covalente ce peptide d'intérêt à des analogues de nucléolipides devrait permettre de le formuler au sein d'une nanoémulsion et ainsi de le véhiculer à travers la barrière hémato-encéphalique jusqu'au système nerveux central. Trois molécules nucléosides-peptides ont ainsi été obtenues. Tout d'abord, un nucléoside peptide dont l'évaluation du potentiel d'inhibition de la fibrillation permettra d'étudier l'impact de la partie nucléosidique sur l'activité inhibitrice du peptide. Deux nucléolipides-peptides ont également été synthétisés afin d'obtenir des composés présentant une lipophilie accrue pour obtenir une liposolubilité suffisante et permettre leur encapsulation au sein d'une nanoémulsion lipophile dans hydrophile. Un seul de ces deux nucléolipides-peptides a pour le moment pu être isolé, celui présentant deux chaînes lipidiques engendrant des difficultés de purification.

Les évaluations biologiques *in vitro* seront réalisées prochainement afin de conclure sur l'influence de la moitié nucléosidique sur l'efficacité du peptide avant d'envisager l'étude de solubilité et d'encapsulation d'un nucléolipide-peptide au sein d'une nanoémulsion. Par ailleurs, de même que pour les nucléolipides acides dans le contexte de la maladie de Parkinson, il peut être envisager de synthétiser des objets multimériques afin d'obtenir un encombrement accru et une efficacité d'inhibition accentuée.

Conclusion et perspectives

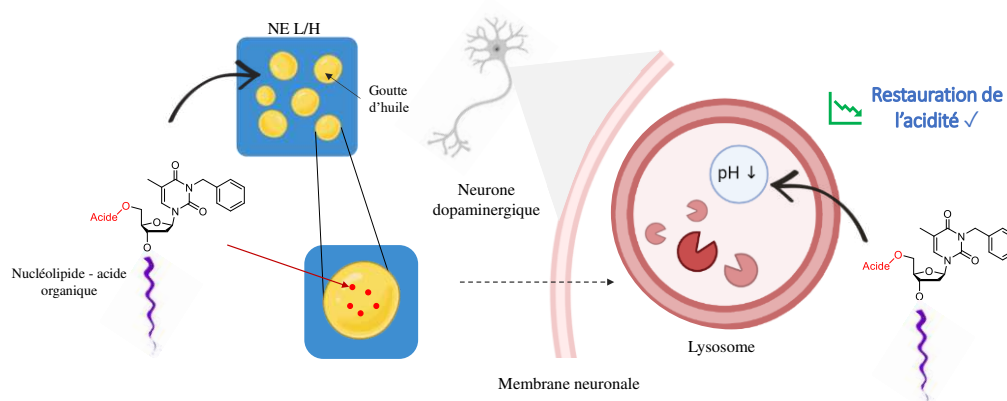
L'objectif de ce travail de thèse était de développer et synthétiser des nucléolipides amphiphiles comme plateforme modulable lipophile pour être encapsulée au sein de nanoémulsions huile-dans-eau, pour des approches thérapeutiques dans le contexte des maladies neurodégénératives.

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par la perte progressive de structure et de fonction des neurones qui est attribuée en partie à une accumulation pathologique de protéines mal repliées et non dégradées, l' α -synucléine dans le cadre de la maladie de Parkinson, les protéines A β et Tau dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Benjamin Dehay, spécialiste de la maladie de Parkinson, initiée par Sylvie Crauste-Manciet, nous nous sommes intéressés à la restauration du pH lysosomal des neurones dysfonctionnels. En effet, les lysosomes sont impliqués dans le processus de dégradation et de recyclage des constituants cellulaires et la modification de leur pH altère le fonctionnement et l'efficacité des enzymes qui participent à l'autophagie. Jusqu'à ce jour, seuls deux composés avaient été rapportés dans la littérature pour acidifier le milieu lysosomal. En s'appuyant sur des résultats antérieurs montrant la capacité de nucléolipides à être colocalisés au sein des lysosomes de cellules neuronales humaines, ce travail de thèse a porté sur la synthèse, la formulation au sein de nanoémulsion et l'évaluation *in vitro* de nucléolipides conçus comme des prodrogues et portant un acide organique biocompatible.

Conclusion et perspectives

La première partie de ce travail a porté sur la synthèse de nucléolipides fonctionnalisés avec des diacides, l'acide oxalique puis l'acide succinique. Dans le cas de l'acide succinique, l'optimisation de la longueur de chaîne du nucléolipide (C12, C16, C20) et du taux de chargement de l'émulsion (1%, 3%, 7% m/m) a permis d'obtenir un nanosystème capable de restaurer le pH lysosomal des cellules neuronales modèles de la maladie de Parkinson, sans en impacter la viabilité cellulaire.

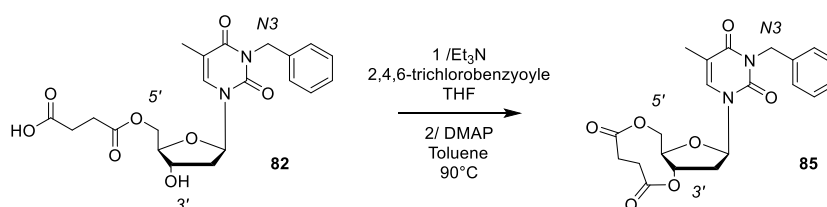


Pour obtenir une liposolubilité améliorée et donc pouvoir diminuer la quantité de molécule active dans une perspective de transférabilité, nous avons développé des objets multimériques, de type dendrimères de première génération. Outre le fait, qu'à notre connaissance, il n'y ait pas dans la littérature de dendrimères covalents de dérivés d'acides nucléiques, la seconde génération de ces composés présente un intérêt pour l'étude d'une libération prolongée potentielle des acides succiniques. Comme pour les monomères, la longueur de la chaîne carbonée du lipide a été modulée pour étudier la solubilité de l'objet au sein des nanoémulsions lipophile dans hydrophile et l'influence de cette chaîne carbonée sur la cytotoxicité. Ces composés ont permis une restauration du pH avec une concentration en substance active de $c = 10 \mu\text{M}$, quatre fois inférieure à celle du monomère efficace. A ce jour, seuls les composés portant les chaînes lipidiques en C16 et C20 ont été évalués. Les évaluations biologiques des analogues en C12 devraient être prochainement réalisées.

Le développement de composés formulables en nanoémulsions, pouvant franchir les barrières biologiques a conduit à adapter cette approche dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Le processus pathologique de la maladie implique l'agrégation de la protéine A β et de la protéine tau. Il est communément considéré que l'accumulation d'A β est à l'origine des

autres dysfonctionnements retrouvés dans les neurones atteints. Le peptide KLVFFA est connu pour être un inhibiteur efficace de la fibrillation des oligomères pathologiques. Néanmoins, son insolubilité l'empêche de franchir les membranes et d'être utilisé lors d'évaluations *in vitro* voir *in vivo*. Dans le contexte de ma thèse, le couplage de ce peptide avec un analogue nucléolipidique a été effectué pour accroître sa lipophilie, sa liposolubilité voire permettre son encapsulation au sein de nanoémulsions. Nous souhaitons également, en lien avec des données de la littérature, étudier l'effet de l'encombrement stérique, induit ici par la partie nucléosidique, sur les propriétés d'inhibition de la fibrillation. La synthèse de conjugués nucléolipides peptides originaux a été mise au point, ainsi que leur purification. Les évaluations enzymatiques devraient prochainement être réalisées avant d'envisager des évaluations *in vitro*.

Il existe pour ce travail des perspectives à plus ou moins long terme. Concernant l'approche Parkinson, il serait intéressant, dans le cadre des multimères, de déterminer si l'acidification obtenue lors des évaluations à 24h correspond à l'acidification maximale résultant du clivage des esters ou bien si les acides succiniques sont libérés en plusieurs temps laissant espérer un effet prolongé. Par ailleurs, la synthèse d'un composé cyclique **85** a été envisagée, de sorte à obtenir un monomère où la fonction acide est masquée comme dans le cas des multimères. Pour cela, la réaction suivante a été envisagée mettant en jeu les conditions décrites par Alluraiah *et al.*³⁰³

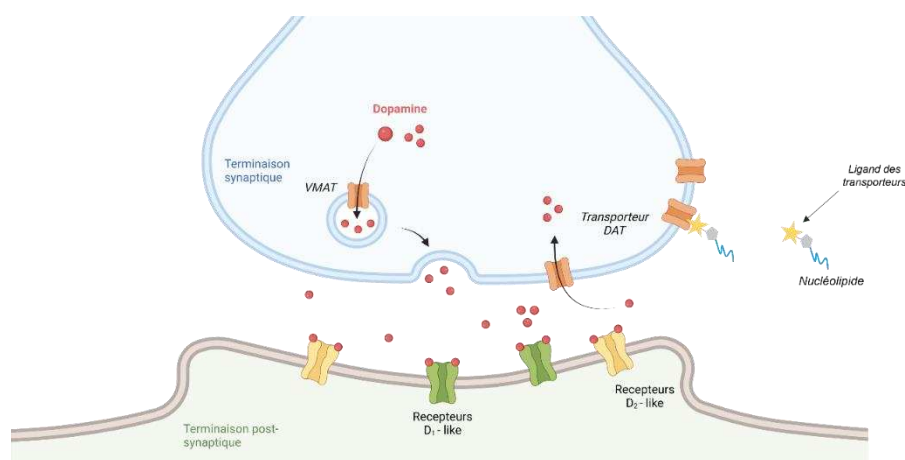


Compte tenu des résultats prometteurs résultants des évaluations *in vitro* des monomères et multimères acides, la perspective évidente serait une évaluation *in vivo*. Pour cela, le ciblage des neurones dopaminergiques ferait particulièrement sens et dans ce but, une collaboration avec le Dr. Jean Dessolin, chimiste spécialiste en modélisation à l'institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) de Bordeaux, a été initiée. Le travail a consisté à faire un criblage virtuel de chimiothèques 3D afin d'identifier des ligands potentiels du transporteur de dopamine (DAT) humain nommé "récepteur" DAT pour cette recherche. La

³⁰³ Alluraiah, G., Sreenivasulu, R., Sadanandam, P., Anitha, K., Raju, R. R. *Monatsh Chem.* **2016**, 174, 451-455.

Conclusion et perspectives

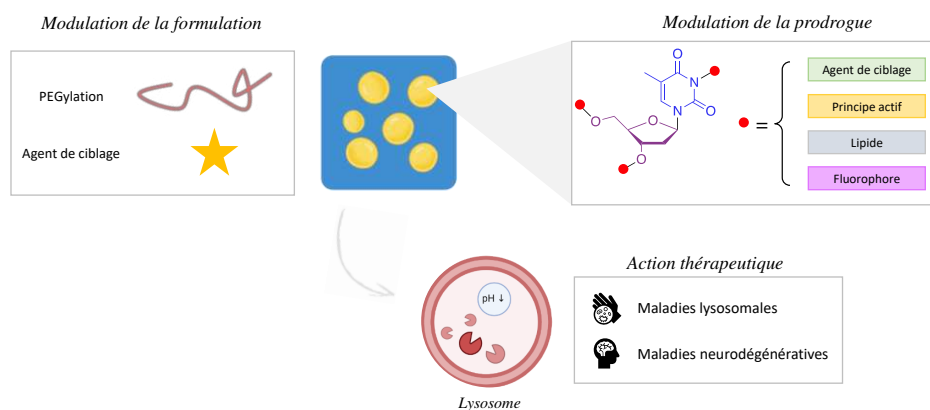
méthode utilisée est uniquement le docking moléculaire qui simule le positionnement dans la cible d'un ligand putatif, issu de chimiothèques, puis mesure l'énergie du complexe obtenu par le biais de logiciel(s). Cette étude a conduit à une librairie de 153 composés qui constitueraient de bons ligands classés en fonction de leur affinité pour la protéine-récepteur. Il sera nécessaire de trier ces molécules en fonction de leur structure chimique pour isoler celles qui seraient susceptibles de fonctionnaliser notre plateforme NL. La possibilité d'avoir un ligand qui constituerait un agent de ciblage des transporteurs membranaires d'intérêt ouvre la perspective de pouvoir véhiculer spécifiquement nos prodrogues jusqu'à la cible thérapeutique.



Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, il reste à conforter notre approche avec des résultats concernant l'inhibition de la fibrillation. Dans le cas où les hybrides NL-KLVFFA présenteraient un intérêt, le développement de composés multimériques pourrait être intéressante. L'obtention de composés encombrants pourrait notamment accroître l'efficacité d'inhibition de fibrillation.

La restauration des systèmes de dégradation des composants cellulaires, et notamment de certaines protéines, sont des stratégies thérapeutiques prometteuses pour lutter contre la neurodégénérescence. Par ailleurs, atteindre le système nerveux central reste l'obstacle majoritaire dans le développement de telles stratégies en raison de l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique. Nos nucléolipides ont pu être encapsulés au sein de nanosystèmes permettant leur protection et leur transport à travers les membranes biologiques donc potentiellement à travers la barrière hémato-encéphalique. Conçus comme des plateformes modulables, ils offrent la possibilité d'introduire des substances actives variées pour le développement de stratégies dans le contexte d'autres maladies neurodégénératives ou de

maladies lysosomales. De nombreuses possibilités sont ainsi envisageables comme le couplage d'une substance active antioxydante, la synthèse de composés "multi-actions" combinant plusieurs substances actives à la fois (une molécule antioxydante et un acide organique par exemple). De façon simple, une modification de la substance active de la prodrogue peut être envisagée pour augmenter un pH lysosomal qui serait trop acide, comme cela peut être le cas dans certains cancers.



Experimental procedures

General information

Organic Synthesis

The chemicals were purchased from Sigma Aldrich and Acros Organics, and all were used as received unless otherwise precised. A CEM focused microwaveTM synthesis system, Discover[®]SP was used for microwave-assisted synthesis. Thin-layer chromatographies were performed over silica gel 60 F254 (Merck) with short-wavelength UV light for visualization. Silica Gel 60 (particle size 63–200 μm , purchased from Merck) was used for column chromatography. FT-IR spectra were recorded on a total reflectance spectrometer attenuated (ATR) PerkinElmer FT spectrometer Spectrum two. ^1H and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker Avance 300 MHz spectrometer (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75.5 MHz). Analyses were acquired using CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm) as internal reference and at 293K unless otherwise indicated. The chemical shift values are expressed in ppm and coupling constants (J) in Hz. Abbreviations were used to describe multiplicities: s = singlet, brs = broad singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, dd = doublet doublet, ddd = doublet doublet doublet, m = multiplet. The DLS analyses were recorded from Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). All organic synthesis reactions were carried out using anhydrous solvents and under argon atmosphere (except for APTS deprotections).

Peptidic Synthesis

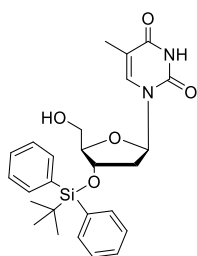
For peptide synthesis, protected amino-acids were purchased from Activotec or Novabiochem (Sigma-Aldrich). PyBOP were obtained from Calbiochem-Novabiochem and 2-chlorotriylchloride resin from Advances ChemTech Europe. RP-HPLC analyses and purifications were performed on Gilson equipment.

Nucleolipid-peptide click reactions were performed on a Biotage[®] Initiator+ SP Wave. Nucleolipid-peptide was analysed and purified on a semi-preparative column Supelco Discovery Bio Wide Pore C_5 particles, 25 cm x 10 mm, 10 μm operated at $\text{mL}\cdot\text{mn}^{-1}$ with linear gradient program 22 minutes run time (0% B for 3 min, 0 to 100% B in 15 min, 100% B for 2 min and 100 to 0% B in 2 min). Nucleoside-peptide click reactions was performed on a CEM focused microwave TM synthesis system, Discover[®]SP. Nucleoside-peptide was analysed on C_{18} particles, 25 cm x 4.0 mm, 5 μm operated at 1 $\text{mL}\cdot\text{mn}^{-1}$ with linear gradient program 15

Experimental procedures

minutes run time (0% to 100% B in 15 min, 100% B for 2 min and 100 to 0% B in 2 min). Nucleoside-peptide was purified on C₁₈ particles, 25 cm x 20 mm, 5 μm operated at 10 mL.min⁻¹ with linear gradient program minutes run time (0 to 100% B in 60 min, 100% B for 10 min and 100 to 0% B in 5 min). All RP-HPLC were monitored by UV at 214 nm and 260 nm. Solvent A consisted of H₂O, 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN, 0.1% TFA.

Compound 7



Molecular Weight: 480,63600

Crude 5'-TBDMS, 3'-TBDPS thymidine (5.33 g, 14 mmol) was dissolved in MeOH (46 mL) *p*-Toluenesulfonic acid monohydrate (0.54 g, 29 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before being concentrated under reduced pressure, diluted in EtOAc, washed with NaHCO₃ (3x50 mL) and NaCl (3x50 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and filtered. Concentration under reduced pressure afforded the crude product which was then purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to give the product (2.09 g, **31%**).

R_f = 0.7 (Pentane/EtOAc: 70/30);

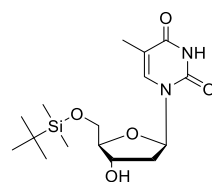
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3420, 3181, 3071, 2933, 2859, 2251, 1681, 1591, 1471, 1428, 1365, 1322, 1274, 1198, 1132, 1103, 1060, 1031, 1010, 957, 908, 822, 777, 729, 701, 646, 609, 559, 506, 488, 419;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.44 - 9.22 (m, 1H, NH), 7.70 - 7.59 (m, 4H, H_{Ar}), 7.50 - 7.34 (m, 6H, H_{Ar}), 7.34 - 7.29 (m, 1H, H₆), 6.26 (appearing t, *J* = 7.2, 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 4.49 - 4.40 (m, 1H, H_{4'}), 4.02 - 3.94 (m, 1H, H_{3'}), 3.62 (dd, *J* = 2.1, 12.0 Hz, 1H, H_{5'}b), 3.24 (dd, *J* = 2.7, 12.0 Hz, 1H, H_{5'}a), 2.50 - 2.32 (brs, 1H, OH), 2.26 (ddd, *J* = 3.0, 6.0 Hz, 13.5 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.21 - 2.07 (m, 1H, H_{2'}a), 1.82 (brs, 3H, H₇), 1.08 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.2 (C₄), 150.6 (C₂), 137.0 (C_{Ar}), 135.8 (C₆), 133.3 (C_{Ar}), 133.2 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 111.0 (C₅), 87.8 (C_{4'}), 86.7 (C_{1'}), 73.1 (C_{3'}), 62.0 (C_{5'}), 40.3 (C_{2'}), 27.0 (CH₃ *t*-Bu), 19.1 (C_q *t*-Bu), 12.5 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₆H₃₂N₂O₅SiNa [M+H]⁺ 481.20805, found 481.21533.

Compound 10



Molecular Weight: 356,49400

Thymidine (3.5 g, 14 mmol) was dissolved in pyridine (100 mL) under argon atmosphere, before *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (2.58 g, 17 mmol) and a spatula tip of 4-(Dimethylamino)pyridine addition. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before being quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ (3x100 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and filtered. Concentration under reduced pressure afforded the crude product which was then purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to give product **10** as a white foam (3.80 g, **76%**).

R_f = 0.4 (Pentane/EtOAc: 70/30);

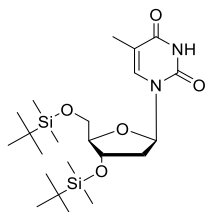
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3547, 3174, 3059, 2953, 2930, 2898, 2857, 1697, 1664, 1471, 1434, 1392, 1362, 1314, 1290, 1256, 1206, 1119, 1061, 1003, 942, 908, 888, 831, 778, 734, 672, 644, 611, 556, 494, 425;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.32 (m, 1H, NH), 7.50 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₆), 6.36 (dd, *J* = 5.7, 8.1 Hz, 1H, H_{1'}), 4.51 - 4.44 (m, 1H, H_{3'}), 4.03 (dd, *J* = 2.7, 5.1 Hz, 1H, H_{3'}), 3.90 (dd, *J* = 3.0, 11.4 Hz, 1H, H_{5'-b}), 3.83 (dd, *J* = 2.7, 11.4 Hz, 1H, H_{5'-a}), 2.35 (ddd, *J* = 2.4, 5.7, 13.5 Hz, 1H, H_{2'-b}), 2.17 - 2.04 (m, 1H, H_{2'-a}), 1.92 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, H₇), 1.61 (brs, 1H, OH), 0.92 (m, 9H, CH₃ *t*-Bu), 0.12 (s, 3H, Si-CH₃), 0.11 (s, 3H, Si-CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.2 (C₄), 150.8 (C₂), 135.7 (C₆), 111.1 (C₅), 87.5 (C_{4'}), 85.2 (C_{1'}), 72.2 (C_{3'}), 63.8 (C_{5'}), 41.2 (C_{2'}), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 18.5 (C_q *t*-Bu), 12.7 (C₇), -5.3 (Si-CH₃), -5.3 (Si-CH₃);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₆H₂₈N₂O₅SiNa [M+H]⁺ 357.17675, found 357.18402.

Compound 17, step 1



Molecular Weight: 470,75700

Thymidine (2.42 g, 10 mmol) was dissolved in DMF (75 mL) under argon atmosphere, before imidazole (4.08 g, 60 mmol) and *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (4.52 g, 30 mmol) addition. The reaction mixture was stirred overnight at 35°C before being quenched with methanol, diluted in EtOAc, washed with water, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and brine. The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and filtered. Concentration under reduced pressure afforded the crude product which was then purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to give the product as a white powder (4.53 g, **99%**).

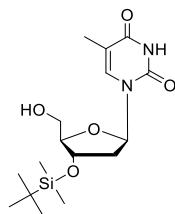
R_f = 0.7 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 10.22 (s, 1H, NH), 7.40 (s, 1H, H₆), 6.27 (appearing t, *J* = 6.3, 7.2 Hz, 1H, H_{1'}), 4.37 - 4.29 (m, 1H, H_{3'}), 3.88 - 3.64 (m, 3H, H_{4'} and H_{5'}), 2.18 (ddd, *J* = 2.7, 6.0, 13.2 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.00 - 1.87 (m, 1H, H_{2'}a), 1.83 (s, 3H, H₇), 0.84 (s, 9H, *t*-Bu), 0.81 (s, 9H, *t*-Bu), 0.07 - 0.01 (m, 6H, Si - CH₃), 0.01 - -0.06 (m, 6H, Si - CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.4 (C₄), 150.6 (C₂), 135.3 (C₆), 110.7 (C₅), 87.6 (C_{4'}), 84.7 (C_{1'}), 72.1 (C_{3'}), 62.8 (C_{5'}), 41.3 (C_{2'}), 25.8 (CH₃ *t*-Bu), 25.7 (CH₃ *t*-Bu), 18.3 (C_q *t*-Bu), 17.9 (C_q *t*-Bu), 12.4 (C₇), -4.8 (Si-CH₃), -5.0 (Si-CH₃), -5.5 (Si-CH₃), -5.6 (Si-CH₃);

Analysis in agreement with the literature.

Compound 17, step 2



Molecular Weight: 356,49400

Bis-silylated thymidine (3.5 g, 7.7 mmol) was dissolved in MeOH (51 mL) before Hafnium(IV) trifluoromethanesulfonate hydrate (30 mg, 0.038 mmol) addition. The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 hours before being quenched with an excess of triethylamine and concentrated under reduced pressure affording the crude product which was then purified by flash chromatography over silica gel (Petroleum benzene/EtOAc: 40/60) to give compound **17** (2.3 g, **84%**).

R_f = 0.8 (Pentane/EtOAc: 50/50);

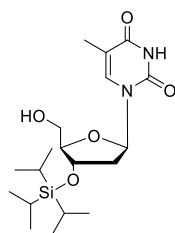
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 2932, 2860, 2254, 1685, 1471, 1365, 1258, 1200, 1133, 1099, 1060, 1033, 905, 835, 780, 724, 649, 558, 489, 420;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9.94 (s, 1H, NH), 7.47 (s, 1H, H₆), 6.16 (appearing t, J = 6.3, 12.9 Hz, 1H, C_{1'}), 4.53 - 4.38 (m, 1H, H_{3'}), 3.95 - 3.61 (m, 3H, H_{4'} + H_{5'}b), 3.61 - 3.39 (m, 1H, H_{5'}a), 2.37 - 2.09 (m, 2H, H_{2'}), 1.82 (s, 3H, H₇), 0.99 - 0.67 (m, 9H, *t*-Bu), 0.03 (s, 3H, Si - CH₃), 0.03 (s, 3H, Si - CH₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 164.5 (C₄), 150.7 (C₂), 137.1 (C₆), 110.8 (C₅), 87.7 (C_{4'}), 86.2 (C_{1'}), 71.6 (C_{3'}), 61.7 (C_{5'}), 40.7 (C_{2'}), 25.7 (CH₃ *t*-Bu), 17.9 (C_q *t*-Bu), 12.5 (C₇), -4.7 (Si-CH₃), -4.9 (Si-CH₃);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₆H₂₈N₂O₅SiNa [M+H]⁺ 357.17675, found 357.18522.

Compound 18



Molecular Weight: 398,57500

Compound **19** (5.18 g, 15 mmol) was dissolved in DMF (54 mL) under argon atmosphere, before triisopropylsilyl chloride (6.23 mL, 29 mmol) and imidazole (1.98 g, 29 mmol) addition. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before being extracted with CH_2Cl_2 (3x50 mL) and HCl 1M. The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and filtered. Concentration under reduced pressure afforded the crude product which was not purified at this step.

The crude product was then dissolved in MeOH (46 mL) before APTS. $5\text{H}_2\text{O}$ (0.54 g, 29 mmol) addition. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before being concentrated under reduced pressure. The product was then diluted in EtOAc and extracted with NaHCO_3 (3x50 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and filtered. Concentration under reduced pressure afforded the crude product which was then purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to give compound **18** (2.07 g, **35%**).

R_f = 0.6 (Pentane/EtOAc: 30/70);

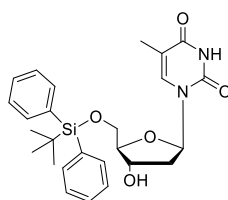
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3420, 3181, 3071, 2933, 2859, 2251, 1681, 1591, 1471, 1428, 1365, 1322, 1274, 1198, 1132, 1103, 1060, 1031, 1010, 957, 908, 822, 777, 729, 701, 646, 609, 559, 506, 488, 419;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9.58 (s, 1H, NH), 7.43 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H₆), 6.17 (dd, $J = 6.3, 7.5$ Hz, 1H, H_{1'}), 4.63 - 4.52 (m, 1H, H_{3'}), 4.01 - 3.95 (m, 1H, H_{4'}), 3.90 (dd, $J = 2.4, 12.3$ Hz, 1H, H_{5'-b}), 3.75 (dd, $J = 2.7, 12.0$ Hz, 1H, H_{5'-a}), 3.22 (m, 1H, OH), 2.41 - 2.28 (m, 1H, H_{2'-b}), 2.22 (ddd, $J = 2.7, 6.0, 12.9$ Hz, 1H, H_{2'-a}), 1.86 (d, $J = 0.6$ Hz, 3H, H₇), 1.10 - 0.94 (m, 18H, (*i*-Pr)₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 164.3 (C₄), 150.6 (C₂), 137.3 (C₆), 111.0 (C₅), 88.3 (C_{4'}), 87.0 (C_{1'}), 72.4 (C_{3'}), 62.4 (C_{5'}), 41.0 (C_{2'}), 17.5 (C_q), 12.5 (CH₃ (*i*-Pr)₃), 12.1 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺ 399.22370, found 399.23098.

Compound 19



Molecular Weight: 480,63600

This compound was obtained after the purification of the crude product afforded from the migration test.

R_f = 0.6 (Pentane/EtOAc : 70/30);

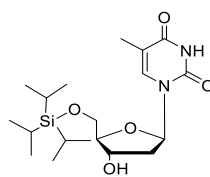
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3394, 3059, 2940, 2863, 1822, 1681, 1468, 1429, 1272, 1196, 1107, 1009, 950, 823, 702, 607, 499, 424;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.68 (s, 1H, NH), 7.69 - 7.62 (m, 4H, H_{Ar}), 7.51 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H₆), 7.48 - 7.34 (m, 6H, H_{Ar}), 6.45 (dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz, 1H, H_{1'}), 4.57 (brs, 1H, OH), 4.08 - 4.03 (m, 1H, H_{4'}), 3.98 (dd, *J* = 2.4, 11.4 Hz, 1H, H_{5'b}), 3.85 (dd, *J* = 2.4, 11.4 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.36 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H_{3'}), 2.45 (ddd, *J* = 2.1, 5.4, 13.5 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.29 (brs, 1H, OH), 2.26 - 2.12 (m, 1H, H_{2'a}), 1.60 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇), 1.11 - 1.03 (m, 9H, CH₃ *t*-Bu);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.2 (C₄), 150.8 (C₂), 135.5 (C₆), 135.4 (C_{Ar}), 133.0 (C_{Ar}), 132.4 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 111.4 (C_{Ar}), 87.4 (C_{4'}), 84.9 (C_{1'}), 72.4 (C_{3'}), 64.3 (C_{5'}), 41.1 (C_{2'}), 27.1 (CH₃ *t*-Bu), 27.1 (CH₃ *t*-Bu), 27.1 (CH₃ *t*-Bu), 19.5 (C_q *t*-Bu), 12.2 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₆H₃₂N₂O₅SiNa [M+H]⁺ 481.20805, found 481.21721.

Compound 20



Molecular Weight: 398,57500

This compound was obtained after the purification of the crude product afforded from the migration test.

R_f = 0.5 (Pentane/EtOAc: 30/70);

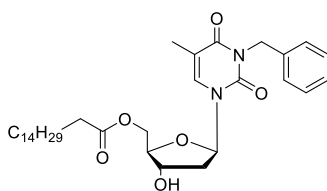
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3418, 3181, 3059, 2943, 2867, 2251, 1882, 1666, 1467, 1384, 1367, 1316, 1273, 1199, 1125, 1094, 1058, 1002, 960, 939, 909, 882, 799, 778, 731, 682, 648, 608, 558, 493, 463, 419;

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.56 (m, 1H, NH), 7.36 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H_6), 6.13 (dd, J = 6.3, 7.8 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.63 - 4.57 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.04 - 3.99 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.92 (dd, J = 2.4, 12.0, 1H, $H_{5'}$ -b), 3.78 (dd, J = 2.7, 12.0 Hz, 1H, $H_{5'}$ -a), 2.48 - 2.36 (m, 1H, $H_{2'}$ -b), 2.24 (ddd, J = 2.7, 6.0, 12.9 Hz, 1H, $H_{2'}$ -a), 1.91 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H_7), 1.09 - 1.01 (m, 18H, (*i*-Pr) $_3$);

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.2 (C_4), 150.8 (C_2), 135.6 (C_6), 111.1 (C_5), 87.4 ($C_{4'}$), 85.0 ($C_{1'}$), 72.3 ($C_{3'}$), 63.8 ($C_{5'}$), 41.2 ($C_{2'}$), 18.1 (C_q (*i*-Pr) $_3$), 12.5 (CH_3 (*i*-Pr) $_3$), 11.9 (C_7);

HRMS (ESI): Calcd. for $C_{19}H_{34}N_2O_5SiNa$ [$M+H$] $^+$ 399.22370, found 399.23098.

Compound 22



In a vial, to a solution of compound **21** (1 eq., 150 mg, 0.26 mmol) in anhydrous DMF (1.5 ml) and under argon atmosphere, NaH (1 eq., 27 mg) was added before a microwave activation (4 min, 40°C, 200W). The reaction was quenched with NH₄Cl. The crude product. The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 × 5 ml), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc : 60/40).

R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc : 60/40);

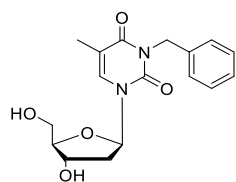
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3443, 2924, 2857, 2252, 1964, 1829, 1643, 1574, 1455, 1354, 1266, 1174, 1090, 1008, 912, 728, 629, 582, 528;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.49-7.41 (m, 2H, HAr), 7.32-7.19 (m, 4H, H6 and HAr), 6.30 (appearing t, 1H, H1'), 5.18-5.02 (m, 2H, H8), 4.42-4.21 (m, 3H, H5' and H3'), 4.13-4.07 (m, 1H, H4'), 2.66 (brs, 1H, OH), 2.45-2.28 (m, 3H, H2'b and Hα), 2.16-2.02 (m, 1H2'a), 1.94 (s, 3H, H7), 1.69-1.54 (m, 2H, Hβ), 1.36-1.16 (m, 26H, C aliphatic), 0.93-0.81 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7 (CO), 163.4 (C4), 151.0 (C2), 136.8 (CAr), 133.3 (C6), 129.2 (CAr), 128.5 (CAr), 127.8 (CAr), 110.5 (CAr), 85.7(C1'), 84.3 (C4'), 71.5 (C3'), 63.6 (C5'), 44.6 (C8), 40.7 (C2'), 34.3 (C aliphatic), 32.0 (Cα), 29.8 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 25.0 (Cβ), 22.8 (C aliphatic), 14.3 (CH₃ aliphatic), 13.6 (C7);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₃H₅₀N₂O₆ [M+H]⁺ 571.37417, found 571.37402.

Compound 28



Molecular Weight: 332.35600

In a vial, to a solution of thymidine (1 eq., 1 g, 4.13 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) and under argon atmosphere, NaH (60%) (1 eq., 0.166 g, 4.13 mmol) was added before a microwave activation (6 min, 40°C, 200 W). Then, benzyle bromide (1 eq., 490 μ L, 4.13 mmol) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). DMF was then evaporated with toluene, without any further treatment. The reaction was repeated three times and the crudes were collected and purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to afford compound **28** as an expended solid (3.96 g, **96 %**).

Rf = 0.3 (DCM/MeOH: 95/5);

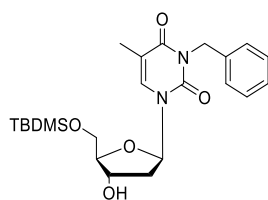
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3410, 2924, 2861, 1947, 1650, 1563, 1392, 1256, 1095, 655, 488;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.86 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H_6), 7.38 - 7.17 (m, 5H, H_{Ar}), 6.31 (appearing t, J = 6.9, 13.5 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.08 (brs, 2H, H_8), 4.43 - 4.35 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.94 - 3.87 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.76 (ddd, J = 2.7, 11.4, 23.1 Hz, 2H, $\text{H}_{5'}$), 2.32 - 2.13 (m, 2H, H_2), 1.91 (s, 3H, H_7);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 165.3 (C_4), 152.4 (C_2), 138.3 ($\text{C}_{\text{q Ar}}$), 136.6 (C_6), 129.4 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 110.7 (C_5), 88.9 ($\text{C}_{1'}$), 87.1 ($\text{C}_{4'}$), 72.0 ($\text{C}_{3'}$), 62.7 ($\text{C}_{5'}$), 45.3 (C_8), 41.3 ($\text{C}_{2'}$), 13.2 (C_7);

HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 333.13722, found 333.14470.

Compound 11



Molecular Weight: 446,61900

To a solution of compound **28** (1 eq., 3.18 g, 9.53 mmol) into dry pyridine (65 mL), were added under argon *t*-Butyldimethylsilyl chloride (1.2 eq., 1.73 g, 11.2 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 116 mg, 0.953 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 × 30 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 90/10) to afford compound **11** as an expended solid (1.78 g, **89 %**).

Rf = 0.1 (Pentane/EtOAc: 90/10);

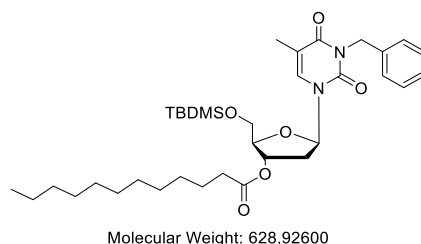
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3439, 2938, 2249, 1966, 1822, 1781, 1639, 1454, 1354, 1098, 920, 728;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54–7.45 (m, 3H, H₆ + H_{Ar}), 7.34–7.22 (m, 3H, H_{Ar}), 6.41 (dd, *J* = 5.7, 7.8 Hz, 1H, H_{1'}), 5.17–5.10 (brs, 2H, H₈), 4.50–4.42 (m, 1H, H_{4'}), 4.06–3.99 (m, 1H, H_{3'}), 3.90 (dd, *J* = 2.7, 11.4 Hz, 1H, H_{5'}), 3.82 (dd, *J* = 2.7, 11.4 Hz, 1H, H_{5'}), 2.38 (ddd, *J* = 2.4, 5.7, 13.2 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.16–2.04 (m, 1H, H_{2'}a), 1.95 (s, 3H, H₇), 0.93 (s, 9H, *t*-Bu), 0.13 (s, 3H, Si-CH₃), 0.12 (s, 3H, Si-CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.6 (C₄), 151.1 (C₂), 137.0 (C_{Ar}), 133.7 (C₆), 129.2 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 110.3 (C₅), 87.0 (C_{4'}), 85.7 (C_{1'}), 72.6 (C_{3'}), 63.6 (C_{5'}), 44.6 (C₈), 41.4 (C_{2'}), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 18.5 (C_q), 13.5 (C₇), -5.3 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃).

Analytical data are consistent with literature¹⁸³.

Compound 29



To a solution of compound **11** (1 eq., 1.5 g, 3.36 mmol) into dry DCM (20 mL), were added under argon the lauric acid (1.5 eq., 1.01 g, 5.04 mmol) the EDC.HCl (1.5 eq., 0.96 g, 5.04 mmol) and the DMAP (0.7 eq., 0.52 g, 2.35 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (20 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30 to provide compound **29** as a white foam (1.55 g, **73%**).

R_f = 0.9 (Pentane/EtOAc: 70/30);

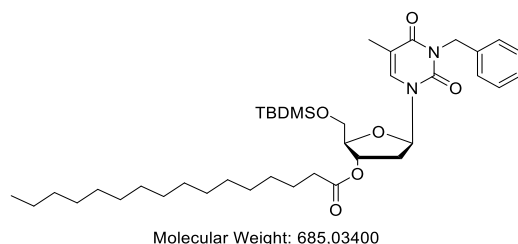
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3325, 2965, 2694, 1978, 1738, 1635, 1562, 1492, 1380, 1168, 1066, 994;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.53 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H₆), 7.52 - 7.45 (m, 2H, H_{Ar}), 7.32 - 7.21 (m, 3H, H_{Ar}), 6.40 (dd, *J* = 5.1, 9.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.27 - 5.21 (m, 1H, H_{3'}), 5.17 - 5.06 (m, 2H, H₈), 4.09 - 4.04 (m, 1H, H_{4'}), 3.95 - 3.85 (m, 2H, H_{5'}), 2.39 (dd, *J* = 5.4, 13.8 Hz, 1H, H_{2'} b), 2.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_a), 2.15 - 2.00 (m, 1H, H_{2'} a), 1.94 (s, 3H, H₇), 1.68 - 1.55 (m, 2H, H_B), 1.36 - 1.22 (m, 18H, CH₂ - aliphatic), 0.96 - 0.82 (m, 12H, CH₃ *t*-Bu + CH₃ term), 0.12 (s, 3H, Si - CH₃), 0.12 (s, 3H, Si - CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.4 (CO ester), 163.2 (C₄), 150.9 (C₂), 136.9 (C₆), 133.1 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 110.3 (C₅), 85.4 (C_{1'}), 75.1 (C_{3'}), 63.5 (C_{5'}), 44.4 (C₈), 38.0 (C_{2'}), 34.1 (C_a), 31.8 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 29.0 (C aliphatic), 25.9 (CH₃ - *t*-Bu), 25.9 (C_B), 24.7 (C aliphatic), 22.6 (C aliphatic), 18.2 (C_q *t*-Bu), 14.1 (C aliphatic), 13.2 (C₇), -5.5 (Si-CH₃), -5.6 (Si - CH₃);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₅H₅₆N₂O₆Si [M+H]⁺ 629.39076, found 629.39866.

Compound 30



To a solution of compound **11** (1 eq., 0.718 g, 1.82 mmol) into dry DCM (10 mL), were added under argon the palmitic acid (1.2 eq., 0.560 g, 2.18 mmol) the EDC.HCl (1.2 eq., 0.419 g, 2.18 mmol) and the DMAP (0.5 eq., 0.111 g, 0.90 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (10 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **30** as a white foam (1.19 g, **quantitative yield**).

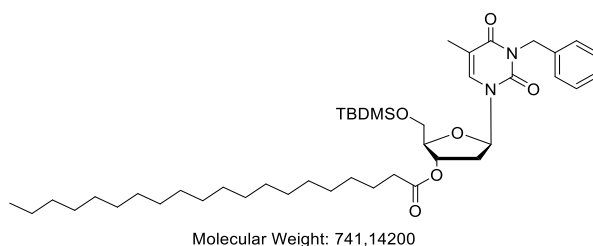
R_f = 0.9 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₆), 7.52 - 7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.35 - 7.22 (m, 3H, H_{Ar}), 6.42 (dd, *J* = 5.1, 9.3 Hz, 1H, H_{1'}), 5.30 - 5.23 (m, 1H, H_{3'}), 5.19 - 5.09 (m, 2H, H₈), 4.10 - 4.05 (m, 1H; H_{4'}), 3.98 - 3.86 (m, 2H, H_{5'}), 2.40 (dd, *J* = 5.4, 13.8 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_α), 2.17 - 2.07 (m, 1H, H_{2'}a), 1.96 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇), 1.70 - 1.57 (m, 2H, H_β), 1.38 - 1.21 (m, 26H, H - aliphatic), 0.94 (s, 9H, *t*-Bu), 0.98 - 0.85 (m, 3H, CH₃ aliphatic), 0.14 (s, 3H, Si-CH₃), 0.14 (s, 3H, Si-CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.6 (C_{ester}), 163.4 (C₄), 151.1 (C₂), 137.0 (C₆), 133.3 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 110.5 (C₅), 85.5 (C_{1'}), 75.3 (C_{3'}), 63.7 (C_{5'}), 44.6 (C₈), 38.1 (C_{2'}), 34.3 (C_α), 32.0 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 24.9 (C_β), 22.8 (C aliphatic), 18.4 (C aliphatic), 14.2 (C aliphatic), 13.3 (C aliphatic), -5.3 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃).

Analytical data are consistent with literature¹⁸³.

Compound 31



To a solution of compound **11** (1 eq., 2.1 g, 5.3 mmol) into dry DCM (30 mL), were added under argon the arachidic acid (1.5 eq., 2.5, 8.0 mmol) the EDC.HCl (1.5 eq., 1.53 g, 8.0 mmol) and the DMAP (0.7 eq., 0.46 g, 3.7 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide **31** as a white foam (3.64 g, **quantitative yield**).

R_f = 0.9 (Pentane/EtOAc: 70/30);

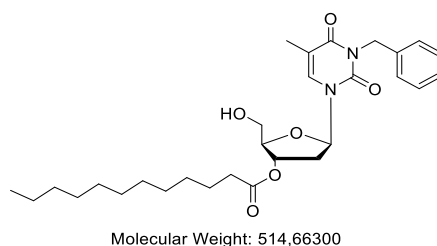
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2926, 2855, 2254, 1736, 1703, 1668, 1645, 1496, 1464, 1404, 1352, 1321, 1294, 1259, 1166, 1126, 1079, 1004, 903, 833, 780, 701, 648, 616, 536, 495, 465;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.55 - 7.74 (m, 3H, H₆ + H_{Ar}), 7.36 - 7.22 (m, 3H, H_{Ar}), 6.42 (dd, *J* = 5.1, 9.3 Hz, 1H, H_{1'}), 5.29 - 5.23 (m, 1H, H_{3'}), 5.21 - 5.08 (m, 2H, H₈), 4.11 - 4.06 (m, 1H, H_{4'}), 3.98 - 3.86 (m, 2H, H_{5'}), 2.41 (dd, *J* = 5.4, 13.8 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_α), 2.18 - 2.03 (m, 1H, H_{2'a}), 1.96 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇), 1.71 - 1.57 (m, 2H, H_β), 1.39 - 1.22 (m, 34H, CH₂ aliphatic), 0.94 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu), 0.97- 0.85 (m, 3H, CH₃ aliphatic), 0.14 (s, 3H, Si-CH₃), 0.14 (s, 3H, Si-CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.6 (CO_{ester 3'}), 163.5 (C₄), 151.1 (C₂), 137.0 (C₆), 133.3 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.6 (C₅), 85.5 (C_{4'}), 75.3 (C_{3'}), 63.7 (C_{5'}), 44.6 (C₈), 38.1 (C_{2'}), 34.3 (C_α), 34.0 (C_β), 32.0 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 24.9 (C aliphatic), 22.8 (C aliphatic), 18.4 (C_q *t*-Bu), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.4 (C₇), -5.3 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃);

HRMS (ESI): Calcd. for C₄₃H₇₂N₂O₆Si [M+H]⁺ 741.51596, found 741.52431.

Compound 32



To a solution of compound **29** (1 eq., 1.55 g, 2.46 mmol) into dry THF (28 mL), was added at 0°C, under argon the TBAF (1 eq., 0.710 mL, 2.46 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3h, before being quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **32** as a white foam (1.27 g, **90%**).

R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30);

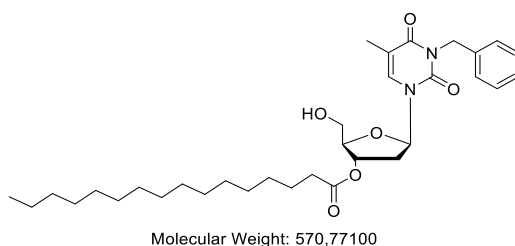
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3361, 2926, 2859, 1931, 1649, 1457, 1359, 1170, 1104, 704;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.68 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, H₆), 7.45 - 7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27 - 7.14 (m, 3H, H_{Ar}), 6.32 (*appearing t*, *J* = 8.1, 6.3 Hz, 1H, H_{1'}), 5.34 - 5.28 (m, 1H, H_{3'}), 5.11 - 5.05 (m, 2H, H₈), 4.05 - 4.00 (m, 1H, H_{4'}), 3.85 - 3.74 (m, 2H, H_{5'}), 2.36 - 2.24 (m, 4H, H_{2'} + H_α), 1.85 (brs, 3H, H₇), 1.66 - 1.52 (m, 2H, H_β), 1.35 - 1.17 (m, 18H, H - aliphatic), 0.91 - 0.80 (m, 3H, CH₃ - aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.3 (CO ester), 163.4 (C₄), 150.8 (C₂), 136.5 (C_{Ar}), 134.5 (C₆), 128.7 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 110.1 (C₅), 86.0 (C_{1'}), 85.1 (C_{4'}), 74.7 (C_{3'}), 62.2 (C_{5'}), 44.3 (C₈), 37.5 (C_{2'}), 34.0 (C_α), 31.7 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 28.9 (C aliphatic), 24.6 (C_β), 22.5 (C aliphatic), 13.9 (C aliphatic), 13.1 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₉H₄₂N₂O₆ [M+H]⁺ 515.30429, found 515.31170.

Compound 21



To a solution of compound **30** (1 eq., 1.39 g, 2.03 mmol) into dry THF (20 mL), was added at 0°C, under argon the TBAF (1.2 eq., 0.590 mL, 2.03 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3h, before being quenched with water (20 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **21** as a white foam (0.821 g, **71%**).

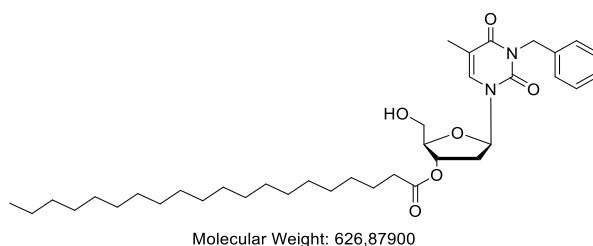
R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.59 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₆), 7.50 - 7.44 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33 - 7.21 (m, 3H, H_{Ar}), 6.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{1'}), 5.37 - 5.31 (m, 1H, H_{3'}), 5.18 - 5.07 (m, 2H, H₈), 4.09 - 4.04 (m, 1H, H_{4'}), 3.94 - 3.83 (m, 2H, H_{5'}), 3.04 (brs, 1H, OH), 2.41 - 2.28 (m, 4H, H_{2'} + H_β), 1.92 (d, *J* = 0.6 Hz, 3H, H₇), 1.69 - 1.54 (m, 2H, H_α), 1.40 - 1.15 (m, 26H, CH₂ aliphatic), 0.94 - 0.85 (m, 3H, CH₃ aliphatic).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7 (CO ester), 163.5 (C₄), 151.1 (C₂), 136.8 (C_{Ar}), 134.5 (C₆), 129.2 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.7 (C₅), 86.6 (C_{1'}), 85.2 (C_{4'}), 74.7 (C_{3'}), 62.7 (C_{5'}), 44.6 (C₈), 37.4 (C_{2'}), 34.2 (C_α), 32.1 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 24.9 (C_β), 22.8 (C aliphatic), 14.2 (C aliphatic), 13.5 (C₇).

Analytical data are consistent with literature¹⁸³.

Compound 33



To a solution of compound **31** (1 eq., 1.28 g, 1.73 mmol) into dry THF (19 mL), was added at 0°C, under argon the TBAF (1.2 eq., 0.50 mL, 1.90 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3h, before being quenched with water (20 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **33** as a white foam (720 mg, **70%**).

R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 7/3);

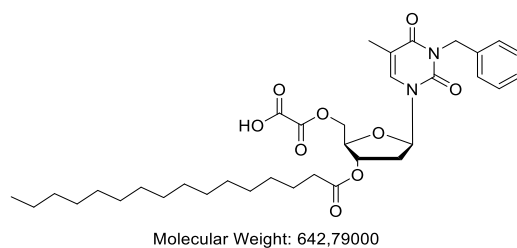
IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3403, 2918, 2852, 2057, 1987, 1938, 1832, 1786, 1711, 1635, 1461, 1358, 1235, 1170, 1096, 992, 928, 718, 615, 536, 448, 432, 407;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.67 - 7.62 (m, 1H, H₆), 7.49 - 7.41 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33 - 7.17 (m, 3H, H_{Ar}), 6.32 (appearing t, *J* = 7.5, 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 5.37 - 5.30 (m, 1H, H_{3'}), 5.11 (s, 2H, H₈), 4.08 - 4.02 (m, 1H, H_{4'}), 3.89 - 3.83 (m, 2H, H_{5'}), 3.54 (brs, 1H, OH), 2.38 - 2.26 (m, 4H, H_{2'} + H_a), 1.89 (brs, 3H, H₇), 1.68 - 1.56 (m, 2H, H₈), 1.35 - 1.22 (m, 34H, CH₂ aliphatic), 0.92 - 0.83 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.6 (CO_{ester 3'}), 163.5 (C₄), 151.0 (C₂), 136.7 (C₆), 134.6 (C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 110.3 (C₅), 86.3 (C_{4'}), 85.2 (C_{1'}), 74.8 (C_{3'}), 62.4 (C_{5'}), 44.5 (C₈), 37.5 (C aliphatic), 34.1 (C_a), 31.9 (C_{2'}), 29.7 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 24.8 (C₈), 22.7 (C aliphatic), 14.1 (CH₃ aliphatic), 13.3 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₇H₅₈N₂O₆ [M+H]⁺ 627.42949, found 627.43718.

Compound 37



To a solution of compound **21** (713 mg, 1.25 mmol) into diethyl ether (14.2 mL), is added, under argon, dropwise and at 0°C, the oxalyl chloride (215 μ L, 2.5 mmol). The reaction mixture is brought back to room temperature and then stirred for 48 hours. The reaction is quenched by slow addition of water (15 mL) at 0°C. The crude product is extracted with Et₂O (3 x 15 mL) and washed with brine. The organic layer is dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to provide compound **33** as a gum.

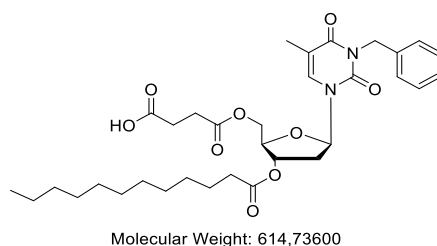
R_f = 0.9 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.56 (s, 1H, H₆), 7.50 – 7.41 (m, 2H, H_{Ar}), 7.32 – 7.21 (m, 3H, H_{Ar}), 7.01 – 6.85 (m, 1H, H_{acid}), 6.74 (dd, *J* = 3.3, 9.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.28 – 5.21 (m, 1H, H_{3'}), 5.13 (s, 2H, H₈), 4.65 (dd, *J* = 1.5, 12.3 Hz, 1H, H_{5'}b), 4.44 (dd, *J* = 2.1, 12.0 Hz, 1H, H_{5'}a), 4.32 – 4.26 (m, 1H, H_{4'}), 2.43 (dd, *J* = 6.3, 14.1 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.39 – 2.29 (m, 3H, H_{2'} + 2H _{α} - aliphatic), 1.89 (s, 3H, H₇), 1.69 – 1.55 (m, 2H, H _{β} - aliphatic), 1.37 – 1.16 (m, 24H, CH₂ - aliphatic), 0.94 – 0.82 (m, 3H, H, CH₂ - aliphatic term) ;

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7 (C - acid), 164.4 (C₄), 157.6 (CO - ester), 157.5, 150.9 (C₂), 136.3 (C_{Ar}), 134.5 (C₆), 129.0 (C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.8 (C_{Ar}), 85.4 (C_{1'}), 82.0 (C_{4'}), 74.9 (C_{3'}), 66.2 (C_{5'}), 44.9 (C₈), 37.0 (C_{2'} or C _{α}), 34.1 (C _{α} or C_{2'}), 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.7 (C _{β}), 22.7, 14.1, 13.0 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₅H₅₁N₂O₉ [M+H]⁺ 642.63421, found 642.34712.

Compound 42



To a suspension of nucleolipid **32** (1eq., 500 mg, 0.88 mmol) into dry toluene (10 mL), were added under argon succinic anhydride (1eq., 88 mg, 0.88 mmol) and DMAP (0.1 eq., 10 mg, 0.088 mmol). The reaction mixture was heated at 140°C and stirred for 2 hours before being concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 80/20) to provide compound **42** as a colorless gum (270 mg, **50%**).

R_f = 0.1 (Toluene/Acetone: 80/20);

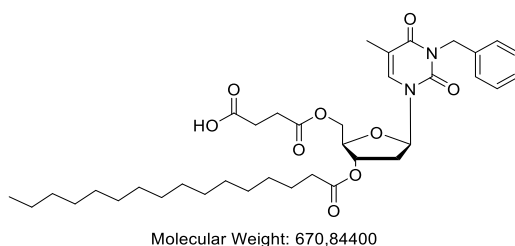
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2927, 2859, 2254, 1905, 1831, 1723, 1647, 1563, 1454, 1406, 1357, 1255, 1159, 1101, 1005, 910, 828, 728, 628, 534;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.30 (brs, 1H, COOH), 7.50 - 7.42 (m, 2H, H_{Ar}), 7.34 - 7.19 (m, 4H, H_{Ar} + H₆), 6.33 (dd, *J* = 5.4, 8.4 Hz, 1H, H_{1'}), 5.23 - 5.14 (m, 1H, H_{3'}), 5.14 - 5.05 (m, 2H, H₈), 4.44 (dd, *J* = 4.2, 12.3 Hz, 1H, H_{5'}), 4.33 (dd, *J* = 3.0, 12.0 Hz, 1H, H_{5'}), 4.24 - 4.17 (m, 1H, H_{4'}), 2.72 - 2.58 (m, 4H, H_{acid}), 2.44 (dd, *J* = 4.8, 13.5 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.32 (appearing *t*, *J* = 7.2, 7.8 Hz, 2H, H_a), 2.21 - 2.08 (m, 1H, H_{2'a}), 1.94 (brs, 3H, H₇), 1.68 - 1.54 (m, 2H, H_β), 1.38 - 1.17 (m, 18H, H - aliphatic), 0.93 - 0.81 (m, 3H, CH₃ - aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 176.8 (C_{acid}), 173.4 (C_{ester 5'}), 171.8 (C_{ester 3'}), 163.4 (C₄), 150.9 (C₂), 136.7 (C₆), 133.0 (C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.8 (C₅), 85.5 (C_{4'}), 82.2 (C_{1'}), 74.0 (C_{3'}), 64.1 (C_{5'}), 44.6 (C₈), 37.5 (C_{2'}), 34.1 (C_α), 31.9 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 28.7 (C aliphatic), 28.6 (C aliphatic), 24.8 (C aliphatic), 22.7 (C aliphatic), 14.1 (C aliphatic), 13.4 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₃H₄₃N₂O₉ [M+H]⁺ 615.32033, found 615.32846.

Compound 43



To a suspension of nucleolipid **21** (1eq., 500 mg, 0.88 mmol) into dry Toluene (10 mL), were added under argon the succinic anhydride (1eq., 88 mg, 0.88 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 10 mg, 0.088 mmol). The reaction mixture was heated at 140°C and stirred for 2 hours before being concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 80/20) to provide compound **43** as a colorless gum (350 mg, **60%**)

R_f = 0.1 (Toluene/Acetone: 80/20);

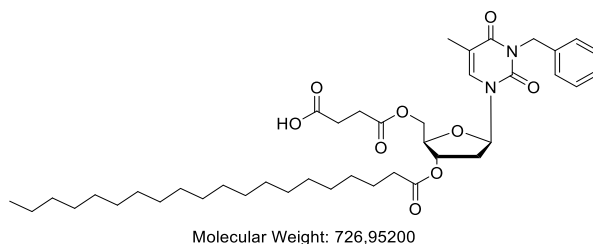
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2924, 2857, 1835, 1717, 1649, 1563, 1455, 1357, 1254, 1159, 1100, 1004, 926, 828, 752, 706, 620, 534;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 - 7.41 (m, 2H, H₆), 7.36 - 7.19 (m, 4H, H_{Ar}), 6.33 (dd, *J* = 5.7, 8.7 Hz, 1H, H_{1'}), 5.25 - 5.04 (m, 3H, H_{3'} + H₈), 4.38 (ddd, *J* = 4.5, 12.3, 16.2 Hz, 1H, H_{5'}), 4.27-4.15 (m, 1H, H_{4'}), 2.77 - 2.58 (m, 4H, H_{Acid}), 2.44 (dd, *J* = 5.4, 14.1 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.31 (*appearing t*, *J* = 7.2, 7.8 Hz, 2H, H_α), 2.21 - 2.05 (m, 1H, H_{2'a}), 1.93 (brs, 3H, H₇), 1.69 - 1.54 (m, 2H, H_β), 1.39 - 1.18 (m, 26H, CH₂ aliphatic), 0.95 - 0.81 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.1 (CO_{acid}), 173.5 (CO_{ester 3'}), 171.8 (CO_{ester 5'}), 163.4 (C₄), 151.0 (C₂), 136.8 (C₆), 132.9 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.9 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 82.2 (C_{4'}), 74.0 (C_{3'}), 64.2 (C_{5'}), 44.7 (C₈), 37.6 (C_{2'}), 34.2 (C_α), 32.0 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 28.8 (C_{Acid}), 28.7 (C_{Acid}), 24.9 (C_β), 22.8 (C aliphatic), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.5 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₇H₅₄N₂O₉ [M+H]⁺ 671.38293, found 671.39051.

Compound 44



To a suspension of nucleolipid **33** (1 eq., 100 mg, 0.17 mmol) into dry toluene (10 mL), were added under argon the succinic anhydride (1eq., 17 mg, 0.17 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 2 mg, 0.017 mmol). The reaction was heated at 140°C and stirred for 4 hours before being concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 80/20) to provide **44** as a colorless gum (75 mg, **66%**).

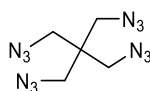
R_f = 0.1 (Toluene/EtOAc: 8/2);

IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2923, 2853, 1738, 1705, 1668, 1645, 1496, 1454, 1352, 1317, 1272, 1247, 1157, 1102, 1078, 1002, 909, 826, 766, 732, 700, 618, 538, 495, 466, 421;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 - 7.43 (m, 2H, H₆ + H_{Ar}), 7.38 - 7.22 (m, 4H, H_{Ar}), 6.33 (dd, *J* = 5.7, 8.7 Hz, 1H, H_{1'}), 5.26 - 5.06 (m, 3H, H_{3'} + H₈), 4.37 (ddd, *J* = 4.5, 12.3, 30.9 Hz, 2H, H_{5'}), 4.24-4.16 (m, 1H, H_{4'}), 2.77 - 2.59 (m, 4H, H_{Acid}), 2.43 (dd, *J* = 5.4, 14.1 Hz, 1H, H_{2'}), 2.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_α), 2.21 - 2.06 (m, 1H, H_{2'}), 1.94 (brs, 3H, H₇), 1.71 - 1.53 (m, 2H, H_β), 1.41 - 1.18 (m, 34H, CH₂ aliphatic), 0.93 - 0.81 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.1 (CO_{Acid}), 173.5 (CO_{ester 3'}), 171.8 (CO_{ester 5'}), 163.4 (C₄), 151.0 (C₂), 136.9 (C₄), 132.9 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 111.0 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 82.3 (C_{4'}), 74.0 (C_{3'}), 64.2 (C_{5'}), 44.7 (C₈), 37.6 (C_{2'}), 34.2 (C_α), 32.1 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.8 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 28.8 (C aliphatic), 28.6 (C aliphatic), 24.9 (C_β), 22.8 (C aliphatic), 14.3 (CH₃ aliphatic), 13.5 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₄₁H₆₂N₂O₉ [M+H]⁺ 727.44553, found 727.45319.

Compound 45

Molecular Weight: 236,20300

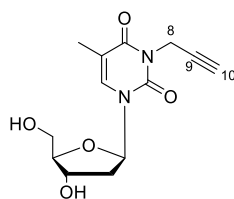
To a solution of pentaerythritol tetrabromide (3 g, 7.74 mmol) into DMF (60 mL), is added, under argon, the sodium azide (6.14 g, 94.4 mmol, 12.2 eq.). The reaction mixture is heated at 80°C for 4 hours before being brought back to room temperature and then stirred for 15 hours. The reaction is dried under reduced pressure, diluted into DCM, and washed with water (3 x 50 mL). The organic layer is dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to provide without further purification compound **45** as a colourless gum.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.39 (s, 8H, 4 x CH₂);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 51.8 (CH₂), 43.9 (C_Q)

Analytical data are consistent with literature²⁰⁴.

Compound 47



In a vial, to a solution of thymidine (1 g, 4.13 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) and under argon atmosphere, NaH (60%) (166 mg, 4.13 mmol, 1 eq.) was added before a microwave activation (6 min, 40°C, 200 W). Then, propargyl bromide (530 μ L, 4.13 mmol, 1 eq.) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). DMF was then evaporated with toluene, without any further treatment. The reaction was repeated three times and the crudes were collected and purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to provide compound **47** as an expended solid (3.30 g, **95 %**).

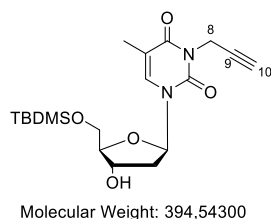
R_f = 0.2 (DCM/MeOH: 95/5);

IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3408, 3287, 2531, 1699, 1633, 1469, 1096, 729;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.80 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₆), 6.29 (appearing t, *J* = 6.9, 13.5 Hz, 1H, H_{1'}), 4.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H₈), 4.49 - 4.36 (m, 1H, H_{3'}), 3.92 (dd, *J* = 3.0, 6.3 Hz, 1H, H_{4'}), 3.77 (ddd, *J* = 3.0, 12.0, 25.8 Hz, 2H, H_{5'}), 2.36 - 2.27 (m, 2H, H_{2'}b + H₁₀), 2.25 - 2.11 (m, 1H, H_{2'}a), 1.91 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.6 (C₄), 150.8 (C₂), 135.9 (C₆), 110.3 (C₅), 87.9 (C_{4'}), 86.5 (C_{1'}), 78.3 (C₉), 71.3 (C₁₀), 71.2 (C_{3'}), 62.0 (C_{5'}), 40.9 (C_{2'}), 30.8 (C₈), 13.1 (C₇).

Compound 48



To a solution of compound **47** (3.2 g, 11.4 mmol) into dry pyridine (65 mL), were added under argon *t*-Butyldimethylsilyl chloride (2.1 g, 13.7 mmol, 1.2 eq.) and the DMAP (140 mg, 1.14 mmol, 0.1 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then quenched with water 60 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 60 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to afford compound **48** as an expended solid (3.97 g, **88** %).

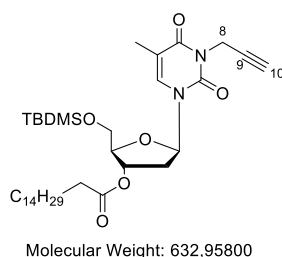
R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.60 (m, 1H, H₆), 6.39 (dd, *J* = 6.0, 8.1 Hz, 1H, H₁'), 4.74 – 4.62 (m, 2H, H₈), 4.51 - 4.40 (m, 1H, H₃'), 4.09 – 4.00 (m, 1H, H₄'), 3.85 (ddd, *J* = 2.4, 11.4, 22.2 Hz, 2H, H₅'), 2.91 (brs, 1H, H₁₀), 2.38 (ddd, *J* = 2.1, 5.4, 13.2 Hz, 1H, H₂'b), 2.21 – 2.01 (m, 1H, H₂' a), 1.93 (brs, 3H, H₇), 1.05 – 0.73 (m, 9H, *t*-Bu), 0.09 (s, 3H, Si – CH₃), 0.09 (s, 3H, Si – CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 162.7 (C₄), 150.3 (C₂), 134.1 (C₆), 110.2 (C₅), 87.3 (C₄'), 85.8 (C₁'), 78.2 (C₉), 72.5 (C₁₀), 70.7 (C₃'), 63.6 (C₅'), 41.4 (C₂'), 30.5 (C₈), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 18.4 (C_Q *t*-Bu), 13.1 (C₇), -5.3 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃);

HRMS (ESI): *in progress*

Compound 55



To a solution of compound **48** (1 eq., 3.97 g, 10.0 mmol) into dry DCM (74 mL), were added under argon the palmitic acid (1.5 eq., 3.87 g, 15.1 mmol) the EDC.HCl (1.5 eq., 2.89 g, 15.1 mmol) and the DMAP (0.7 eq., 0.86 g, 7.0 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (70 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 70 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 50/50) to provide compound **55** as a white foam (5.73 g, **91%**).

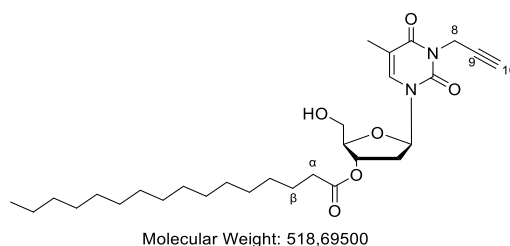
R_f = 0.5 (Pentane/EtOAc: 50/50);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H₆), 6.39 (dd, *J* = 5.1, 9.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.25 – 5.19 (m, 1H, H_{3'}), 4.73 - 4.65 (m, 2H, H₈), 4.08 – 4.02 (m, 1H, H_{4'}), 3.95 – 3.84 (m, 2H, H_{5'}), 2.40 (dd, *J* = 5.4, 13.8 Hz, 1H, H_{2'}b), 2.35 – 2.24 (m, 2H, H_β), 2.17 – 2.02 (m, 2H, H₁₀ + H_{2'}a), 1.93 (brs, 3H, H₇), 1.66 – 1.53 (m, 2H, H_α), 1.36 – 1.14 (m, 26H, H aliphatic), 0.93 – 0.78 (m, 13H, CH₃ aliphatic + *t*-Bu), 0.11 (s, 3H, Si – CH₃), 0.11 (s, 3H, Si – CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.6 (CO lipid), 162.5 (C₄), 150.3 (C₂), 133.6 (C₆), 110.5 (C₅), 85.6 (C_{4'}), 85.5 (C_{1'}), 78.2 (C₉), 72.2 (C₁₀), 70.6 (C_{3'}), 70.6 (CH₂ aliphatic), 63.6 (C_{5'}), 38.2 (C_{2'}), 34.3 (CH₂ aliphatic), 32.0 (CH₂ aliphatic), 30.5 (C₈), 29.8 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.5 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.3 (CH₂ aliphatic), 29.2 (CH₂ aliphatic), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 24.9 (CH₂ aliphatic), 22.8 (CH₂ aliphatic), 18.4 (C_Q *t*-Bu), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.2 (C₇), -5.3 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃);

HRMS (ESI): *in progress*

Compound 58



To a solution of compound **55** (1 eq., 5.73 g, 9.05 mmol) into dry THF (87 mL), was added at 0°C, under argon the TBAF (1.2 eq., 3.15 mL, 11.0 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3h, before being quenched with water (80 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 80 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **58** as a white foam (3.66 g, **78%**).

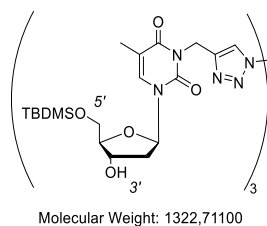
R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.64 (brs, 1H, H₆), 6.29 (appearing t, *J* = 6.9, 7.2 Hz, 1H, H_{1'}), 5.35 – 5.27 (m, 1H, H_{3'}), 4.70 - 4.61 (m, 2H, H₈), 4.06 – 4.00 (m, 1H, H_{4'}), 3.92 – 3.82 (m, 2H, H_{5'}), 3.20 (brs, 1H, OH), 2.41 – 2.21 (m, 4H, H_{2'} + H_β), 2.15 – 2.10 (m, 2H, H₁₀), 1.89 (brs, 3H, H₇), 1.63 – 1.50 (m, 2H, H_α), 1.32 – 1.11 (m, 26H, H aliphatic), 0.87 – 0.76 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7 (CO lipid), 162.6 (C₄), 150.3 (C₂), 134.8 (C₆), 110.5 (C₅), 85.3 (C_{4'}), 85.3 (C_{1'}), 78.1 (C₉), 74.7 (C₁₀), 70.7 (C_{3'}), 62.5 (C_{5'}), 37.8 (C_{2'}), 34.2 (CH₂ aliphatic), 31.9 (CH₂ aliphatic), 30.5 (C₈), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.6 (CH₂ aliphatic), 29.6 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.2 (CH₂ aliphatic), 29.1 (CH₂ aliphatic), 24.8 (CH₂ aliphatic), 22.7 (CH₂ aliphatic), 14.1 (CH₃ aliphatic), 13.2 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₉H₄₆N₂O₆ [M+H]⁺ 519.34287, found 519.34015.

Compound 52



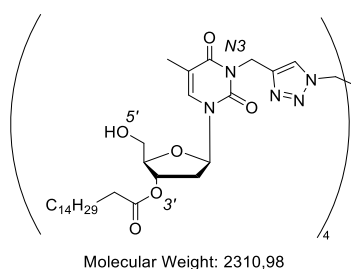
To a solution of compound **48** (425 mg, 1.08 mmol, 2 eq.) into *t*-BuOH/H₂O (5.4 mL / 5.4 mL), were added under argon pentaerythritol tetraazide (140 mg, 0.54 mmol, 1 eq.), the CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.) the NaAsC (10 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq.). The reaction mixture was heated at 75°C and stirred for 48h. The crude product concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to afford compound **52** as a gum (276 mg, **43 %**).

R_f = 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.21 – 8.12 (m, 1H, H_{triazole}), 7.58 – 7.48 (m, 1H, H₆), 6.31 – 6.11 (m, 1H, H_{1'}), 5.27 – 5.06 (m, 2H, H_{3'}), 4.58 – 4.32 (m, 2H, H₈), 4.32 – 4.06 (m, 1H, H_{4'}), 3.93 – 3.73 (m, 2H, H_{5'}), 2.41 – 2.25 (m, 1H, H_{2'} b), 2.09 – 1.93 (m, 1H, H_{2'} a), 1.93 – 1.81 (s, 3H, H₇), 0.94 – 0.79 (m, 9H, *t*-Bu), 0.13 – - 0.02 (m, 6H, Si – CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.3 (C₄), 150.7 (C₂), 142.8 (C_{triazole}), 134.2 (C₆), 127.3 (C_{triazole}), 110.0 (C₅), 87.5 (C_{4'}), 85.8 (C_{1'}), 72.2 (C_{3'}), 63.8 (C_{5'}), 50.4 (C₉), 45.3 (C₁₀), 41.4 (C_{2'}), 36.1 (C₈), 26.0 (CH₃ *t*-Bu), 18.5 (C_Q *t*-Bu), 13.4 (C₇), - 5.3 (Si-CH₃), -5.3 (Si-CH₃);

Compound 60



To a solution of compound **58** (500 mg, 0.876 mmol, 6 eq.) into *t*-BuOH/H₂O (3.3 mL / 3.3 mL), were added under argon pentaerythritol tetraazide (35 mg, 0.146 mmol, 1 eq.), the CuSO₄·5H₂O (4 mg, 0.015 mmol, 0.1 eq.) the NaAsC (6 mg, 0.030 mmol, 0.2 eq.). The reaction mixture was heated at 75°C and stirred for 24h. Compound **58** (2 eq.), CuSO₄·5H₂O (0.1 eq.) and NaAsC (0.2 eq.) were added and the reaction was stirred at 75°C for 24 more hours. The crude product concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH: 95/5; and Toluene/AcOH: 80/20) to afford compound **60** as a gum (275 mg, **82 %**).

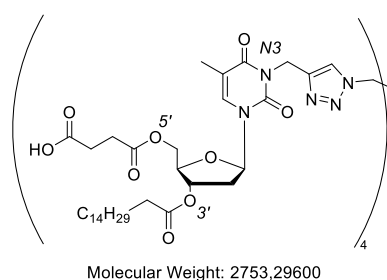
R_f = 0.5 (Toluene/AcOH: 80/20);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.11 – 7.97 (m, 1H, H_{triazole}), 7.62 – 7.50 (m, 1H, H₆), 6.29 – 6.17 (m, 1H, H_{1'}), 5.44 – 5.05 (m, 2H, H₈), 4.47 – 4.22 (m, 2H, H_{3'}), 4.10 – 3.99 (m, 1H, H_{4'}), 3.93 – 3.76 (m, 2H, H_{5'}), 3.23 (brs, 1H, OH), 2.52 – 2.24 (m, 2H, H_β), 1.84 (brs, 3H, H₇), 1.87 – 1.49 (m, 2H, H_α), 1.38 – 1.13 (m, 26H, H aliphatic), 0.98 – 0.76 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.3 (CO lipid), 163.1 (C₄), 150.8 (C₂), 142.8 (C_{triazole}), 137.9 (C₆), 125.3 (C_{triazole}), 110.3 (C₅), 86.5 (C_{4'}), 85.3 (C_{1'}), 74.6 (C_{3'}), 62.4 (C_{5'}), 46.0 (C₉), 37.6 (C_{2'}), 36.1 (C₈), 34.2 (CH₂ aliphatic), 32.0 (CH₂ aliphatic), 31.0 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.5 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.3 (CH₂ aliphatic), 29.2 (CH₂ aliphatic), 24.8 (CH₂ aliphatic), 22.7 (CH₂ aliphatic), 21.5 (CH₂ aliphatic), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.3 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₂₁H₁₉₂N₂₀O₄ [M/2+2H]⁺ 1156.73658, found 1156.73225.

Compound 62



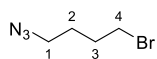
To a solution of compound **60** (275 mg, 0.119 mmol, 1 eq.) into toluene (3 mL), were added under argon the succinic anhydride (71 mg, 0.714 mmol, 6 eq.) and the DMAP (10 mg, 0.083 mmol, 0.7 eq.). The reaction was heated at 140°C and stirred for 3 hours before being concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 30/70) to provide **62** as a colorless gum (95 mg, **30%**).

R_f = 0.3 (Toluene/AcOH: 30/70);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.68 (brs, 1H, OH), 8.09 (s, 1H, H_{triazole}), 7.38 – 7.23 (m, 1H, H₆), 6.22 – 6.08 (m, 1H, H_{1'}), 5.30 – 5.05 (m, 2H, H₈), 4.49 – 4.14 (m, 5H, H_{3'} + H_{4'} + H_{5'}), 2.71 – 2.40 (m, 2H, H_{5'}), 2.71 – 2.40 (m, 4H, H_{Acid}), 2.40 – 2.14 (m, 4H, H_{2'} + H_β), 1.85 (brs, 3H, H₇), 1.67 – 1.49 (m, 2H, H_α), 1.35 – 1.11 (m, 26H, H aliphatic), 0.90 – 0.78 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 175.7 (CO_{acid}), 173.5 (CO lipid), 172.0 (CO_{ester 5'}) 163.2 (C₄), 150.5 (C₂), 142.6 (C_{triazole}), 133.9 (C₆), 127.2 (C_{triazole}), 110.2 (C₅), 86.4 (C_{1'}), 82.8 (C_{4'}), 74.3 (C_{3'}), 64.0 (C_{5'}), 37.6 (C_{2'}), 34.1 (C₈), 32.0 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.6 (CH₂ aliphatic), 29.5 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.3 (CH₂ aliphatic), 29.2 (CH₂ aliphatic), 29.0 (CH₂ aliphatic), 28.7 (C_{Acid}), 28.5 (C_{Acid}), 24.8 (CH₂ aliphatic), 22.7 (CH₂ aliphatic), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.3 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₃₇H₂₀₈N₂₀O₃₆ [M/2+2H]⁺ 1356.76867, found 1356.76370.

Compound 63

Molecular Weight: 178,03300

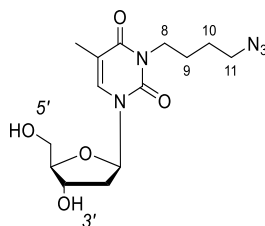
To a solution of dibromobutane (4 g, 18.5 mmol, 2 eq.) into dry DMF (30 mL), was added under argon sodium azide (600 mg, 9.26 mmol, 1 eq.) The reaction mixture was stirred at 50°C for 15h before being quenched with water 50 mL. The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/DCM: 100/0 to 0/100) to afford compound **63** as an oil (982 mg, **60** %).

R_f = 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.44 (appearing t, *J* = 6.3, 6.6 Hz, 2H, H₁), 3.34 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₄), 2.03 – 1.89 (m, 2H, H₂), 1.84 – 1.72 (m, 2H, H₃)

Analytical data are consistent with literature²⁰⁶.

Compound 64



Molecular Weight: 339,35200

In a vial, to a solution of thymidine (1 g, 3.57 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) and under argon atmosphere, NaH (60%) (186 mg, 4.64 mmol, 1.3 eq.) was added before a microwave activation (6 min, 40°C, 200 W). Then, compound **63** (820 mg, 4.64 mmol, 1.3 eq.) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). DMF was then evaporated with toluene, without any further treatment and the crude was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/AcOH: 60/40) to afford compound **64** as an expanded solid (1.03 g, **85 %**).

R_f = 0.3 (Toluene/AcOH: 60/40);

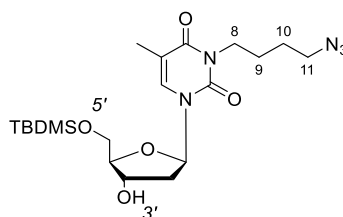
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) *in progress*

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.51 – 7.43 (m, 1H, H₆), 6.18 (appearing t, *J* = 6.9, 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 4.51 – 4.39 (m, 1H, H_{3'}), 4.13 - 4.03 (m, 1H, H_{4'}), 3.97 – 3.58 (m, 5H, H_{4'} + H_{5'} + H₈), 3.23 (appearing t, *J* = 6.6, 6.3 Hz, 2H, H₁₁), 2.33 - 2.14 (m, 2H, H_{2'} + H₁₀), 1.83 (brs, 3H, H₇), 1.68 – 1.47 (m, 4H, H₉ + H₁₀)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.6 (C₄), 150.9 (C₂), 134.8 (C₆), 110.1 (C₅), 87.0 (C_{4'}), 86.4 (C_{1'}), 71.3 (C_{3'}), 62.2 (C_{5'}), 53.5 (C₁₁), 50.9 (C₈), 40.7 (C_{2'}), 26.1 (C₉ ou C₁₀), 24.7 (C₉ ou C₁₀), 13.2 (C₇).

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₄H₂₁N₅O₅ [M+H]⁺ 340.16210, found 340.16149.

Compound 65



Molecular Weight: 453,61500

In a vial, to a solution of compound **64** (1.03 g, 3.04 mmol, 1 eq.) in anhydrous Pyridine (23 mL) and under argon atmosphere, TBDMSCl (549 mg, 3.64 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (37 mg, 0.304 mmol, 0.1 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15h before being quenched with water (50 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/AcOEt: 70/30) to afford compound **65** as an expanded solid (1.1 g, **80 %**).

R_f = 0.3 (Pentane/AcOEt: 70/30);

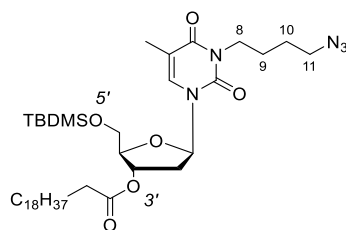
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) *in progress*

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.47 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₆), 6.39 (dd, *J* = 6.0, 7.8 Hz, 1H, H_{1'}), 4.52 – 4.44 (m, 1H, H_{3'}), 4.05 – 3.81 (m, 5H, H_{4'} + H_{5'} + H₈), 3.31 (appearing t, *J* = 6.9, 6.3 Hz, 2H, H₁₁), 2.36 (ddd, *J* = 2.7, 5.7, 13.5 Hz, 1H, H_{2'} a), 2.17 – 2.06 (m, 1H, H_{2'} b), 1.93 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇), 1.68 – 1.61 (m, 4H, H₉ + H₁₀), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu), 0.12 (s, 3H, Si – CH₃), 0.11 (s, 3H, Si – CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.5 (C₄), 150.6 (C₂), 133.7 (C₆), 109.6 (C₅), 87.3 (C_{4'}), 85.6 (C_{1'}), 72.0 (C_{3'}), 63.4 (C_{5'}), 53.4 (C₁₁), 50.8 (C₈), 41.1 (C_{2'}), 26.1 (C₉ ou C₁₀), 25.7 (C_{*t*-Bu}), 24.6 (C₉ ou C₁₀), 18.1 (C_Q), 13.0 (C₇), -5.6 (Si – CH₃), -5.7 (Si – CH₃);

HRMS (ESI): *in progress*

Compound 66



To a solution of compound **65** (1.1 g, 2.43 mmol, 1 eq.) into dry DCM (20 mL), were added under argon the arachidic acid (1.14 g, 3.64 mmol, 1.5 eq.) the EDC.HCl (698 mg, 3.64 mmol, 1.5 eq.) and the DMAP (208 mg, 1.70 mmol, 0.7 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 85/15) to provide compound **66** as a white foam (1.48 g, **81%**).

R_f = 0.4 (Pentane/EtOAc: 85/15);

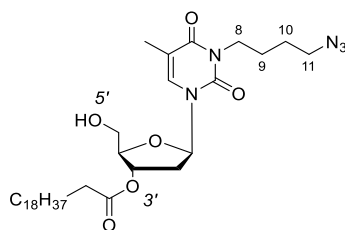
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2926, 2855, 2096, 1738, 1704, 1669, 1647, 1464, 1256, 1125, 833;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.53 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₆), 6.39 (dd, *J* = 5.1, 9.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.27 – 5.22 (m, 1H, H_{3'}), 4.07 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{4'}), 3.97 (appearing t, *J* = 6.9, 6.6 Hz, 2H, H₈), 3.91 (brs, 2H, H_{5'}), 3.31 (appearing t, *J* = 6.9, 6.3 Hz, 2H, H₁₁), 2.45 – 2.28 (m, 3H, H_{2'} a + H_β), 2.10 (ddd, *J* = 6.0, 9.0, 15.3 Hz, 1H, H_{2'}b), 1.93 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H₇), 1.68 – 1.78 – 1.60 (m, 6H, H₉ + H₁₀ + H_α), 1.35 – 1.20 (m, 34H, CH₂ aliphatic), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu), 0.91 – 0.84 (m, 3H, CH₃ aliphatic), 0.13 (s, 3H, Si – CH₃), 0.13 (s, 3H, Si – CH₃);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.1 (CO lipid), 163.1 (C₄), 150.7 (C₂), 133.0 (C₆), 110.0 (C₅), 85.3 (C_{1'}), 85.3 (C_{4'}), 75.0 (C_{3'}), 63.4 (C_{5'}), 53.3 (C₁₁), 50.9 (C₈), 40.4 (C_{2'}), 38.0 (C_α), 34.0 (C aliphatic), 31.8 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 28.9 (C aliphatic), 26.2 (C₉ ou C₁₀), 25.7 (C₉ ou C₁₀), 24.7 (C aliphatic), 24.4 (C_{*t*-Bu}), 22.5 (C aliphatic), 18.1 (C_Q), 13.9 (C aliphatic), 13.0 (C₇), -5.6 (Si – CH₃), -5.7 (Si – CH₃);

HRMS (ESI): *in progress*

Compound 67



Molecular Weight: 633,87500

To a solution of compound **66** (1.48 g, 1.98 mmol, 1 eq.) into dry THF (20 mL), was added at 0°C, under argon the TBAF (572 μ L, 1.98 mmol, 1 eq.). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3h, before being quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 20 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide the compound **67** as a white foam (810 mg, **65%**).

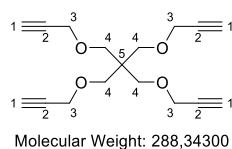
R_f = 0. 2 (Pentane/EtOAc: 70/30);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 (d, J = 0.6 Hz, 1H, H₆), 6.25 (appearing t, J = 6.6, 7.5 Hz, 1H, H_{1'}), 5.35 – 5.29 (m, 1H, H_{3'}), 4.07 – 4.02 (m, 1H, H_{4'}), 3.98 – 3.84 (m, 4H, H₈ + H_{5'}), 3.28 (t, J = 6.6, 2H, H₁₁), 3.06 (brs, 1H, OH), 2.39 – 2.26 (m, 4H, H_{2'} + H _{α}), 1.89 (brs, 3H, H₇), 1.74 – 1.52 (m, 6H, H₉ + H₁₀ + H _{β}), 1.33 – 1.13 (m, 34H, CH₂ aliphatic), 0.89 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7 (CO lipid), 163.5 (C₄), 151.0 (C₂), 134.5 (C₆), 110.5 (C₅), 86.6 (C_{1'}), 85.2 (C_{4'}), 74.6 (C_{3'}), 62.6 (C_{5'}), 51.1 (C₁₁), 51.1 (C₈), 40.7 (C_{2'}), 37.4 (C _{α}), 34.2 (C aliphatic), 32.0 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 26.3 (C₉ ou C₁₀), 24.9 (C₉ ou C₁₀), 24.8 (C aliphatic), 22.7 (C aliphatic), 14.2 (C aliphatic), 13.3 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₄H₅₉N₅O₆ [M+H]⁺ 634.45436, found 634.45189.

Compound 68



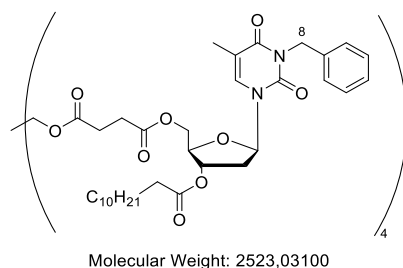
To a stirred solution of pentaerythritol (2 g, 14.7 mmol, 1 eq.) into dry THF (45 mL), was added under argon NaH (2 g, 50 mmol, 3.4 eq.) The reaction mixture was stirred for 4h at 0°C to room temperature. The mixture was cooled again at 0°C before propargyl bromide was added slowly over 20 minutes (8.02 mL, 93 mmol, 6.3 eq.). The reaction was then stirred at room temperature for 15h, before being quenched at 0°C with water 50 mL. The mixture with a precipitate was filtered, washed with AcOEt (3 x 40 mL) and extracted with DCM (3 x 40 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Cyclohexane/AcOEt: 80/20) to afford compound **68** (1.8 g, **43 %**).

R_f = 0.2 (Cyclohexane/AcOEt: 80/20)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.17 – 1.08 (m, 8H, H₃), 3.63 – 3.54 (m, 8H, H₄), 2.02 – 1.97 (m, 4H, H₁)

Analytical data are consistent with literature²⁰⁷.

Compound 70



To a solution of compound **42** (10 eq., 0.25 g, 0.41 mmol) into dry DCM (2.49 mL), was added under argon the pentaerythritol (1 eq., 6 mg, 0.04 mmol), the EDC. HCl (7 eq., 55 mg, 0.23 mmol) and the DMAP (3.2 eq., 16 mg, 0.13 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h under argon. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/Acetone: 80/20 + NEt₃ 0.1%) to provide compound **70** (89 mg, **88%**).

Rf = 0.4 (Toluene/Acetone: 80/20 + NEt₃);

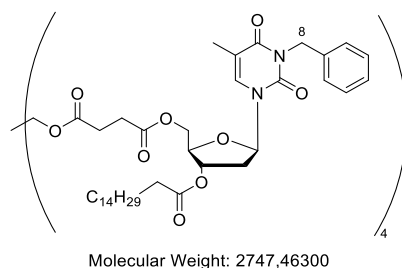
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 2925, 2855, 1742, 1706, 1671, 1465, 1257, 1157, 767, 701;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.49-7.21 (m, 6H, H₆ + H_{Ar}), 6.36 (dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz, 1H, H_{1'}), 5.23-5.12 (m, 1H, H_{3'}), 5.12 (s, 2H, H₈), 4.37 (ddd, *J* = 4.5, 12, 16.5 Hz, 2H, H_{5'}), 4.24-4.18 (m, 1H, H_{4'}), 4.16-4.09 (m, 4H, CH₂ Pentaerythryl), 2.71-2.58 (m, 4H, CH₂ succinate), 2.45 (dd, *J* = 5.7, 14.1 Hz, 1H, H_{2'}b.), 2.33 (appearing t, *J* = 7.2, 7.8 Hz, 2H, H_α), 2.23-2.10 (m, 1H, H_{2'}a), 1.96 (s, 3H, H₇), 1.70-1.54 (m, 2H, H_β), 1.41-1.17 (m, 32H, CH₂ aliphatic), 0.95-0.83 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.3 (COOR-3'), 171.8 (COOR-5'), 163.2 ppm (C₄), 151.0 (C₂), 136.9 (C_{qAr}), 132.9 (C₆), 129.2 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.9 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 82.2 (C_{4'}), 74.1 (C_{3'}), 64.3 (C_{5'}), 62.5 (C Pentaerythryl), 44.7 (C₈), 37.5 (C_{2'}), 34.2 (C_α), 32.0 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C aliphatic), 28.8 (C aliphatic), 28.7 (C aliphatic), 24.9 (C aliphatic), 22.8 (C_β), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.5 (C₇);

HRMS (ESI): *in progress*

Compound 71



To a solution of compound **43** (10 eq., 232.0 mg, 0.34 mmol) into dry DCM (2.07 ml, $c = 0.15 \cdot 10^{-4}$ g/ml), was added under argon the pentaerythritol (1 eq., 5.0 mg, 0.03 mmol), the EDC. HCl (7 eq., 46.0 mg, 0.24 mmol) and the DMAP (3.2 eq., 13.0 mg, 0.11 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h under argon. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/Acetone: 80/20 + NEt₃ 0.1%, then 70/30 = NEt₃ 0.1%) to provide compound **71** (0.070 g, **75%**).

Rf = 0.4 (Toluene/Acetone:80/20 + NEt₃);

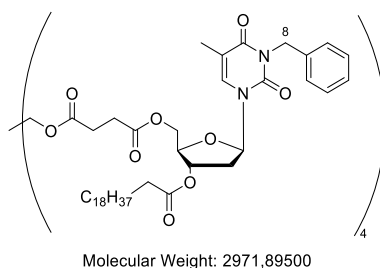
IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹) 2926, 2855, 1739, 1704, 1669, 1645, 1266, 1152, 734, 701, 537;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.52-7.23 (m, 6H, H₆ + H_{Ar}), 6.36 (dd, $J = 5.7, 8.7$ Hz, 1H, H_{1'}), 5.25-5.18 (m, 1H, H_{3'}), 5.12 (s, 2H, H₈), 4.38 (ddd, $J = 4.2, 12, 16.5$ Hz, 2H, H_{5'}), 4.25-4.18 (m, 1H, H_{4'}), 4.17-4.08 (m, 4H, CH₂ Pentaerythryl), 2.73-2.60 (m, 4H, CH₂ succinate), 2.456 (dd, $J = 5.4, 13.5$ Hz, 1H, H_{2'}b), 2.33 (appearing t, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 2H, H_a), 2.25-2.10 (m, 1H, H_{2'}a), 1.97 ppm (s, 3H, H₇), 1.69-1.55 (m, 2H, H _{β}), 1.41-1.18 (m, 24H, CH₂ aliphatic), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.3 (COOR_{3'}), 171.8 (COOR_{5'}), 163.2 (C₄), 151.0 ppm (C₂), 136.9 (C_{q Ar}), 132.9 (C₆), 129.2 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 110.8 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 82.2 (C_{4'}), 74.1 (C_{3'}), 64.3 (C_{5'}), 62.5 (C pentaerytrityl), 44.7 (C₈), 37.5 (C_{2'}), 34.2 (C _{α}), 32.0 (CH₂ aliphatic), 29.8 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.6 (CH₂ aliphatic), 29.5 (CH₂ aliphatic), 29.3 (CH₂ aliphatic), 29.2 (CH₂ aliphatic), 28.8 (CH₂ aliphatic), 28.7 (CH₂ aliphatic), 24.9 (CH₂ aliphatic), 22.8 (C _{β}), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.5 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₅₃H₂₂₀N₈O₃₆ [M/2+2H]⁺ 1374.78152, found 1374.29217.

Compound 73



To a solution of compound **44** (10 eq., 398 mg, 0.55 mmol) into dry DCM (3.64 mL), was added under argon the pentaerythritol (1 eq., 7 mg, 0.05 mmol), the EDC. HCl (7 eq., 74 mg, 3.36 mmol) and the DMAP (3.2 eq., 21 mg, 0.18 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h under argon. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/Acetone: 85/15) to provide compound **73** (0.11 g, **68%**).

Rf = 0.5 (Toluene/Acetone: 85/15).

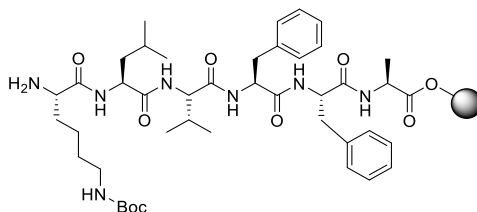
IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹) 2925, 2854, 1740, 1704, 1670, 1466, 1272, 1156, 766, 700;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.52-7.22 (m, 6H, H₆ + H_{Ar}), 6.36 (dd, J = 5.4, 8.7 Hz, 1H, H_{1'}), 5.25-5.17 ppm (m, 1H, H_{3'}), 5.13 (s, 2H, H₈), 4.38 (ddd, J = 4.5, 12, 16.5 Hz, 2H, H_{5'}), 4.24-4.18 (m, 1H, H_{4'}), 4.17-4.09 (m, 4H, CH₂ Pentaerythryl), 2.60-2.51 (m, 4H, CH₂ succinate), 2.45 (dd, J = 6.0, 12.9 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.33 (appearing t, J = 7.2, 7.8 Hz, 2H, H _{α}), 2.23-2.10 (m, 1H, H_{2'a}), 1.96 (s, 3H, H₇), 1.70-1.55 (m, 2H, H _{β}), 1.39-1.19 (m, 32H, CH₂ aliphatic), 0.95-0.85 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

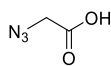
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.3 (COOR_{3'}), 171.8 (COOR_{5'}), 163.3 (C₄), 151.1 ppm (C₂), 136.9 (C_{q Ar}), 132.9 (C₆), 129.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 110.9 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 82.0 (C_{4'}), 74.1 (C_{3'}), 64.3 (C_{5'}), 62.6 (C pentaerytrityl), 44.7 (C₈), 37.6 (C_{2'}), 34.3 (C _{α}), 32.0 (CH₂ aliphatic), 29.7 (CH₂ aliphatic), 29.5 (CH₂ aliphatic), 29.4 (CH₂ aliphatic), 29.3 (CH₂ aliphatic), 28.7 (CH₂ aliphatic), 24.8 (CH₂ aliphatic), 22.8 (C _{β}), 14.2 (CH₃ aliphatic), 13.5 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₆₉H₂₅₂N₈O₃₆ [M/2+2H]⁺ 1486.90672, found 1486.41702.

KLVFFA Peptide synthesis, compound 73



Linear protected peptide was synthesised manually by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl and tert-butoxycarbonyl (Fmoc/Boc) protection strategy. The synthesis occurred in a flask fitted with a sintered to eliminate solvents and excess reagent under compressed air. The 2-chlorotrityl resin (4 g, 6.08 mmol, Loading = 1.52 mmol.g⁻¹) was swollen with DCM (twice 20 mL for 10 min) and then loaded for 45 min in DCM with N α -Fmoc-protected amino acid, alanine (4 g, 12.16 mmol, 2 eq) dissolved into DMF (20 mL) in presence of DIEA (4.24 mL, 24.32 mmol, 4 eq) to get a pH above 9. After each substitution, the resin was washed three times with DMF (20 mL) and twice with DCM (20 mL). The unsubstituted resin was capped with twice 20 mL solutions of DCM/MeOH/DIEA: 17/2/1, for 10 min. The resin was then washed twice with 20 mL of DCM. N α -Fmoc protecting groups were removed using piperidine/DMF:1/4 for 10 min (20 mL). This treatment was repeated three times and the substituted resin was then washed four times with DMF (20 mL). The coupling efficiency was controlled by Optical Density measurement ($\lambda = 299$ nm) of the deprotection and washing solutions. Then, each N α -Fmoc-protected amino acid (9.12 mmol, 1.5 eq) were activated with PyBOP (9.12 mmol, 1.5 eq) and DIEA (4.24 mL, 24.32 mmol, 4 eq) in DMF (20 mL) and the solution was added to resin and stirred for 30 min, before the resin was washed. To avoid deletion mutation, a capping step was realised by treatment with Ac₂O/Pyridine/DMF: 1/2/5. The protecting group was then cleaved before the next amino acid introduction.

Compound 75

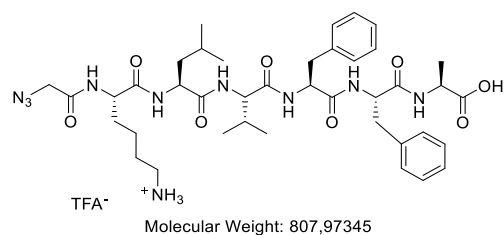
Molecular Weight: 101.06500

To a solution of sodium azide (3.9 g, 60 mmol, 1.5 eq) into H₂O (200 mL), iodoacetic acid **74** (7.4 g, 40 mmol) is added over one hour. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 hours before concentrated solution of hydrochloric acid was added until a pH \approx 1 was reached. The red solution was then extracted with Et₂O and washed with a saturated aqueous solution of NaCl. The combined organic extracts were dried over Mg₂SO₄ and filtered. The product **75** was obtained as a yellow oil after concentration under reduced pressure (3.1 g, 30 mmol, 76%) and used without further purification.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.1 (brs, 1H, OH_{Acid}), 3.9 (s, 2H, CH₂);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂H₃N₃O₂ [M-H]⁻ 100.02, found 100.10.

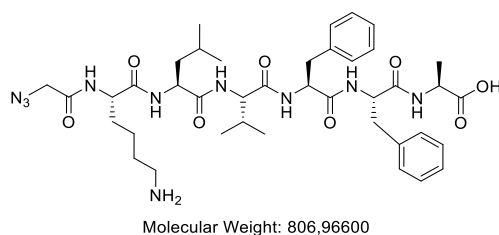
Compound 76



To a solution of an uncleaved resin peptide **73** (6.08 mmol) into DMF (20 mL), acid azide (1.0 g, 9.9 mmol, 1.6 eq), activated agent HBTU (3.75 g, 9.9 mmol, 1.6 eq) and DIEA (4.2 mL, 12.16 mmol, 4 eq) were added. The reaction was stirred for 90 minutes before the resin was washed three times with DMF (20 mL). The process was repeated one more time. Resin cleavage and Boc-deprotection was performed by two treatments with TFA/TIS/H₂O: 95/2.5/2.5 (20 mL) for 1 hour. The peptide was precipitated with ether and purified with RP-HPLC (5 to 100 % B in 20 min) to afford compound **76** as a TFA salt (400 mg, **37%**).

RP-HPLC: $R_t = 6.59$ min (C18, 5-100% B in 15 min)

HRMS (ESI): Calcd. for C₄₀H₅₉N₁₀O₈ [M+H]⁺ 807.97, found 807.71.

Desalting peptide protocole

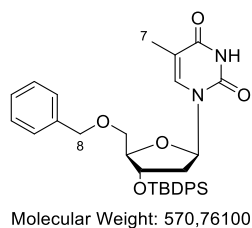
Peptide **76** (160 mg) was suspended into an aqueous sodium hydroxide ($c = 100$ mM) solution (10 mL) and placed in the centrifuge at 4°C , 1800 G for 20 minutes. The supernatant was removed, and the peptide was suspended in deionized water and centrifuged for 20 minutes. The washing process was repeated twice to obtain a pH above 6.³⁰⁴

RP-HPLC: $R_t = 6.60$ min (C18, 5-100% B in 15 min)

HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 807.97, found 807.71.

³⁰⁴ Roux, S., Zékri, E., Rousseau, B., Paternostre, M., Cintrat, J.-C., Fay, N. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 354-359.

Compound 77



In a vial, to a solution of compound **7** (500 mg, 1.04 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (5 mL) at 0°C and under argon atmosphere, NaH (60%) (104 mg, 2.6 mmol, 2.5 eq.) was added before a microwave activation (2 min, 40°C, 200 W). Then, after being brought back at 0°C, compound benzyle bromide (309 μ L, 2.6 mmol, 2.5 eq.) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). The reaction was immediately quenched with NH₄Cl, the aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 20 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound **77** as a white foam (230 mg, **59%**).

Rf = 0.4 (Pentane/EtOAc: 70/30).

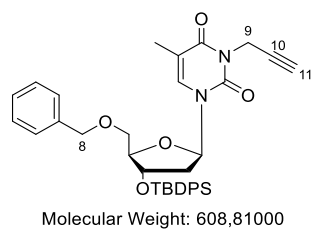
IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3059, 2941, 2251, 1685, 1467, 1105, 905, 721, 496;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 10.30 (s, 1H, NH), 7.76 – 7.65 (m, 4H, H_{Ar}), 7.53 (brs, 1H, H₆), 7.50 – 7.14 (m, 11H, H_{Ar}), 6.64 – 6.55 (m, 1H, H_{1'}), 4.60 – 4.50 (m, 1H, H_{3'}), 4.48 – 4.30 (m, 2H, H₈), 4.38 (ddd, J = 4.5, 12, 16.5 Hz, 2H, H_{5'}), 4.15 – 4.05 (m, 1H, H_{4'}), 3.64 – 3.54 (m, 1H, H_{5'} b), 3.15 – 3.05 (m, 1H, H_{5'} a), 2.49 – 2.38 (m, 1H, H_{2'} b), 2.13 – 1.98 (m, 1H, H_{2'} a), 1.16 (brs, 3H, H₇), 1.22 – 1.02 (m, 9H, *t*-Bu);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.3 (C₄), 150.6 (C₂), 137.3 (C_{q Ar}), 135.7 (C₆), 135.6 (C_{Ar}), 135.5 (C_{Ar}), 133.1 (C_{Ar}), 132.9 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 110.7 (C₅), 86.4 (C_{4'}), 84.8 (C_{1'}), 73.5 (C_{3'}), 73.2 (C₈), 69.5 (C_{5'}), 41.0 (C_{2'}), 26.7 (CH₃ *t*-Bu), 26.7 (CH₃ *t*-Bu), 18.8 (C_q *t*-Bu), 12.0 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₃H₃₉N₂O₅Si [M+H]⁺ 571.26283, found 571.26074.

Compound 78



In a vial, to a solution of compound **77** (230 mg, 0.403 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (2.3 mL) and under argon atmosphere, NaH (60%) (40 mg, 1.01 mmol, 2.5 eq.) was added before a microwave activation (6 min, 40°C, 200 W). Then, propargyl bromide (112 μ L, 1.03 mmol, 2.5 eq.) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). DMF was then evaporated with toluene, without any further treatment. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/AcOEt: 90/10) to afford compound **78** as an expanded solid (127 mg, **52 %**).

Rf = 0.2 (Pentane/EtOAc: 70/30).

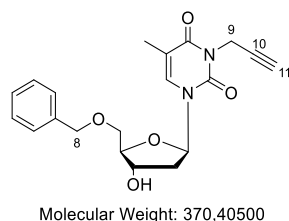
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) *in progress*

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 10.30 (s, 1H, NH), 7.76 – 7.65 (m, 4H, H_{Ar}), 7.53 (brs, 1H, H_6), 7.50 – 7.14 (m, 11H, H_{Ar}), 6.64 – 6.55 (m, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.60 – 4.50 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.48 – 4.30 (m, 2H, H_8), 4.38 (ddd, $J = 4.5, 12, 16.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{5'}$), 4.15 – 4.05 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.64 – 3.54 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$ b), 3.15 – 3.05 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$ a), 2.49 – 2.38 (m, 1H, H_2 b), 2.13 – 1.98 (m, 1H, H_2 a), 1.16 (brs, 3H, H_7), 1.22 – 1.02 (m, 9H, *t*-Bu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 164.3 (C_4), 150.6 (C_2), 137.3 ($\text{C}_{\text{q Ar}}$), 135.7 (C_6), 135.6 (C_{Ar}), 135.5 (C_{Ar}), 133.1 (C_{Ar}), 132.9 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 110.7 (C_5), 86.4 ($\text{C}_{4'}$), 84.8 ($\text{C}_{1'}$), 73.5 ($\text{C}_{3'}$), 73.2 (C_8), 69.5 ($\text{C}_{5'}$), 41.0 (C_2), 26.7 (CH_3 *t*-Bu), 26.7 (CH_3 *t*-Bu), 18.8 (C_q *t*-Bu), 12.0 (C_7);

HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 571.26283, found 571.26074.

Compound 79



To a solution of compound **78** (540 mg, 0.887 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (9 mL) and under argon atmosphere, TBAF (308 μ L, 1.06 mmol, 1.2 eq) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2 hours at 0°C before being quenched with water (15 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 10 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide expected compound **79** as an expended solid (276 mg, **84%**).

Rf = 0.1 (Pentane/EtOAc: 70/30);

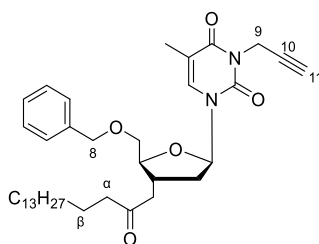
IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3450, 3282, 2884, 1646, 1456, 1340, 1271, 1094, 756;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.63 (brs, 1H, H₆), 7.41 – 7.26 (m, 5H, H_{Ar}), 6.44 (appearing t, J = 6.3, 7.2 Hz, 1H, H_{1'}), 4.77 – 4.53 (m, 5H, H_{3'} + H₈ + H₉), 4.20 – 4.12 (m, 1H, H_{4'}), 3.38 (dd, J = 2.4, 10.5 Hz, 1H, H_{5'} b), 3.72 (dd, J = 2.4, 10.5 Hz, 1H, H_{5'} a), 3.51 (brs, 1H, OH), 2.39 (ddd, J = 3.3, 6.0, 13.8 Hz, 1H, H_{2'} b), 2.29 – 2.14 (m, 2H, H_{2'}a + H₁₁), 1.65 (brs, 3H, H₇);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 162.7 (C₄), 150.3 (C₂), 137.5 (C_{q Ar}), 134.5 (C₆), 128.7 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 110.2 (C₅), 86.1 (C_{4'} ou C_{1'}), 85.8 (C_{1'} ou C_{4'}), 78.3 (C₁₀), 73.7 (C₁₁), 72.3 (C₈), 70.7 (C_{3'}), 70.3 (C_{5'}), 41.1 (C_{2'}), 30.4 (C₉), 12.9 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₀H₂₃N₂O₅ [M+H]⁺ 371.16015, found 371.15972.

Compound 80



Molecular Weight: 606,84800

To a solution of compound **79** (260 g, 0.702 mmol, 1 eq.) into dry DCM (6 mL), were added under argon the palmitic acid (270 g, 1.05 mmol, 1.5 eq.) the EDC.HCl (202 mg, 1.05 mmol, 1.5 eq.) and the DMAP (60 mg, 0.491 mmol, 0.7 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (15 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 10 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 90/10) to provide **80** as a white foam (387 mg, **91%**).

Rf = 0.3 (Pentane/EtOAc: 90/10)

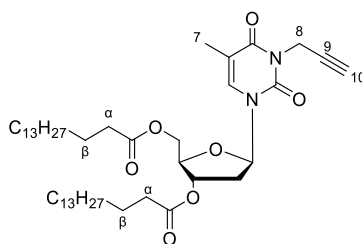
IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) *in progress*

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.57 (brs, 1H, H₆), 7.38 – 7.24 (m, 5H, H_{Ar}), 6.47 (dd, *J* = 5.7, 9.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.40 – 5.32 (m, 1H, H_{3'}), 4.72 – 4.51 (m, 4H, H₈ + H₉), 4.19 – 4.12 (m, 1H, H_{4'}), 3.86 – 3.73 (m, 1H, H_{5'}), 2.44 – 2.18 (m, 4H, H_{2'} + H_a), 2.18 – 2.11 (m, 1H, H₁₁), 1.69 – 1.53 (m, 5H, H₇ + H_β), 1.38 – 1.13 (m, 26H, CH₂ aliphatic), 0.92 – 0.80 (m, 3H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.5 (CO lipid), 162.4 (C₄), 150.4 (C₂), 137.4 (C_q Ar), 134.0 (C₆), 128.7 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 110.7 (C₅), 85.6 (C_{1'}), 84.2 (C_{4'}), 78.3 (C₁₀), 75.5 (C_{3'}), 73.8 (C₈), 70.6 (C_{5'}), 37.9 (C_{2'}), 34.3 (C_α), 32.0 (C₈), 30.4 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.7 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.5 (C₁₁), 29.4 (C aliphatic), 29.3 (C aliphatic), 29.2 (C₉), 24.9 (C_β), 22.7 (C aliphatic), 14.2 (CH₃ aliphatic), 12.9 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₃₆H₅₃N₂O₆ [M+H]⁺ 609.39037, found 609.38805.

Compound 81



Molecular Weight: 757,11000

To a solution of compound **47** (800 mg, 2.85 mmol, 1 eq.) into dry DCM (20 mL), were added under argon the palmitic acid (2.2 g, 8.56 mmol, 3 eq.) the EDC.HCl (1.65 mg, 8.56 mmol, 3 eq.) and the DMAP (490 mg, 4.00 mmol, 1.4 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h, before being quenched with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 x 20 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before being concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 90/10) to provide compound **81** as a white foam (2.0 g, **93%**).

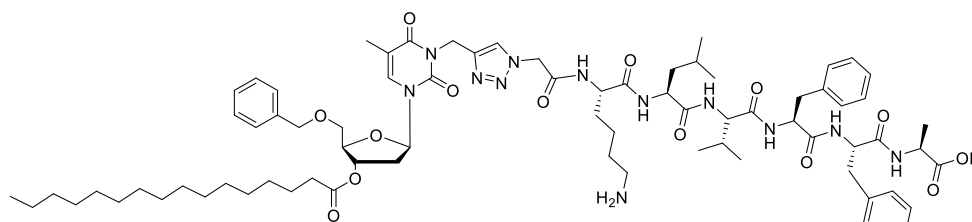
Rf = 0.5 (Pentane/EtOAc: 90/10)

IR (ATR) v_{max} (cm⁻¹) 3671, 2927, 2861, 1663, 1166, 905, 726;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.33 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H₆), 7.34 (dd, *J* = 5.7, 8.4 Hz, 1H, H₁'), 5.24 – 5.18 (m, 1H, H₃''), 4.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H₈), 4.41 (dd, *J* = 4.2, 12.0 Hz, 1H, H₅' b), 4.30 (dd, *J* = 3.0, 12.0 Hz, 1H, H₅' a), 4.26 – 4.19 (m, 1H, H₄''), 2.55 – 2.43 (m, 1H, H₂' b), 2.40 – 2.25 (m, 4H, H₁₁ + H₂' a + H_α), 2.24 – 2.08 (m, 2H, H_α), 1.94 (brs, 3H, H₇), 1.70 – 1.53 (m, 4H, H_β + H_β'), 1.39 – 1.08 (m, 52H, H aliphatic), 0.91 – 0.78 (m, 6H, CH₃ aliphatic);

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 172.9 (CO lipid), 172.8 (CO lipid), 162.0 (C₄), 150.0 (C₂), 133.0 (C₆), 110.4 (C₅), 85.5 (C₁''), 82.2 (C₄''), 78.0 (C₉), 73.8 (C₃''), 70.5 (C₁₀), 63.5 (C₅''), 37.5 (C₂''), 34.0 (C_α), 33.9 (C_α'), 31.8 (C aliphatic), 30.2 (C aliphatic), 29.6 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.5 (C aliphatic), 29.3 (C₁₁), 29.2 (C aliphatic), 29.1 (C aliphatic), 29.0 (C₉), 29.0 (C₈), 24.7 (C_β), 24.6 (C aliphatic), 22.5 (C aliphatic), 14.0 (CH₃ aliphatic), 14.0 (CH₃ aliphatic), 13.1 (C₇);

HRMS (ESI): Calcd. for C₄₅H₇₇N₂O₇ [M+H]⁺ 757.57308, found 757.57292.

Compound **82**

Molecular Weight: 1415,78600

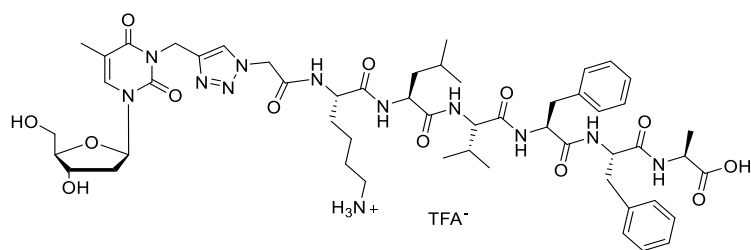
To a solution of **80** (30 mg, 0.052 mmol) into 0.5 mL of DMSO, N₃-KLVFFA **76** (42 mg, 0.052 mmol) was added with 0.5 mL of TFE. 52 μ L of a solution of CuSO₄·5H₂O ($c = 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and 52 μ L of a solution of NaAsC ($c = 1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were then added and the reaction mixture was heated in a microwave (30 min, 80°C). The mixture was solubilised into DMSO, and Chelex resin was added before filtration. The product **82** was obtained after purification by RP-HPLC (C5, 0% B during 3 min, then 0-100% B in 15 min).

RP-HPLC: $R_t = 17.5 \text{ min}$ (C5, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 8.52 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, amide), 8.30 (d, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 1H, amide), 8.13 (d, $J = 6 \text{ Hz}$, 1H, amide), 8.00 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, amide), 7.91 (d, $J = 6 \text{ Hz}$, 1H, amide), 7.86 (brs, 1H, H₆), 7.65 – 7.61 (m, 4H, H_{triazole} + H peptide), 7.42 – 7.02 (m, 15H, H_{Ar} + H_{Phe}), 6.26 (appearing t, $J = 5.1, 5.7 \text{ Hz}$, 1H, H_{1'}), 5.33 – 5.29 (m, 1H, H_{3'}), 5.20 – 5.00 (m, 4H, H₈ + H₁₀), 4.71 – 4.50 (m, H_a + H peptide), 4.33 – 4.00 (m, 5H, H_{4'} + H peptide), 3.79 – 3.68 (m, 2H, H_{5'}), 3.07 – 2.69 (m, 9H, H_{Alanine} + H _{α}), 2.36 – 2.31 (m, 3H, H_{2'} b + H _{β}), 2.03 – 2.00 (m, 1H, H_{2'} a), 1.87 – 1.84 (m, 1H, H_{Lysine}), 1.61 (brs, 3H, H₇), 1.58 – 1.38 (m, 8H, H_{Leucine}), 1.37 – 1.03 (m, 33H, H aliphatic + H_{Lysine}), 0.95 – 0.51 (m, 15H, CH₃ aliphatic + H_{Valine}).

HRMS (ESI): Calcd. for C₇₆H₁₁₀N₁₂O₁₄ 1414.83, found $[M+H]^+ = 1415.95$ and $[M-H]^- = 1413.88$.

Compound 84



To a solution of compound **47** (30 mg, 0.052 mmol) into 0.5 mL of DMSO, N₃-KLVFFA **76** (42 mg, 0.052 mmol) was added with 0.5 mL of TFE. 52 μL of a solution of CuSO₄·5H₂O (*c* = 0.1 mol.L⁻¹) and 52 μL of a solution of NaAsC (*c* = 1.0 mol.L⁻¹) were then added and the reaction mixture was heated in a microwave (30 min, 80°C, 200 W). The mixture was solubilised into DMSO. The product **84** was obtained after purification by RP-HPLC (C18, 0-100% B in 60 min, 100% B during 10 min).

RP-HPLC: *R*_t = 9.30 min (C18, 220 nm, 0-100% B in 15 min)

HRMS (ESI): Calcd. for C₅₃H₇₆N₁₂O₁₃ [M+H]⁺ 1087.26545, found 1087.55788.

Nanoemulsion Preparation and Characterization

General protocol for NEs Formulation

For all experiments, O/W NE were used as freshly prepared, formulated with medium chain triglyceride oil (Miglyol® 812N) and two surfactants. To obtain the oily phase, 12 mg egg lecithin (Lipoid® E80) were dispersed in 200 mg 70°C heated oil phase Miglyol® 812N. The aqueous phase was composed of a dispersion of 25 mg Polysorbate 80 (Tween® 80) in the 70°C heated 800 mg Milli-Q water. NE were loaded with compounds solubilized at various final concentrations. To adjust osmolality for in vitro experiments, Glycerol at 2.25% was added to the aqueous phase. Phase inversion, with previously prepared and heated phases and homogenization by sonication (Sonic Vibra Cell-VC 250), afforded the emulsion with submicron size range oil droplets.

NEs Characterization

Physical characteristics of all NEs were assessed by dynamic light scattering (DLS) using Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). NEs were diluted at 1/2500 (v/v), and the average size and the polydispersity index were determined by three independent measurements performed at 25°C. To analyze the ζ -potential, NEs were diluted at 1/1500 (v/v), and measurements were performed using Zetasizer Nano ZS coupled with a folded capillary cell (DTS1060) from Malvern Instruments. The droplet's mean diameter, index of polydispersity, and ζ -potential were studied to determine the colloidal stability over time.

Annexes

Communications orales

Conception, synthesis, formulation of nanoemulsions of nucleolipids for neurodegenerative diseases

Brouillard, M., Dehay, B., Crauste-Manciet, S., Desvergnès, V.

23^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale Des Sciences Chimiques, Bordeaux, le 10 juin 2021

Conception, synthesis, fomulation and biological evaluation of new nucleolipids as agents for the lysosomal function restauration in the Parkinson's disease context

Brouillard, M., Mousli, Y., Barthélémy, P., Dehay, B., Crauste-Manciet, S. and Desvergnès, V.

Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé, Bordeaux, le 19 novembre 2020

Communication par poster

Synthesis and formulation of Acid-based nucleolipids for neurodegenerative diseases

Brouillard, M., Barthélémy, P., Dehay, B., Crauste-Manciet, S., Desvergnès, V.

56^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, 7-9 juillet 2021

- Prix du poster de la Société de Chimie Thérapeutique -

Article publié

Nucleolipid Acid-Based Nanocarriers Restore Neuronal Lysosomal Acidification Defects

Brouillard, M., Barthélémy, P., Dehay, B., Crauste-Manciet, S., Desvergnès, V. *Front. Chem.*, **2021**, 9:736554.



Nucleolipid Acid-Based Nanocarriers Restore Neuronal Lysosomal Acidification Defects

Mathias Brouillard¹, Philippe Barthélémy¹, Benjamin Dehay^{2*}, Sylvie Crauste-Manciet^{1,3} and Valérie Desvergnès^{1*}

¹University of Bordeaux, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, Bordeaux, France, ²University of Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, Bordeaux, France, ³University Hospital, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Srivatsan Seergazhi Gopalan,
Indian Institute of Science Education
and Research, Pune, India

Reviewed by:

Ashok Nuthanakanti,
NYU Grossman School of Medicine,
United States
Ashwani Sharma,
IISER Tirupati, India

*Correspondence:

Benjamin Dehay
benjamin.dehay@u-bordeaux.fr
Valérie Desvergnès
valerie.desvergnès@u-bordeaux.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Supramolecular Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 05 July 2021

Accepted: 06 August 2021

Published: 20 August 2021

Citation:

Brouillard M, Barthélémy P, Dehay B,
Crauste-Manciet S and Desvergnès V
(2021) Nucleolipid Acid-Based
Nanocarriers Restore Neuronal
Lysosomal Acidification Defects.
Front. Chem. 9:736554.
doi: 10.3389/fchem.2021.736554

Increasing evidence suggests that lysosomal dysfunction has a pathogenic role in neurodegenerative diseases. In particular, an increase in lysosomal pH has been reported in different cellular models of Parkinson's disease. Thus, targeting lysosomes has emerged as a promising approach. More specifically, regulating its pH could play a central role against the neurodegeneration process. To date, only a few agents specifically targeting lysosomal pH are reported in the literature, partly due to the challenge of crossing the Blood-Brain-Barrier (BBB), preventing drug penetration into the central nervous system (CNS). To develop chronic treatments for neurodegenerative diseases, crossing the BBB is crucial. We report herein the conception and synthesis of an innovative DNA derivative-based nanocarrier. Nucleolipids, carrying a biocompatible organic acid as an active ingredient, were designed and synthesized as prodrugs. They were successfully incorporated into an oil-in-water nanoemulsion vehicle to cross biological membranes and then release effectively biocompatible acidic components to restore the functional lysosomal pH of neuronal cells. Biological assays on a genetic cell model of Parkinson's disease highlighted the non-toxicity of such nucleolipids after cellular uptake and their ability (at $c = 40 \mu\text{M}$) to fully restore lysosomal acidity.

Keywords: nucleolipid, nanocarrier, oil-in-water nanoemulsion, lysosome, pH, acidification, neurodegenerative disease

INTRODUCTION

Lysosomes play a crucial role in many cellular processes. These membrane-bound acidic organelles present in the cytosol of all eukaryotic cells are particularly implicated in the autophagy-lysosomal pathway (ALP) (Luzio et al., 2007), (Yim and Mizushima, 2020). The ALP is the main mechanism for the degradation of intracellular material and, notably, long-lived proteins and old or damaged organelles. The degradation process requests a crucial acidic lysosomal pH (4.5–5.5), which optimizes the concerted action of more than 60 hydrolases (Settembre et al., 2013) and ensures fusion between lysosomes and autophagosomes (Kawai et al., 2007). The significant role of the lysosome pH has become evident in many pathologies such as lysosomal storage disorders (Marques and Saftig, 2019), immunological diseases, diabetes, cancer, and neurodegenerative diseases (Koh et al., 2019), (Colacurcio and Nixon, 2016), making the lysosome a promising therapeutic target (Hafner Česen et al., 2012), (Bonam et al., 2019), (Peng et al., 2019). In the specific case of neurodegenerative diseases, particularly in Parkinson's disease (Dehay et al., 2013), the toxic accumulation of misfolded proteins and subsequent neurodegeneration has been linked to

lysosomal dysfunction (Dehay et al., 2010), (Lie and Nixon, 2019). Approaches to modulate lysosomal pH are scarce. Developing therapeutic nanosystems with acidic drug delivery to restore lysosomal acidification are of significant interest (Zeng et al., 2020). The main issue is to target neuronal lysosomes in neurodegenerative diseases to transport therapeutic agents to the central nervous system (CNS) and then pass through the Blood-Brain-Barrier (BBB). The size of nanoobjects and their lipophilic nature are crucial to cross this natural protective membrane (Zhang et al., 2009), (Rathore et al., 2019), (Edelmann and Maegawa, 2020). Polymeric or lipid nanoparticles (NPs) were developed to exhibit specific characteristics allowing the uptake into CNS. Mainly, PLGA polyester nanoparticles (diameter~100 nm) are used to target CNS (Cunha et al., 2021). This pH and enzyme-sensitive polymer releases lactic and glycolic acid residues in a mild acid aqueous environment and has been reported to decrease lysosomal pH efficiently (Bourdenx et al., 2016), (Zeng et al., 2019). To achieve CNS targeting by systemic injection and overcome the low diffusion power of PLGA NPs in the brain, the development of oil-in-water (O/W) nanoemulsions (NEs)-based formulation was recently reported (Prévoit et al., 2018). Potential of NEs for drug delivery to the brain was recently reviewed (Karami et al., 2019), highlighting the essential properties of NEs to this goal for hydrophobic therapeutics agents entrapped inside oil droplets, i.e., cellular transport either by paracellular or transcellular routes, the colloidal dispersion protecting them from both chemical and enzymatic degradations. Considering these properties and their biocompatibility based on excipients, which may be selected as Generally Recognized As Safe (GRAS), allowing their administration in humans, NE represents an excellent nanosystem for drug delivery and sustained drug release.

Nevertheless, the low solubility of PLGA polymer in oil and its limited loading rate into resulting NE led us to design and synthesize a small low molecular weight molecule able to be efficiently loaded into NE. Nucleolipids (NLs) are small hybrid bioinspired molecules composed of a lipid covalently linked to a

nucleic acid derivative, nucleobase, nucleoside, nucleotide, or oligonucleotide with a certain structural similarity to cell membranes (Gissot et al., 2008). It is widely accepted that NLs are efficient molecular carriers for the delivery of therapeutic ingredients (Simeone et al., 2011), (Benizri et al., 2018), (Zhou et al., 2020). Their ability to cross the BBB was also recently highlighted (Swastika et al., 2019), making them good candidates for our goal. Based on this outcome, it was first demonstrated that a NL appropriately functionalized could be loaded in an O/W NE and subsequently efficiently internalized within human neuronal cells and co-localized with targeted lysosomes (Cunha et al., 2020).

To go further, we report here the synthesis, the formulation, and the biological evaluation of original NLs designed as prodrugs and carrying an organic acid moiety as a potential lysosomal acidifying agent (**Figure 1**). Succinic acid was chosen on its excellent biocompatibility and its pKa range remarkably close to lactic and glycolic acids pKas. The free acid function was expected to provide rapid acidification. In contrast, the second acid function, protected as an ester at the 5' position, will be released in a second time *via* enzymatic cleavage. Their formulation into O/W NEs was performed to allow the plasma membrane crossing. The nature of the fatty chain at the 3' position was modulated to study the effect of the lipid chain length on cytotoxicity and acidifying capacity. The encouraging results reported herein suggest that O/W NEs loaded with acid NLs are efficient nanocarriers for drug delivery. Indeed, it has been shown that acidic NLs are easily transported to the lysosomes and rescue efficiently the impaired pH.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis and Characterization of Acidic Nucleolipids 7-8

General Methods

^1H NMR and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker Avance 300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.46 MHz) spectrometer using residual

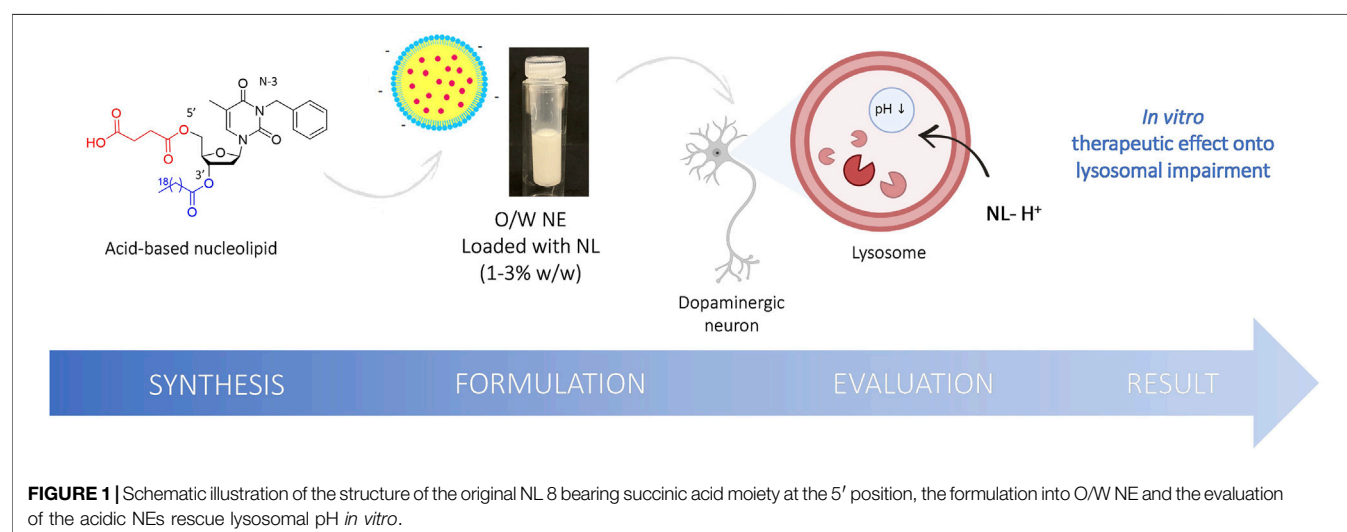


FIGURE 1 | Schematic illustration of the structure of the original NL 8 bearing succinic acid moiety at the 5' position, the formulation into O/W NE and the evaluation of the acidic NEs rescue lysosomal pH *in vitro*.

CHCl₃ as an internal reference (7.26 ppm) and at 293 K unless otherwise indicated. The chemical shifts (δ) and coupling constants (J) are expressed in ppm and Hz. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet and m = multiplet. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on a PerkinElmer FT spectrometer Spectrum two (UATR two). For electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses, a Waters Micromass ZQ instrument equipped with an electrospray source was used in the positive and/or negative mode. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analyses were performed on a PerSeptive Biosystems Voyager-De Pro MALDI mass spectrometer in the linear mode using 3,4-dihydroxybenzoic acid as the matrix. Analytical thin-layer chromatography was performed using silica gel 60 F254 precoated plates (Merck) with visualization by ultraviolet light, potassium permanganate, or sulfuric acid. Flash chromatography was performed on a silica gel (0.043–0.063 mm).

Synthesis of Compound 1

In a vial, to a solution of thymidine (1 eq., 1 g, 4.13 mmol) in anhydrous DMF (10 ml) and under argon atmosphere, NaH (1 eq., 0.166 g) was added before a microwave activation (6 min, 40°C, 200 W). Then, benzyl bromide (1 eq., 490 μ L) was added, and the reaction mixture was heated in a microwave (60 min, 40°C, 200 W). DMF was then evaporated with toluene without any further treatment. The reaction was repeated three times, the crudes were collected and purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to afford the compound 1 as an expanded solid (3.9 g, 95 %).

R_f = 0.4 (DCM/MeOH: 95/5). IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3410, 2924, 2861, 1947, 1650, 1563, 1392, 1256, 1095, 655, 488. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 7.86 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.38–7.17 (m, 5H), 6.31 (appearing t, J = 6.9, 13.5 Hz, 1H), 5.08 (brs, 2H), 4.43–4.35 (m, 1H), 3.94–3.87 (m, 1H), 3.76 (ddd, J = 2.7, 11.4, 23.1 Hz, 2H), 2.32–2.13 (m, 2H), 1.91 (s, 3H). ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 165.3, 152.4, 138.3, 136.6, 129.4, 129.3, 128.4, 110.7, 88.9, 87.1, 72.1, 62.7, 45.3, 41.3, 13.2. HRMS (ESI): Calcd. for C₁₇H₂₀N₂O₅ [M + H]⁺ 333.13722, found 333.14470.

Synthesis of Compound 2

To a solution of compound 1 (1 eq., 3.18 g, 9.53 mmol) into dry pyridine (65 ml), were added under argon *t*-Butyldimethylsilyl chloride (1.2 eq., 1.73 g, 11.2 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 116 mg, 0.953 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then quenched with water (30 ml). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 \times 30 ml), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to afford compound 2 as an expanded solid (1.78 g, 89 %).

R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54–7.45 (m, 3H), 7.34–7.22 (m, 3H), 6.41 (dd, J = 5.7,

7.8 Hz, 1H), 5.17–5.10 (brs, 2H), 4.50–4.42 (m, 1H), 4.06–3.99 (m, 1H), 3.90 (dd, J = 2.7, 11.4 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 2.7, 11.4 Hz, 1H), 2.38 (ddd, J = 2.4, 5.7, 13.2 Hz, 1H), 2.16–2.04 (m, 1H), 1.95 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 3H), 0.12 (s, 3H). ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.6, 151.1, 137.0, 133.7, 129.2, 128.5, 127.7, 110.3, 87.0, 85.7, 72.6, 63.6, 44.6, 41.4, 26.0, 18.5, 13.5, –5.3, –5.4. Analytical data are consistent with the literature (Cunha et al., 2020).

Synthesis of Compound 3

To a solution of compound 2 (1 eq., 0.718 g, 1.82 mmol) into dry DCM (10 ml), was added under argon the palmitic acid (1.2 eq., 0.560 g, 2.18 mmol), the EDC. HCl (1.2 eq., 0.419 g, 2.18 mmol) and the DMAP (0.5 eq., 0.111 g, 0.90 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h and then quenched with water (10 ml). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 \times 30 ml), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound 3 as a white foam (1.19 g, quantitative yield).

R_f = 0.9 (Pentane/EtOAc: 70/30) ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.54 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.52–7.47 (m, 2H), 7.35–7.22 (m, 3H), 6.42 (dd, J = 5.1, 9.3 Hz, 1H), 5.30–5.23 (m, 1H), 5.19–5.09 (m, 2H), 4.10–4.05 (m, 1H), 3.98–3.86 (m, 2H), 2.40 (dd, J = 5.4, 13.8 Hz, 1H), 2.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.17–2.07 (m, 1H), 1.96 (d, J = 0.9 Hz, 3H), 1.70–1.57 (m, 2H), 1.38–1.21 (m, 26H), 0.94 (s, 9H), 0.98–0.85 (m, 3H), 0.14 (s, 3H), 0.14 (s, 3H). ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.6, 163.4, 151.1, 137.0, 133.3, 129.3, 128.4, 127.6, 110.5, 85.5, 75.3, 63.7, 44.6, 38.1, 34.3, 32.0, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 26.0, 24.9, 22.8, 18.4, 14.2, 13.3, –5.3, –5.4. Analytical Data Are Consistent With the Literature (Cunha et al., 2020).

Synthesis of Compound 5

To a solution of compound 3 (1 eq., 1.39 g, 2.03 mmol) into dry THF (20 ml) was added at 0°C, under argon the TBAF (1.2 eq., 0.590 ml, 2.03 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3 h and then quenched with water (20 ml). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 \times 30 ml) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide compound 5 as a white foam (0.821 g, 71%).

R_f = 0.3 (Pentane/EtOAc: 70/30). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.59 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.50–7.44 (m, 2H), 7.33–7.21 (m, 3H), 6.31 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.37–5.31 (m, 1H), 5.18–5.07 (m, 2H), 4.09–4.04 (m, 1H), 3.94–3.83 (m, 2H), 3.04 (brs, 1H), 2.41–2.28 (m, 4H), 1.92 (d, J = 0.6 Hz, 3H), 1.69–1.54 (m, 2H), 1.40–1.15 (m, 26H), 0.94–0.85 (m, 3H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.7, 163.5, 151.1, 136.8, 134.5, 129.2, 128.5, 127.7, 110.7, 86.6, 85.2, 74.7, 62.7, 44.6, 37.4, 34.2, 32.1, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 24.9, 22.8, 14.2, 13.5. Analytical Data Are Consistent With the Literature (Cunha et al., 2020).

Synthesis of Compound 7

To a suspension of nucleolipid 5 (1 eq., 500 mg, 0.88 mmol) into dry Toluene (10 ml), were added under argon the succinic anhydride (1 eq., 88 mg, 0.88 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 10 mg, 0.088 mmol). The reaction mixture was heated at 140°C and stirred for 2 h before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 80/20) to provide compound 7 as a colorless gum (350 mg, 60%).

$R_f = 0.1$ (Toluene/Acetone: 80/20). IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}) 2924, 2857, 1835, 1717, 1649, 1563, 1455, 1357, 1254, 1159, 1100, 1004, 926, 828, 752, 706, 620, 534. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.54–7.41 (m, 2H), 7.36–7.19 (m, 4H), 6.33 (dd, $J = 5.7$, 8.7 Hz, 1H), 5.25–5.04 (m, 3H), 4.38 (ddd, $J = 4.5$, 12.3, 16.2 Hz, 1H), 4.27–4.15 (m, 1H), 2.77–2.58 (m, 4H), 2.44 (dd, $J = 5.4$, 14.1 Hz, 1H), 2.31 (appearing t, $J = 7.2$, 7.8 Hz, 2H), 2.21–2.05 (m, 1H), 1.93 (brs, 3H), 1.69–1.54 (m, 2H), 1.39–1.18 (m, 24H), 0.95–0.81 (m, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 177.1, 173.5, 171.8, 163.4, 151.0, 136.8, 132.9, 129.3, 128.5, 127.7, 110.9, 85.6, 82.2, 74.0, 64.2, 44.7, 37.6, 34.2, 32.0, 29.8, 29.7, 29.5, 28.8, 28.7, 24.9, 22.8, 14.2, 13.5. HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 671.38293, found 671.39051.

Synthesis of Compound 4

To a solution of compound 2 (1 eq., 2.1 g, 5.3 mmol) into dry DCM (30 ml), was added under argon the arachidic acid (1.5 eq., 2.5, 8.0 mmol) the EDC. HCl (1.5 eq., 1.53 g, 8.0 mmol) and the DMAP (0.7 eq., 0.46 g, 3.7 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h and then quenched with water (30 ml). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 \times 30 ml), and the combined organic phases were dried over Na_2SO_4 before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide 4 as a white foam (3.64 g, quantitative yield).

$R_f = 0.9$ (Pentane/EtOAc: 70/30). IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}) 2926, 2855, 2254, 1736, 1703, 1668, 1645, 1496, 1464, 1404, 1352, 1321, 1294, 1259, 1166, 1126, 1079, 1004, 903, 833, 780, 701, 648, 616, 536, 495, 465. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.55 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.59–7.47 (m, 2H), 7.36–7.22 (m, 3H), 6.42 (dd, $J = 5.1$, 9.3 Hz, 1H), 5.29–5.23 (m, 1H), 5.21–5.08 (m, 2H), 4.11–4.06 (m, 1H), 3.98–3.86 (m, 2H), 2.41 (dd, $J = 5.4$, 13.8 Hz, 1H), 2.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.18–2.03 (m, 1H), 1.96 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.71–1.57 (m, 2H), 1.39–1.22 (m, 32H), 0.94 (s, 9H), 0.97–0.85 (m, 3H), 0.14 (s, 3H), 0.14 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 178.9, 173.6, 163.5, 151.1, 137.0, 133.3, 129.3, 128.5, 127.7, 110.6, 85.5, 75.3, 63.7, 44.6, 38.1, 34.3, 32.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.2, 26.0, 24.9, 22.8, 18.4, 14.2, 13.4, -5.3, -5.4. HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 741.51596, found 741.52431.

Synthesis of Compound 6

To a solution of compound 4 (1 eq., 1.28 g, 1.73 mmol) into dry THF (19 ml) was added at 0°C, under argon the TBAF (1.2 eq., 0.50 ml, 1.90 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 3 h and then quenched with water (20 ml). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3 \times 30 ml), and the

combined organic phases were dried over Na_2SO_4 before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Pentane/EtOAc: 70/30) to provide the compound 6 as a white foam (720 mg, 70%).

$R_f = 0.3$ (Pentane/EtOAc: 7/3). IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}) 3403, 2918, 2852, 2057, 1987, 1938, 1832, 1786, 1711, 1635, 1461, 1358, 1235, 1170, 1096, 992, 928, 718, 615, 536, 448, 432, 407. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.67–7.62 (m, 1H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.33–7.17 (m, 3H), 6.32 (appearing t, $J = 7.5$, 6.6 Hz, 1H), 5.37–5.30 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.08–4.02 (m, 1H), 3.89–3.83 (m, 2H), 3.54 (brs, 1H), 2.38–2.26 (m, 2H), 1.89 (brs, 3H), 1.68–1.56 (m, 2H), 1.35–1.22 (m, 32H), 0.92–0.83 (m, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 173.6, 163.5, 151.0, 136.7, 134.6, 129.0, 128.3, 127.6, 110.3, 86.3, 85.2, 74.8, 62.4, 44.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.8, 22.7, 14.1, 13.3. HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 627.42949, found 627.43718.

Synthesis of Compound 8

To a suspension of nucleolipid 6 (1 eq., 100 mg, 0.17 mmol) into dry toluene (10 ml), were added under argon the succinic anhydride (1 eq., 17 mg, 0.17 mmol) and the DMAP (0.1 eq., 2 mg, 0.017 mmol). The reaction was heated at 140°C and stirred for 4 h before concentration under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography over silica gel (Toluene/EtOAc: 80/20) to provide 8 as a colorless gum (75 mg, 66%).

$R_f = 0.1$ (Toluene/EtOAc: 8/2). IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}) 2923, 2853, 1738, 1705, 1668, 1645, 1496, 1454, 1352, 1317, 1272, 1247, 1157, 1102, 1078, 1002, 909, 826, 766, 732, 700, 618, 538, 495, 466, 421. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.54–7.43 (m, 2H), 7.38–7.22 (m, 4H), 6.33 (dd, $J = 5.7$, 8.7 Hz, 1H), 5.26–5.06 (m, 3H), 4.37 (ddd, $J = 4.5$, 12.3, 30.9 Hz, 2H), 4.24–4.16 (m, 1H), 2.77–2.59 (m, 4H), 2.43 (dd, $J = 5.4$, 14.1 Hz, 1H), 2.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.21–2.06 (m, 1H), 1.94 (brs, 3H), 1.71–1.53 (m, 2H), 1.41–1.18 (m, 34H), 0.93–0.81 (m, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 177.1, 173.5, 171.8, 163.4, 151.0, 136.9, 132.9, 129.3, 128.5, 127.8, 111.0, 85.6, 82.3, 74.0, 64.2, 44.7, 37.6, 34.2, 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.8, 28.6, 24.9, 22.8, 14.3, 13.5. HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 727.44553, found 727.45319.

Nanoemulsion Preparation and Characterization

NEs Formulation

For all experiments, O/W NE were used as freshly prepared, formulated with medium chain triglyceride oil (Miglyol® 812N) and two surfactants. To obtain the oily phase, 12 mg egg lecithin (Lipoid® E80) were dispersed in 200 mg 70°C heated oil phase Miglyol® 812N. The aqueous phase was composed of a dispersion of 25 mg Polysorbate 80 (Tween® 80) in the 70°C heated 800 mg Milli-Q water. NE-5 to NE-8 were loaded respectively with compounds 5 to 8, solubilized at various final concentrations in NEs at 1.8×10^4 μM for NL 5; 1.6×10^4 μM for NL 6; 1.5, 4.5 and 10.5×10^4 μM for NL 7; 1.4 and 4.2×10^4 μM for NL 8. To adjust osmolality for *in vitro* experiments, Glycerol at 2.25% was added to the

TABLE 1 | Composition of NEs loaded with acid-based NLs.

	NE-NL
NL content (%) w/w ^a	1–7%
Lipoïd [®] E80	1.2%
Miglyol [®] 812N	20%
Tween [®] 80	2.5%
Glycerol	2.25%
H ₂ O qs	100%

^aNLs final concentrations were set at 1% and, depending on their solubility in the oil phase, were set additionally at 3 and 7% for NL 7 and 3% for NL 8.

aqueous phase. Phase inversion, with previously prepared and heated phases and homogenization by sonication (Sonic Vibra Cell-VC 250), afforded the emulsion with submicron size range oil droplets. NEs typical composition in % w/w is given in **Table 1**.

NEs Characterization

Physical characteristics of all NEs were assessed by dynamic light scattering (DLS) using Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). NEs were diluted at 1/2500 (v/v), and the average size and the polydispersity index were determined by three independent measurements performed at 25°C. To analyze the ζ -potential, NEs were diluted at 1/1500 (v/v), and measurements were performed using Zetasizer Nano ZS coupled with a folded capillary cell (DTS1060) from Malvern Instruments. Colloidal stability of loaded NEs was demonstrated for at least 3 months. The droplet's mean diameter, index of polydispersity, and ζ -potential remained stable during the study. The macroscopic aspect showed no phase separation nor creaming during all study time.

Cell Culture and Cell Viability Assay of Nucleolipid-Loaded Nanoemulsions

Human neuroblastoma cell lines BE(2)-M17 were obtained from ATCC (CRL-2267) (Filograna et al., 2015) and grown in OPTIMEM (Life Technologies, 31985-047) plus 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). ATP13A2 stable knockdown BE-(2)-M17 (shATP13A2(403-1)) human dopaminergic neuroblastoma cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in OPTIMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, and 2 mg/ml puromycin (Sigma-Aldrich). For NE treatments, cells were grown at 70–80% confluence and treated for 24 h with 1 μ L of NE diluted to 1/1000. Each experiment was reproduced at least in three independent series. Cell viability was estimated by MTT assay (ATCC/LGC Promochem) following manufacturer instructions.

Lysosomal pH Measurement

Quantification of lysosomal pH was determined using dextran conjugates LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (Life Technologies) and was performed as previously described (Bourdenx et al., 2016; Dehay et al., 2012). Briefly, control and mutant ATP13A2 cells were grown in their respective

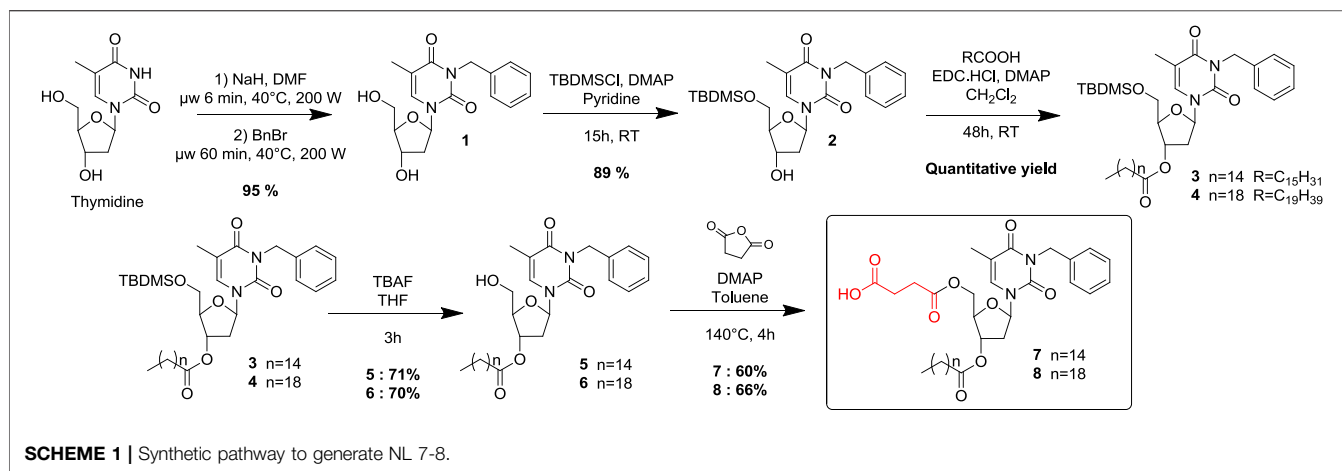
media. Cells were then trypsinized, harvested (1×10^6 cells/mL), and loaded with 1 mg/ml of LysoSensor-dextran for 1 h at 37°C with 5% CO₂. The cells were then washed 3 \times in HBSS (Gibco, 14060) and aliquoted at 100 μ l into a black 96-well microplate. pH calibration was performed as previously described. Wild-type and mutant cells were treated with 10 mM monensin (Sigma-Aldrich) and 10 mM nigericin (Sigma-Aldrich) in MES buffer (5 mM NaCl, 115 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 25 mM MES), with the pH adjusted to a range from 3.5 to 7.0. The samples were read in a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) with excitation at 355 nm. The ratio of emission 440/535 nm was then calculated for each sample. The pH values were determined from the standard linear curve generated via the pH calibration samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and Synthesis of the Nucleolipid-Based Platform

Two original NLs (compounds 7 and 8) bearing a succinic acid moiety at the 5' position and respectively palmitate and arachidate esters at the 3' position, were designed, synthesized, and biologically evaluated as lysosomal pH modulators. Commercially available thymidine was used as a synthetic platform, and key positions were conveniently functionalized step-by-step (**Scheme 1**). Previous work has shown that a benzyl group, conveniently inserted at the N-3 position, increased sufficiently the lipophilicity to allow the compound to be solubilized in oil and then provide its subsequent incorporation into an O/W NE (Cunha et al., 2020). A benzyl group was then selectively introduced at the N-3 position of thymidine, using a microwave-assisted activation step as described in the literature (Hamoud et al., 2018). Then the hydroxyl at 5' position was protected as a silylated ether. A classical esterification step with two different monocatenar fatty chains (palmitic, arachidic acids) at 3' position provided compounds 3 and 4 in quantitative yields. The choice of the optimal length of the fatty chains was made in agreement with the previous results (Cunha et al., 2020). The silylated ether was then cleaved under classical conditions before the last step to functionalize the hydroxyl at 5' as succinate. Various attempts to provide selective esterification with succinic acid became unsuccessful; succinate was then introduced by opening succinic anhydride under robust desymmetrization conditions (Catry and Madder, 2007). This straightforward five-step sequence provided efficiently acidic NLs 7-8 with fatty chains of 16 and 20 carbons, respectively. Under physiological conditions, compounds 7-8 should be cleaved to release the active succinic acid and regenerate the corresponding precursors 5 and 6, respectively. 5 and 6 are themselves also degradable, releasing palmitic and arachidic acid.

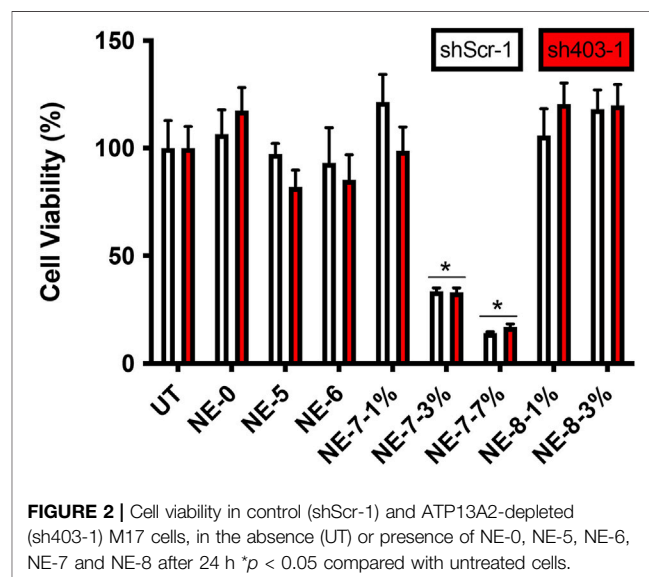
O/W NEs have an excellent loading capacity for hydrophobic drugs while improving their stability compared to other lipidic formulations, i.e., liposomes

**TABLE 2** | Physico-chemical characteristics of selected NEs: unloaded one, and those loaded with the effective NL.

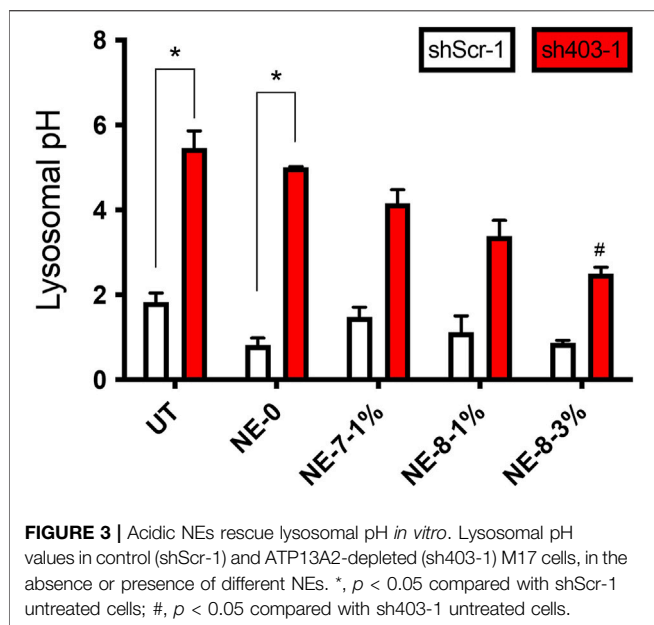
	NE-0		NE-8-1%		NE-8-3%	
	T0	3 months	T0	3 months	T0	3 months
Droplets mean diameter (nm)	175.2 ± 1.36	175.9 ± 2.48	156.5 ± 2.71	155.6 ± 1.56	198.8 ± 2.65	193.6 ± 3.17
Polydispersity index	0.125	0.111	0.099	0.087	0.135	0.124
Zeta potential (mv)	-31.2 ± 1.8	-22.9 ± 0.1	-34.4 ± 1.0	-28.2 ± 2.3	-33.8 ± 0.8	-29.3 ± 1.2

used in clinics (Sainsbury et al., 2014). Indeed, the very small droplet size in the nanometric scale NEs makes them suitable for intravenous drug delivery. All NEs were formulated with 20% medium-chain triglyceride oil (Miglyol® 812N), 1.2% lecithin 80, 2.5% polysorbate 80 surfactant. An unloaded NE, NE-0 was used as a control. NLs acids 7-8 and intermediates 5-6 were respectively loaded in NEs NE-5, NE-6, NE-7, NE-8 with final concentrations from 1 to 7% (w/w), depending on their solubility in oil. The loading was successfully performed without altering the physical parameters, i.e., mean droplets size, granulometric profiles, and zeta potential, compared to the unloaded NE. However, a slight increase of the NE's hydrodynamic mean diameter was observed for the highest concentrations of the loaded NLs for both NE-8 and NE-7 (data not shown). This modification did not alter the granulometric profile that stayed narrow with PDI below 0.2 or the system's stability. Finally, compared to commonly commercialized intravenous drug-loaded NEs such as Propofol, exhibiting mean diameters between 250 and 280 nm, the slight increase of the hydrodynamic diameter did not alter the capacity of the system to be intravenously administered (Patil et al., 2019).

Analysis by DLS displayed an average diameter lower than 200 nm. This size is consistent for nanoobjects to be easily uptaken into cells and to colocalize subcellular organelles. A monodisperse distribution with a submicronic size range and ζ -potential values around -35 mV were also measured. Negative



zeta potential is compatible with brain targeting and is recognized as non-toxic in comparison to cationic NEs (Lockman et al., 2004). Thus, negatively charged nanocarriers are privileged. All our formulations exhibited stable parameters for at least 3 months, as shown by compound 8 being the most effective (NE-8-1% was loaded with 1% w/w of NL 8, NE-8-3% was loaded with 3% w/w of NL 8). (Table 2).



Acidic Nanoemulsions Rescue Lysosomal pH *in Vitro*

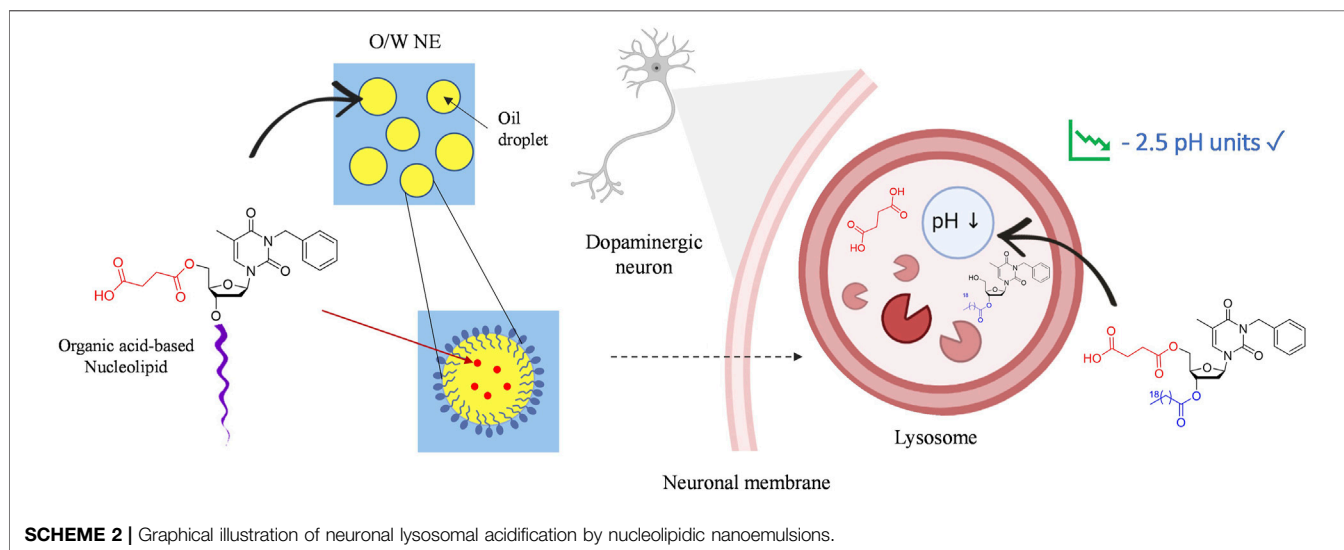
Succinic acid is a biocompatible dicarboxylic acid present in all living organisms. This molecule is involved in cellular metabolism, particularly in the lipid metabolism. To investigate whether our NEs, loaded with our succinic-acid-based prodrugs at various concentrations, exhibit a cellular cytotoxicity, human neuroblastoma cells were exposed to them for 24 h. First, *in vitro* viability assays, with NEs diluted to 1/1000, confirmed that acidic NE-8 loaded with the arachidic derivative NL 8 (1 and 3% w/w concentrations) did not induce cell death for the loading rates tested (Figure 2). Moreover, NE-5 and NE-6, loaded respectively with 5 and 6, intermediates resulting from the partial degradation of the final prodrugs, did not induce any cytotoxicity either. However, the biological evaluation showed

cytotoxicity for NE-7, bearing a palmitic acid chain at 3' position, for the nanoemulsions loaded with 3 and 7% w/w of NL 7. It was not possible to perform viability assays with NE-5 and NE-6 at the same 3% w/w concentration as NE-7-3%, making it challenging to explain the cytotoxicity observed for NE-7. Further biological work will be necessary to raise this point. Thus, the results highlight the biocompatibility of our NEs, paving the way to test their effect on the lysosomal pH assessment.

Lysosomal pH was assessed on M17 neuronal cell line stably depleted of ATP13A2, a lysosomal type 5 P-type ATPase. This cellular model displays abnormally high pH in their lysosomes since an impairment of ATP13A2 function increases lysosomal pH (Usenovic and Krainc, 2012; Dehay et al., 2013; Bento et al., 2016; Bourdenx et al., 2016). *In vitro* investigations on the effect of NL-NE on lysosomal pH highlighted that NE loaded with the longest fatty chains-based NLs turned out to be adequate to recover the acidic medium to normal levels (pH = 3), without lowering the lysosomal pH of control cells. The NE loaded incubated for 24 h, allowed a significant restoration of the lysosomal pH (Figure 3). It is assumed that the final acidification resulting from the *in vitro* degradation of the NL 7-8, is potentially due to the release of a mixture of the constitutive acids, including succinic acid. It looks like an active substance concentration of 7 μM starts to acidify the medium, while a concentration of 40 μM allows a total recovery of the lysosomal acidification defects. These results are promising for using such nanocarriers as tools to rescue lysosomal function *in vitro* in ATP13A2-knockdown cells with acidic NL-based NEs.

CONCLUSION

A functional lysosome is crucial for maintaining proper cellular and neuronal function. Hence, targeting lysosomal impairment is becoming an increasingly important goal in developing treatments for many diseases including neurodegenerative diseases. In this context, restoring its dysfunctional acidic medium could provide a therapeutic option. To overcome the shortcomings of the current chemical arsenal mainly based on



PLGA polymeric NPs, the first low molecular weight acid-based NL nanocarriers were developed to formulate and carry the biocompatible organic succinic diacid to the lysosome. A straightforward five-step sequence, starting from thymidine, afforded acidic NLs 7-8, bearing 16 and 20 carbons saturated fatty chains respectively in good overall yields. O/W NEs were loaded with NLs acids 7-8 and their precursors 5-6 to provide stable nanosystems: NE-5, NE-6, NE-7, NE-8. NEs' formulation was designed with commonly used intravenous excipients to help the further transfer from laboratory bench side to patient bedside. *In vitro*, NE-8-3% ($c = 40 \mu\text{M}$ of active substance), was shown not only to cross the membrane without any cytotoxicity but also to completely restore the acidic pH of the lysosome in a genetic cell model of Parkinson's disease.

This very positive result, equivalent to that obtained with PLGA, shows that it is possible to overcome the limits of the use of this polymer. Varying the nature of the organic acid could provide a released acidification modulation. Moreover, the NL was developed as a synthetic platform that can be tuned to carry other active ingredients. Further *in vivo* studies will focus on the transposability of this innovative therapeutic approach and evaluate the ability of the DNA-based nanocarrier to cross the BBB. A positive outcome would allow us to consider NL functionalization with suitable active substances for other neurodegenerative diseases.

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

REFERENCES

- Benizri, S., Ferey, L., Alies, B., Mebarek, N., Vacher, G., Appavoo, A., et al. (2018). Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res. Lett.* 13, 17. doi:10.1186/s11671-017-2420-2
- Bento, C. F., Ashkenazi, A., Jimenez-Sanchez, M., and Rubinsztein, D. C. (2016). The Parkinson's Disease-Associated Genes ATP13A2 and SYT11 Regulate Autophagy via a Common Pathway. *Nat. Commun.* 7, 11803. doi:10.1038/ncomms11803
- Bonam, S. R., Wang, F., and Muller, S. (2019). Lysosomes as a Therapeutic Target. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 923–948. doi:10.1038/s41573-019-0036-1
- Bourdenx, M., Daniel, J., Genin, E., Soria, F. N., Blanchard-Desce, M., Bezard, E., et al. (2016). Nanoparticles Restore Lysosomal Acidification Defects: Implications for Parkinson and Other Lysosomal-Related Diseases. *Autophagy* 12, 472–483. doi:10.1080/15548627.2015.1136769
- Catry, M., and Madder, A. (2007). Synthesis of Functionalised Nucleosides for Incorporation into Nucleic Acid-Based Serine Protease Mimics. *Molecules* 12, 114–129. doi:10.3390/12010114
- Colacurcio, D. J., and Nixon, R. A. (2016). Disorders of Lysosomal Acidification—The Emerging Role of V-ATPase in Aging and Neurodegenerative Disease. *Ageing Res. Rev.* 32, 75–88. doi:10.1016/j.arr.2016.05.004
- Cunha, A., Gaubert, A., Latxague, L., and Dehay, B. (2021). PLGA-based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BD and VD are co-corresponding authors. MB and BD carried out experiments. VD designed the synthetic nucleolipid acid target and the synthetic pathway, SC-M designed the formulation and physico-chemistry experiments, and BD designed the biological experiments. BD, SC-M, and VD analyzed the data and wrote the manuscript. MB, VD and BD wrote the experimental part. PB proofread the manuscript. BD, SC-M, VD and PB secured the funding. All authors read and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by an IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (BD). STS department (Sciences and Technologies for Health) of the University of Bordeaux provided open access publication fees (VD).

ACKNOWLEDGMENTS

MB is a recipient of an MSER fellowship (France). INSERM, CNRS, and the University of Bordeaux provided financial and infrastructural support. We thank Marie-Laure Thiolat for technical assistance in cell culture. The authors gratefully acknowledge Anceline Willemaers for her support and for proofreading the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.736554/full#supplementary-material>

- Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics* 13, 1042. doi:10.3390/pharmaceutics13071042
- Cunha, A., Prévot, G., Mousli, Y., Barthélémy, P., Crauste-Manciet, S., Dehay, B., et al. (2020). Synthesis and Intracellular Uptake of Rhodamine-Nucleolipid Conjugates into a Nanoemulsion Vehicle. *ACS Omega* 5, 5815–5823. doi:10.1021/acsomega.9b03992
- Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., et al. (2010). Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 30, 12535–12544. doi:10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010
- Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., Yue, Z., Cookson, M. R., et al. (2013). Lysosomal Impairment in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 28, 725–732. doi:10.1002/mds.25462
- Dehay, B., Ramirez, A., Martinez-Vicente, M., Perier, C., Canron, M.-H., Doudnikoff, E., et al. (2012). Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 Function Induces General Lysosomal Deficiency and Leads to Parkinson Disease Neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 9611–9616. doi:10.1073/pnas.1112368109
- Edelmann, M. J., and Maegawa, G. H. B. (2020). CNS-targeting Therapies for Lysosomal Storage Diseases: Current Advances and Challenges. *Front. Mol. Biosci.* 7, 559804. doi:10.3389/fmolb.2020.559804
- Filigrana, R., Civiero, L., Ferrari, V., Codolo, G., Greggio, E., Bubacco, L., et al. (2015). Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-Sy5y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation. *PLoS ONE* 10 (8), e0136769. doi:10.1371/journal.pone.0136769

- Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M. W., and Barthélémy, P. (2008). Nucleoside, Nucleotide and Oligonucleotide Based Amphiphiles: a Successful Marriage of Nucleic Acids with Lipids. *Org. Biomol. Chem.* 6, 1324–1333. doi:10.1039/b719280k
- Hafner Česen, M., Pegan, K., Špes, A., and Turk, B. (2012). Lysosomal Pathways to Cell Death and Their Therapeutic Applications. *Exp. Cel Res.* 318, 1245–1251. doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.005
- Hamoud, A., Barthélémy, P., and Desvergnès, V. (2018). An Organocatalyzed Stetter Reaction as a Bio-Inspired Tool for the Synthesis of Nucleic Acid-Based Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* 16, 1760–1769. doi:10.1039/C8OB00192H
- Karami, Z., Saghatchi Zanjani, M. R., and Hamidi, M. (2019). Nanoemulsions in CNS Drug Delivery: Recent Developments, Impacts and Challenges. *Drug Discov. Today* 24, 1104–1115. doi:10.1016/j.drudis.2019.03.021
- Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome Fusion Depends on the pH in Acidic Compartments in CHO Cells. *Autophagy* 3, 154–157. doi:10.4161/auto.3634
- Koh, J.-Y., Kim, H. N., Hwang, J. J., Kim, Y.-H., and Park, S. E. (2019). Lysosomal Dysfunction in Proteinopathic Neurodegenerative Disorders: Possible Therapeutic Roles of cAMP and Zinc. *Mol. Brain* 12, 18. doi:10.1186/s13041-019-0439-2
- Lie, P. P. Y., and Nixon, R. A. (2019). Lysosome Trafficking and Signaling in Health and Neurodegenerative Diseases. *Neurobiol. Dis.* 122, 94–105. doi:10.1016/j.nbd.2018.05.015
- Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J., and Allen, D. D. (2004). Nanoparticle Surface Charges Alter Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability. *J. Drug Target.* 12, 635–641. doi:10.1080/10611860400015936
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., and Bright, N. A. (2007). Lysosomes: Fusion and Function. *Nat. Rev. Mol. Cel Biol* 8, 622–632. doi:10.1038/nrm2217
- Marques, A. R. A., and Saftig, P. (2019). Lysosomal Storage Disorders - Challenges, Concepts and Avenues for Therapy: beyond Rare Diseases. *J. Cel Sci* 132, jcs2211739. doi:10.1242/jcs.221739
- Patil, S. M., Li, V., Peng, J., Kozak, D., Xu, J., Cai, B., et al. (2019). A Simple and Noninvasive DOSY NMR Method for Droplet Size Measurement of Intact Oil-In-Water Emulsion Drug Products. *J. Pharm. Sci.* 108, 815–820. doi:10.1016/j.xphs.2018.09.027
- Peng, W., Minakaki, G., Nguyen, M., and Krainc, D. (2019). Preserving Lysosomal Function in the Aging Brain: Insights from Neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 16, 611–634. doi:10.1007/s13311-019-00742-3
- Prévot, G., Soria, F. N., Thiolat, M.-L., Daniel, J., Verlhac, J. B., Blanchard-Desce, M., et al. (2018). Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconj. Chem.* 29, 4083–4089. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00697
- Rathore, B., Sunwoo, K., Jangili, P., Kim, J., Kim, J. H., Huang, M., et al. (2019). Nanomaterial Designing Strategies Related to Cell Lysosome and Their Biomedical Applications: A Review. *Biomaterials* 211, 25–47. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.05.002
- Sainsbury, F., Zeng, B., and Middelberg, A. P. (2014). Towards Designer Nanoemulsions for Precision Delivery of Therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 4, 11–17. doi:10.1016/j.coche.2013.12.007
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the Lysosome: a Control centre for Cellular Clearance and Energy Metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cel Biol* 14, 283–296. doi:10.1038/nrm3565
- Simeone, L., Mangiapia, G., Irace, C., Di Pascale, A., Colonna, A., Ortona, O., et al. (2011). Nucleolipid Nanovectors as Molecular Carriers for Potential Applications in Drug Delivery. *Mol. Biosyst.* 7, 3075–3086. doi:10.1039/c1mb05143a
- Swastika, S., Chaturvedi, A., Hazari, P. P., Jha, P., Pal, S., et al. (2019). Evaluation of BBB Permeable Nucleolipid (NLDPU): A Di-C15-ketalised Palmitone Appended Uridine as Neuro-Tracer for SPECT. *Int. J. Pharmaceutics* 565, 269–282. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.074
- Usenovic, M., and Krainc, D. (2012). Lysosomal Dysfunction in Neurodegeneration. *Autophagy* 8, 987–988. doi:10.4161/auto.20256
- Yim, W. W.-Y., and Mizushima, N. (2020). Lysosome Biology in Autophagy. *Cell Discov* 6, 6. doi:10.1038/s41421-020-0141-7
- Zeng, J., Martin, A., Han, X., Shirihai, O. S., and Grinstaff, M. W. (2019). Biodegradable PLGA Nanoparticles Restore Lysosomal Acidity and Protect Neural PC-12 Cells against Mitochondrial Toxicity. *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 13910–13917. doi:10.1021/acs.iecr.9b02003
- Zeng, J., Shirihai, O. S., and Grinstaff, M. W. (2020). Modulating Lysosomal pH: a Molecular and Nanoscale Materials Design Perspective. *JoLS* 2, 25–37. doi:10.36069/jols/20201204
- Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., and Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater.* 21, 419–424. doi:10.1002/adma.200801393
- Zhou, X., Wang, S., Zhu, Y., Pan, Y., Zhang, L., and Yang, Z. (2020). Overcoming the Delivery Barrier of Oligonucleotide Drugs and Enhancing Nucleoside Drug Efficiency: The Use of Nucleolipids. *Med. Res. Rev.* 40, 1178–1199. doi:10.1002/med.21652

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Brouillard, Barthélémy, Dehay, Crauste-Manciet and Desvergnès. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



July 9th, 2021

The SCT Poster Prize
was given at
the 56th RICT-International Conference on Medicinal Chemistry to:

BROUILLARD Mathias, University of Bordeaux, France
P013 - SYNTHESIS AND FORMULATION OF ACID-BASED NUCLEOLIPIDS FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES

Prof. Rebecca DEPRez-POULAIN, SCT President

www.sct-asso.fr

Titre : Conception, synthèse et formulation de nanoémulsions de nucléolipides pour les maladies neurodégénératives

Résumé : Les maladies neurodégénératives sont des maladies chroniques courantes engendrant une forte dépendance et dont la fréquence augmente avec l'avancée en âge. Les thérapies actuelles ne soignent que les symptômes faisant du développement de nouveaux traitements un réel enjeu sociétal et un défi important pour la recherche. Une des difficultés dans le développement de thérapeutiques est de permettre le passage des membranes biologiques et notamment de la Barrière Hémato-Encéphalique, qui lorsqu'elle est intègre, empêche le passage cérébral de 98% des molécules. Les nanoémulsions (NE) lipophile dans hydrophile (L/H) sont des nanosystèmes véhicules ou vecteurs de substances actives lipophiles favorisant le passage cérébral. Des résultats antérieurs de l'équipe ont par ailleurs montré que les nucléolipides pourraient être des candidats pour faciliter le passage de la BHE en agissant comme des promoteurs d'absorption. Le travail de cette thèse a porté sur la conception d'une plateforme nucléolipidique lipophile, non virale et formulable au sein d'une nanoémulsion (L/H). La maladie de Parkinson (200 000 cas en France pour une incidence de 25 000 cas par an), est liée à la dégradation et disparition progressive des neurones dopaminergiques. L'altération de la fonction lysosomale, et notamment de son pH, sont aujourd'hui admis comme un facteur clé de la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson. Le pH de ces organites intracellulaires est anormalement élevé dans les neurones dopaminergiques dysfonctionnels. La restauration de l'acidité des lysosomes représente une stratégie prometteuse pour une action thérapeutique mais seuls quelques agents ciblant spécifiquement le pH lysosomal ont été rapportés à ce jour. Des monomères nucléolipides et des analogues multimères ont été conçus comme des prodrogues bioinspirées et biodégradables, portant une ou plusieurs entités d'acide succinique biocompatible comme substance active. Ces nucléolipides prodrogues ont pu être formulés avec succès au sein de nanoémulsions L/H. Leur évaluation biologique *in vitro* sur cellules humaines modèles de la maladie de parkinson a montré leur capacité à être internalisés et à restaurer le pH lysosomal sans effet cytotoxique. La même stratégie, consistant à développer un nanovecteur lipidique, a été appliquée à la maladie d'Alzheimer en synthétisant cette fois des hybrides nucléolipides peptides. En effet, certains peptides dont le peptide KLVFFA sont connus pour inhiber efficacement la fibrillation amyloïde pathologique. La synthèse de composés peptidiques rendus lipophiles, formulés au sein de NE, permettrait ainsi d'envisager un développement thérapeutique ultérieur. Nos premiers résultats prometteurs, obtenus sur l'acidification des lysosomes dans le cadre de la maladie de Parkinson, ouvrent la voie à l'utilisation de nucléolipides synthétiques originaux dans le traitement d'autres pathologies impliquant une dysfonction lysosomale.

Mots clés : Nucléolipide, Nanoémulsion (L/H), Maladies neurodégénératives, Lysosome, Parkinson, Alzheimer.

Title: Conception, synthesis, and formulation into nanoemulsions of nucleolipids for neurodegenerative diseases

Abstract: Neurodegenerative diseases are common chronic illnesses that lead to a high level of dependence and whose frequency increases with advancing age. As current therapies only treat the symptoms, the development of innovative treatments represents a real challenge for society and for research. The crossing of biological membranes, and in particular the blood-brain barrier, is one of the major difficulties in the development of therapeutics. Indeed, the BBB prevents the cerebral passage of 98% of molecules. Lipophilic-in-hydrophilic (L/H) nanoemulsions (NE) are nanosystems that are vehicles or vectors for lipophilic active substances favoring cerebral passage. Previous results of our team have also shown that nucleolipids could be candidates to facilitate BBB passage by acting as absorption promoters. The work of this thesis focused on the design of a lipophilic, non-viral nucleolipid platform that can be formulated within a nanoemulsion (L/H). Parkinson's disease (200,000 cases in France with an incidence of 25,000 cases per year) is linked to the degradation and progressive disappearance of dopaminergic neurons. The impairment of the lysosomal function, and of its pH, is now admitted as a key factor of the neurodegeneration in this disease. The pH of these intracellular organelles is abnormally high in dysfunctional dopaminergic neurons. Restoring the acidity of lysosomes represents a promising strategy for therapeutic action but only a few agents targeting specifically lysosomal pH have been reported to date. Nucleolipid monomers and multimeric analogues have been then designed as bioinspired and biodegradable prodrugs, carrying one or more biocompatible succinic acid moieties as active substance. These nucleolipid prodrugs could be successfully formulated into L/H nanoemulsions. The *in vitro* biological evaluation in human Parkinson's disease model cells highlighted their ability to be internalized and to fully restore lysosomal pH without cytotoxic effect. The same strategy, based on a lipidic nanovector development, was applied to Alzheimer's disease, by synthesizing nucleolipid peptide hybrids. Indeed, as other peptides, KLVFFA was reported to inhibit pathological amyloid fibrillation. The synthesis of lipophilic peptidic compounds, formulated within NE, would thus make it possible to envisage further therapeutic development. Our first promising results on lysosome acidification in Parkinson's disease pave the way for the use of novel synthetic nucleolipids in the treatment of other diseases involving lysosomal dysfunction.

Keywords: Nucleolipid, (L/H) Nanoemulsion, Neurodegenerative diseases, Lysosome, Parkinson, Alzheimer

Unité de recherche

ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux, Bâtiment Pharmacie, 3ème tranche, 4ème étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France