

# Thèse de doctorat de l'Université Paris VI

Spécialité

## Chimie Moléculaire

Présentée par

**Jeanne Leblond**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

# Conception, synthèse et évaluation de systèmes de vectorisation non cationiques de l'ADN

Soutenue le 21 décembre 2005, devant le jury composé de :

<b>Mme Solange Lavielle</b>	Professeur à l'Université Paris VI	Présidente du jury
<b>M. Philippe Barthélémy</b>	Professeur à l'Université de Bordeaux II	Rapporteur
<b>M. Guy Zuber</b>	Chargé de recherche, CNRS, Illkirch	Rapporteur
<b>M. Jean Herscovici</b>	Directeur de recherche, CNRS, Paris	Directeur de thèse
<b>M. Daniel Scherman</b>	Directeur de recherche, INSERM, Paris	Directeur de l'unité

Ce travail a été réalisé dans  
l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique (UPCG)  
U 640 – UMR 8151

Dirigée par le Dr Daniel Scherman  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
4 avenue de l'observatoire 75270 Paris Cedex 06  
01 53 10 12 95

Sous la direction du Dr Jean Herscovici  
École Nationale Supérieure de Chimie de Paris  
11 rue Pierre et Marie Curie 75231 Paris Cedex 05  
01 53 73 95 59

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le docteur Daniel Scherman de m'avoir accueillie dans son unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'avoir encouragé mes recherches.

J'adresse ma profonde reconnaissance au docteur Jean Herscovici qui m'a encadrée au long de cette thèse. Son écoute et sa disponibilité ont largement contribué au succès de ce travail.

Solange Lavielle, Philippe Barthélémy et Guy Zuber ont accepté d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

Je voudrais dire un immense merci au docteur Nathalie Mignet pour son implication au niveau physico-chimique et biologique. Au-delà de ses compétences, je la remercie pour son dynamisme et son efficacité. Je remercie Céline Largeau pour son aide et sa disponibilité dans les manip vitro, et Johanne Seguin sans qui les expériences vivo n'auraient pas été possibles.

Je ne voudrais pas oublier tous ceux qui ont participé à ce travail : Serge Fermandjian, Loussinée et Anthony pour le dichroïsme circulaire, l'équipe du service d'analyses du CNRS, Marie-Noëlle, Laurianne et Pascale pour leur aide en RMN, les stagiaires Céline, Florence, Paul-Alexandre, Lucie, Gaëlle, et tous ceux qui ont relu cette thèse : Christian, Esra, Cyrille, Marie, Sébastien, Françoise, Anne-Laure.

Je remercie du fond du cœur toute l'équipe de l'ENSCP avec qui j'ai passé trois années très agréables : M. Antonakis, Patrick, Marie-Jo, Christian (merci de répondre toujours avec autant de gentillesse à mes questions !), je pense aussi à tous ceux qui sont restés plus ou moins longtemps et qui ont rendu l'ambiance fort sympathique : Isabelle, Marie-Laure, Yves, Laurence, Cristine, Marie, Betty, Nada, Ibtissem, Maria-Vittoria, Sophie... Un merci tout particulier à Esra, avec qui j'ai partagé bureau et labo, pour nos échanges si sincères.

Je voudrais encore remercier tous les membres de l'unité pour leur accueil et la bonne humeur générale et les échanges enrichissants que nous avons eus. Merci à Marie, Nathalie, Johanne pour les bons moments passés ensemble et pour leur amitié.

Mille mercis à Cédric pour son soutien de chaque instant, aussi bien moral que technique (quels beaux schémas !), et pour la confiance qu'il me donne.

Merci enfin à tous ceux qui, de près ou de loin, se sont intéressés à mon travail et m'ont encouragée pendant ces trois années.

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION SUR LES VECTEURS DE GENES .....</b>	<b>9</b>
A. LA THERAPIE GENIQUE .....	9
1. Principe et Résultats .....	9
2. Les vecteurs viraux .....	13
3. Les vecteurs non viraux .....	17
B. LES VECTEURS CATIONIQUES .....	22
1. Lipides cationiques .....	22
2. Les polymères cationiques .....	25
3. Barrières au transfert de gènes.....	27
C. LES VECTEURS NON CATIONIQUES.....	34
1. Vecteurs anioniques.....	34
2. Les vecteurs neutres existants.....	34
3. Vers un nouveau type d'interaction avec l'ADN.....	38
D. LES LIPOPOLYTHIOUREES .....	39
1. La fonction thiourée.....	39
2. Résultats du lipide DT3TU .....	41
3. Conclusion.....	44
<b>II. OBJECTIF DU TRAVAIL.....</b>	<b>45</b>
A. DEFINITION DU PROJET .....	45
B. REALISATION.....	46
1. Les éléments fixes .....	46
2. Structure de la famille de lipopolythiourées.....	46
3. Les éléments variables.....	47
<b>III. SYNTHÈSE D'UNE FAMILLE DE LIPOPOLYTHIOUREES .....</b>	<b>49</b>
A. GENERALITES .....	49
1. Stratégie.....	49
2. Réactions « clé ».....	49
B. PREPARATION DES PREMIERES LIPOPOLYTHIOUREES .....	51
1. Rétrosynthèse.....	51
2. Synthèse des précurseurs .....	53
3. Assemblage du vecteur.....	55
C. VARIATION DE L'ESPACEUR ET DU REPARTITEUR .....	57
1. Espaceurs succinique et diglycolique .....	58
2. Espaceur PEG .....	64
3. Répartiteur dissymétrique.....	68
D. VARIATION DES TERMINAISONS.....	71
1. Terminaison alcool.....	71
2. Terminaison diol.....	72
3. Terminaison méthyle.....	72
4. Terminaison imidazole.....	73
E. VARIATION DE L'ANCRE HYDROPHOBE .....	74
1. Longueur des chaînes aliphatiques.....	74
2. Ancre cholestérol.....	78
F. SYNTHÈSE D'UNE THIOUREE FLUORESCENTE .....	79
1. Rétrosynthèse.....	79

2. Synthèse .....	81
G. CONCLUSION .....	82
1. Bilan des vecteurs synthétisés .....	82
2. Conclusion .....	83
<b>IV. ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES LIPOPOLYTHIOUREES SYNTHETISEES .....</b>	<b>87</b>
A. STRATEGIE ET METHODES .....	87
1. Méthodes physico-chimiques .....	87
2. Critères d'évaluation biologique .....	93
B. EVALUATION DES FORMULATIONS DES LIPOPOLYTHIOUREES .....	94
1. Validité du modèle .....	94
2. Evaluation systématique des lipopolythiourées .....	96
3. Automatisation de la formulation .....	100
C. ETUDES BIOPHYSIQUES .....	102
1. Accessibilité de l'ADN .....	102
2. Morphologie des complexes lipopolythiourée/ADN .....	103
3. Conformation de l'ADN .....	104
4. Protection de l'ADN par les complexes .....	106
D. EVALUATION IN VITRO .....	108
1. Efficacité de transfection .....	108
2. Etudes de ciblage .....	111
3. Toxicité in vitro .....	113
E. EVALUATION IN VIVO .....	117
1. Toxicité in vivo .....	117
2. Efficacité de transfection intratumorale .....	118
3. Biodistribution .....	118
F. CONCLUSION .....	120
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>121</b>
A. LES LIPOPOLYTHIOUREES .....	121
1. Stabilité des lipopolythiourées .....	121
2. Etude de la charge des complexes .....	121
3. Toxicité .....	125
4. Comparaison des lipopolythiourées avec le lipide DT3TU et les systèmes cationiques .....	126
B. ETUDES STRUCTURE/PROPRIETES .....	127
1. Influence de l'espaceur et du répartiteur .....	128
2. Influence de la terminaison .....	128
3. Influence de la chaîne : famille lysine .....	130
4. Influence de la chaîne : famille diglycolique .....	131
C. ETUDE MECANISTIQUE .....	132
1. Voie d'entrée dans la cellule .....	132
2. Sortie de l'endosome .....	136
D. CONCLUSION .....	138
<b>VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>141</b>
<b>VII. PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>143</b>
<b>VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>195</b>

# ABREVIATIONS

<b>AAV</b>	Virus Associé aux adénovirus
<b>AcOEt</b>	acétate d'éthyle
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AFM</b>	Microscopie à Force Atomique
<b>APTS</b>	acide <i>para</i> -toluène sulfonique
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>BAIB</b>	[bis-(acétoxy)-iodo]-benzène
<b>BET</b>	bromure d'éthidium
<b>BGTC</b>	bis-guanidinium-tren-cholestérol
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
<b>CCM</b>	chromatographie sur couche mince
<b>CHEMS</b>	cholestérol hémi-succinate
<b>CholPEG<sub>2000</sub></b>	cholestérol couplé à un polyéthylène glycol de poids moléculaire 2000
<b>CLHP</b>	chromatographie liquide à haute pression
<b>CMV</b>	cytomégalovirus
<b>DCC</b>	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
<b>DC-Chol</b>	3-β-[ <i>N</i> -( <i>N</i> ', <i>N</i> '-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol
<b>DIPEA</b>	di-isopropyléthylamine
<b>DMAP</b>	4-diméthylammonipyridine
<b>DMF</b>	diméthylformamide
<b>DMRIE</b>	dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthyl ammonium
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>DNases</b>	enzymes de dégradation de l'ADN
<b>DODA</b>	dioctadécylamine
<b>DOGS</b>	di-octadécylamido-glycyl-spermine
<b>DOPE</b>	di-oléylphosphatidyléthanolamine
<b>DOPG</b>	di-oléoylphosphatidylglycérol
<b>DOTAP</b>	1,2-bis(oléoyloxy)-3-(triméthylammonio)propane
<b>DOTMA</b>	di-oléoyloxy-propyl-triméthylammonium
<b>DPPC</b>	di-palmitoylphosphatidylcholine
<b>DPPES</b>	di-palmitoyl-phosphatidyl-éthanolamyl-spermine
<b>DSPC</b>	phosphatidylcholine disaturée
<b>DT3TU</b>	ditétradécylamino trithiourée
<b>DTS</b>	<i>DNA nuclear targeting sequence</i>
<b>EDC</b>	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
<i>e.g.</i>	par exemple
<b>ELSD</b>	<i>Evaporation Light Scattering Measurement</i>
<b>EPC</b>	egg-3-sn-phosphatidylcholine
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	triéthylamine
<b>EtOH</b>	éthanol
<b>GAG</b>	glycosaminoglycan
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>HOBt</b>	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
<b>HR-ESMS</b>	Masse Haute Résolution par Electrospray
<b>HSV-1</b>	Virus <i>Simplex Herpes</i> de type 1
<i>i.e.</i>	id est
<b>IgG</b>	immunoglobuline de type G
<b>IL-2</b>	interleukine 2

<b>IR</b>	Infra-Rouge
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i>
<b>LPT</b>	lipopolythiourée
<b>LUV</b>	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
<b>MeOH</b>	méthanol
<b>MLV</b>	<i>Multilamellar Vesicle</i>
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
<b>NPC</b>	complexe de pore nucléaire
<b>OGM</b>	organisme génétiquement modifié
<b>PAMAM</b>	dendrimère de poly(amidoamide)
<b>PDI</b>	indice de polydispersité
<b>PEG</b>	polyéthylène glycol
<b>PEI</b>	polyéthylènimine
<b>ppm</b>	partie par million
<b>RAD</b>	arginine-alanine-acide aspartique
<b>RES</b>	système réticulo-endothélial
<b>RGD</b>	arginine-glycine-acide aspartique
<b>RGD<sub>4c</sub></b>	peptide ligand des intégrines $\alpha_v\beta_3$ possédant 4 cystéines
<b>RLU</b>	<i>Relative Light Unit</i>
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SAINT</b>	<i>Synthetic Amphiphile INTerdisciplinary</i>
<b>SCID</b>	Syndrome de déficience immunitaire sévère
<b>SIN</b>	Séquences auto-inactivantes
<b>siRNA</b>	petits ARN interférents
<b>SUV</b>	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>
<b>t.a.</b>	température ambiante
<b>TBE</b>	tris-borate EDTA
<b>TEMPO</b>	radical 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxyl
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>THF</b>	tétrahydrofurane
<b>UV</b>	Ultra Violet
<b>VIH</b>	Virus d'Immunodéficienc e Humaine





# I. Introduction sur les vecteurs de gènes

## A. La thérapie génique

### 1. Principe et Résultats

#### a) Définition

Depuis 1944, date à laquelle Avery, McLeod et McCarthy ont montré que l'ADN est le support de l'information génétique,<sup>1</sup> découverte suivie de la publication de sa structure par Watson et Crick,<sup>2</sup> la génétique moléculaire a connu un siècle d'avancées phénoménales. En 1963, Lederberg présentait déjà le vaste champ d'application de ces découvertes : « *Nous devons anticiper la culture in vitro de cellules germinales et les manipulations telles que l'échange de chromosomes et de segments. L'application ultime de la biologie moléculaire pourrait être le contrôle direct des séquences d'oligonucléotides dans les chromosomes humains, couplés avec la reconnaissance, la sélection et l'intégration des gènes désirés* ». <sup>3</sup> Les progrès en biologie moléculaire ont contribué à une meilleure compréhension des pathologies, de leurs causes et de leur fonctionnement. Ceci a ouvert de nouveaux horizons thérapeutiques, telle la thérapie génique.

La thérapie génique peut se définir comme toute stratégie qui repose sur l'introduction de matériel génétique dans des cellules humaines dans le but de réduire ou d'éliminer une maladie.<sup>4</sup> Contrairement aux médicaments qui agissent sur l'activité et le fonctionnement d'une protéine, les gènes thérapeutiques interviennent plus en amont, à la source même du dysfonctionnement<sup>5</sup> (Figure 1).

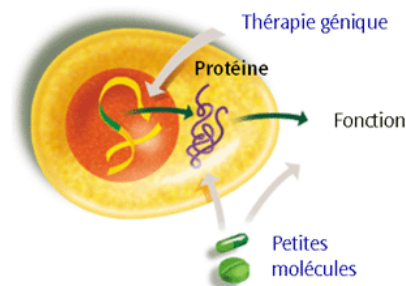


Figure 1 : Principe de la thérapie génique

<sup>1</sup> Avery O. T., McLeod C. M., McCarthy M. (1944) Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, 79, 137-158.

<sup>2</sup> Watson J. D., Crick F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171, 737-738.

<sup>3</sup> Lederberg J. (1963) Molecular biology, eugenics and euphenics, *Nature*, 198, 428-429.

<sup>4</sup> Mulligan R. C. (1993) The basic science of gene therapy, *Science*, 260, 926-932.

<sup>5</sup> Ledley F. D. (1995) Nonviral gene therapy : the promise of genes as pharmaceuticals products, *Hum. Gene Ther.*, 6, 1129-1144.

Cette méthode ouvre des possibilités pour un très grand nombre de maladies : <sup>5</sup>

- **Les maladies génétiques héréditaires**, par exemple la mucoviscidose ou la myopathie de Duchenne. La « réparation » de gènes fut une des premières applications envisagée.<sup>6</sup> Si le nombre de gènes déficients est restreint, la thérapie génique permet d'introduire une copie fonctionnelle du gène et de rétablir un métabolisme normal.
- **Les maladies acquises**, principalement le cancer : l'administration d'acides nucléiques peut promouvoir ou inhiber la production d'une protéine spécifique, pour induire une réponse thérapeutique. Si le traitement par une protéine exogène peut être aussi utilisé, la thérapie génique présente l'avantage d'éviter les administrations trop fréquentes du traitement et la toxicité qui leur est liée, en permettant l'expression de la protéine pendant plusieurs mois (Figure 2).

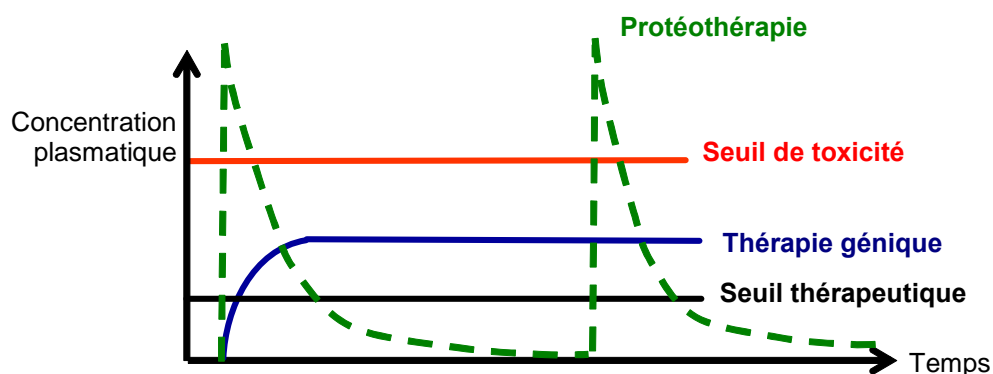


Figure 2 : Avantage de la thérapie génique sur l'administration répétée de protéines

## b) Essais cliniques

La thérapie génique s'est concrétisée par le premier essai clinique sur l'homme, réalisé en 1989 par l'équipe de Rosenberg,<sup>7</sup> pour traiter des patients atteints d'un mélanome avancé. Cette expérience pionnière fut la première d'une longue série. Depuis, plus de 900 essais cliniques ont été menés dans le monde entier.<sup>8</sup> 9% concernent les maladies génétiques, mais la grande majorité est entreprise pour le traitement du cancer, des maladies vasculaires et infectieuses, car elles touchent une très grande population (Figure 3).

<sup>6</sup> Anderson W. F. (1992) Human gene therapy, *Science*, 256, 808-813.

<sup>7</sup> Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., Topalian S. L. (1990) Gene transfer into humans- immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, *New Eng. J. Med.*, 323, 570-578.

<sup>8</sup> Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., Edelstein R. M. (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 – and overview, *J. Gene Med.*, 6, 597-602.

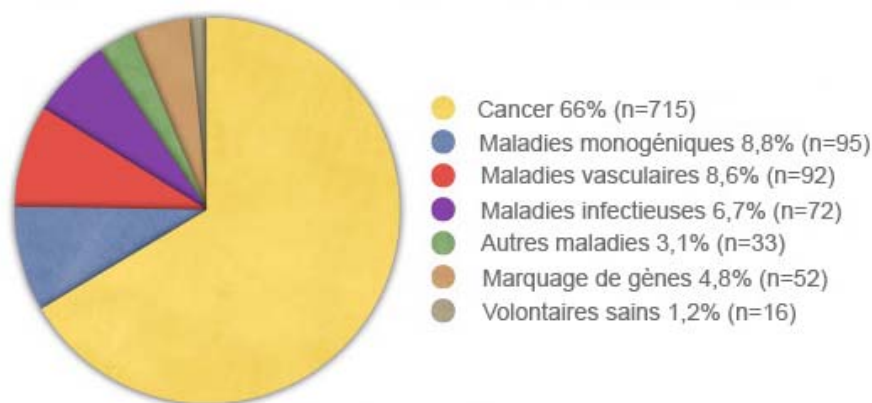


Figure 3 : Cibles cliniques pour la thérapie génique<sup>9</sup>

La plupart de ces essais ont montré la faisabilité et le fort potentiel de la thérapie génique, même si son efficacité n'est pas encore optimale. Seuls deux de ces essais ont entraîné des conséquences négatives sur la santé des patients, ce qui a pourtant créé des polémiques sur cette nouvelle thérapie. Ces deux événements ont surtout mis à jour des risques qui n'étaient pas envisagés et qu'il faut désormais prendre en compte.

#### ➤ La mort de Jesse Gelsinger en 1999

Un essai clinique contre la déficience en ornithine transcarbamylase, maladie génétique du foie, fut mené en 1999, auquel participa l'adolescent Jesse Gelsinger. Il reçut la plus forte dose. Quatre jours après le traitement, il décéda en raison d'une réponse inflammatoire massive, bien qu'une femme ayant reçu la même dose n'ait présenté aucun symptôme comparable.<sup>10</sup> Cette expérience a mis en lumière le risque de réponse immunitaire contre les vecteurs viraux mais surtout la très grande variabilité des résultats selon les individus.

#### ➤ Les « bébés bulle »

L'équipe d'Alain Fisher a traité dix enfants de 1 à 11 mois atteints d'une maladie génétique rare, le syndrome de déficience immunitaire sévère (SCID). Privés de tout système immunitaire et devant vivre sous bulle stérile, leur espérance de vie est souvent inférieure à une année. Le traitement a consisté à implanter des lymphocytes modifiés par rétrovirus dans la moelle osseuse des enfants. Ils ont alors retrouvé un système immunitaire fonctionnel et ont vécu normalement pendant plus de dix ans.<sup>11</sup> Cependant, depuis 2002, les trois plus jeunes ont développé une leucémie qui a été attribuée à l'intégration du gène thérapeutique à proximité d'un promoteur oncogène.<sup>12,13</sup> Cet essai représente un succès partiel : certes il a permis

<sup>9</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>

<sup>10</sup> Raper S. E., Chirmule N., Lee F. S., Wivel N. A., Bagg A., Gao G-P., Wilson J. M., Batshaw M. L. (2003) Fatal systemic inflammatory response in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral transfer, *Mol. Genet. Metab.*, 80, 148-158.

<sup>11</sup> Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey-Abina S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J-L., Bousso P., Le Deist F., Fischer A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science*, 288, 669-672.

<sup>12</sup> Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Leblouch P., Lim A., Osborne C. S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J. I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E.,

d'augmenter significativement l'espérance de vie et le confort des enfants mais il a aussi levé de grands débats sur les risques liés à la manipulation génétique. Depuis, les essais cliniques ne sont autorisés que sur des patients où toutes les autres solutions thérapeutiques ont échoué, ce qui a fortement diminué la fréquence des essais.

Ces revers, malgré leur issue tragique, sont encore très minoritaires parmi la globalité des essais menés jusqu'à présent et, par conséquent, ne remettent pas en cause l'intérêt de la thérapie génique. Cependant, ils révèlent que des recherches sont encore à mener au niveau fondamental pour mieux comprendre et exploiter cette technologie.

### c) L'administration des gènes

Sur le plan médical, les gènes d'intérêt peuvent être administrés différemment (Figure 4) :

- **Ex vivo** : les cellules déficientes sont prélevées, traitées par le gène thérapeutique, multipliées *in vitro*, puis réimplantées dans le patient où elles se développent et remplacent peu à peu les cellules malades.
- **In vivo** : le gène thérapeutique est administré directement dans le patient, par injection locale, intraveineuse ou par les voies respiratoires. Ce protocole simple présente l'avantage de ne pas nécessiter d'intervention chirurgicale.

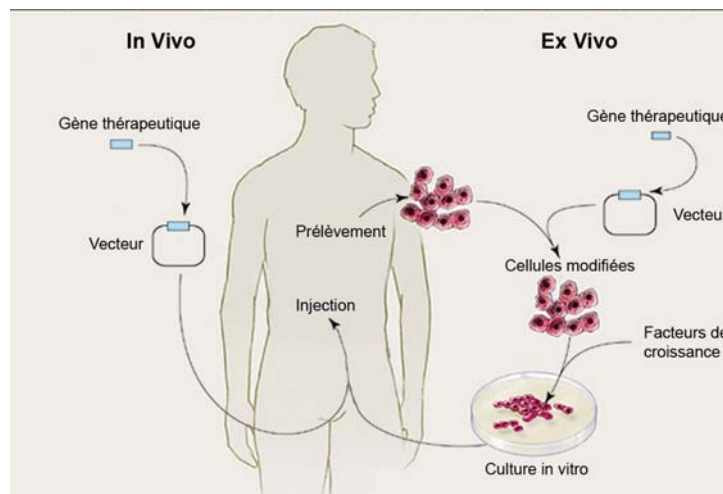


Figure 4 : Modes d'administration de gènes thérapeutiques<sup>14</sup>

La principale difficulté à l'heure actuelle réside dans le transport du gène d'intérêt dans les cellules cibles. L'ADN, macromolécule anionique et hydrophile, n'étant pas prédisposé à pénétrer les membranes hydrophobes, il est nécessaire de le vectoriser. Un vecteur idéal doit répondre aux critères suivants :<sup>15</sup>

- **Etre facile à produire** à des concentrations élevées sur une grosse quantité par des procédés sécurisés,

Sigaux F., Soulier J., Leiva L. E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T. H., Le Deist F., Fisher A., Cavazzana-Calvo M. (2003) LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients After Gene Therapy for SCID-X1, *Science*, 302, 415-419.

<sup>13</sup> Kaiser J. (2005) Panel urges limits on X-SCID trials, *Science*, 307, 1544-1545.

<sup>14</sup> Kaji E. H., Leiden J. M. (2001) Gene and Stem Cell Therapies, *JAMA*, 285, 545-560.

<sup>15</sup> Somia N., Verma M. (2000) Gene therapy : trials and tribulations, *Nature Rev. Genetics*, 1, 91-99.

- Entraîner une **production stable** ou régulée de la protéine d'intérêt,
- **Etre non immunogène** et permettre des administrations répétées,
- **Etre spécifique** d'un tissu ou d'un type de cellule, surtout si ces cellules sont disséminées dans l'organisme,
- Transporter des acides nucléiques **sans limitation de taille**,
- **Avoir un devenir déterminé** : il doit, soit rester en position épisomale, soit s'intégrer dans une région déterminée du génome mais surtout ne pas s'intégrer aléatoirement,
- Infecter aussi bien les **cellules en division que quiescentes**.

Malgré l'abondance des recherches sur ce sujet, le « vecteur idéal et universel » n'a pas été découvert. Il serait plus réaliste de penser que les vecteurs de demain seront spécifiques au tissu et à la pathologie visée et que plusieurs systèmes pourront trouver leur place, en fonction de leurs avantages et de leurs limites. Actuellement, les vecteurs viraux sont les plus utilisés pour les essais cliniques (Figure 5).

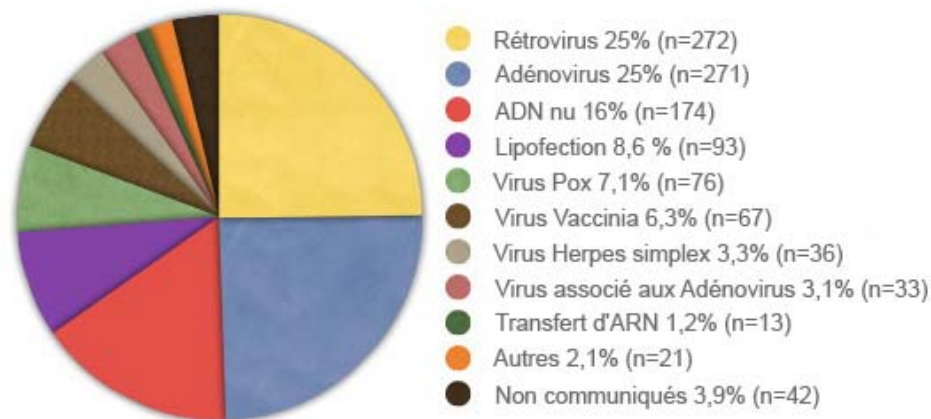


Figure 5 : Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique<sup>16</sup>

## 2. Les vecteurs viraux

La première solution envisagée pour le transport d'ADN fut d'utiliser les virus et c'est encore, à ce jour, la solution la plus efficace. En effet, les virus sont des entités biologiques élaborées capables d'accéder au noyau des cellules hôtes et d'exploiter la machinerie cellulaire pour se répliquer et se disséminer dans l'organisme (Figure 6).

<sup>16</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/clinical>



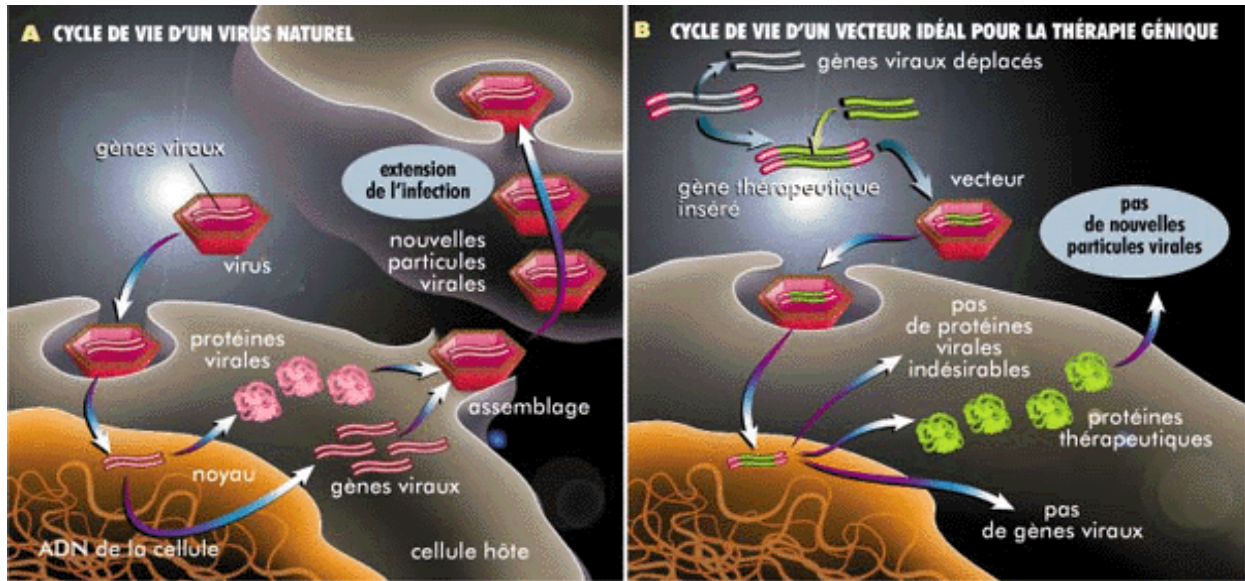


Figure 6 : Pourquoi utiliser les virus comme vecteurs de gènes : comparaison entre le cycle de vie d'un virus et d'un vecteur viral idéal<sup>17</sup>

Pour obtenir des vecteurs viraux pour la thérapie génique, il est important de conserver la capacité des virus à atteindre le noyau des cellules cibles mais d'éliminer leur pouvoir de réplication et de dissémination responsables de l'infection. A cette fin, les gènes viraux pathogènes sont éliminés et remplacés par le gène d'intérêt (Figure 6). Concrètement, pour produire un tel vecteur, on utilise des cellules dites d'encapsulation.<sup>18</sup> Les séquences qui codent pour les propriétés de vectorisation et d'intégration du virus sont introduites dans ces cellules en même temps que le gène thérapeutique. Les cellules multiplient alors ces deux entités, qui s'assemblent pour former des vecteurs viraux, qui ne sont plus pathogènes ni capables de se reproduire, et contiennent le gène d'intérêt (Figure 7).

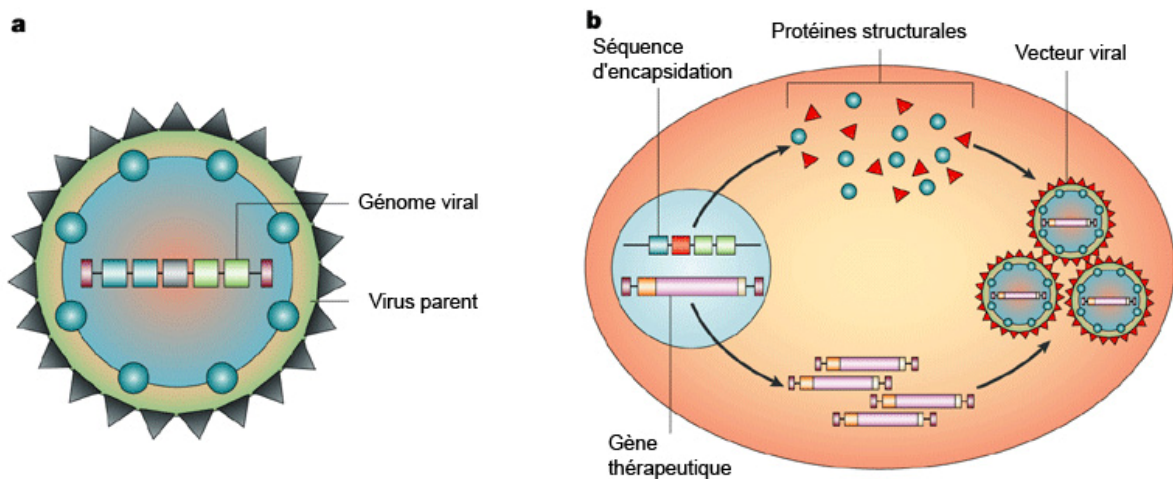


Figure 7 : Production d'un vecteur viral<sup>18</sup> à partir du virus parent (a), grâce à des cellules d'encapsulation (b)

<sup>17</sup> source : Anderson W. F. (1998) Des virus bricolés pour transférer des gènes, *La Recherche*, 315, 53-57.

<sup>18</sup> Thomas A. E., Ehrhardt A., Kay M. A. (2003) Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy, *Nature Rev. Genetics*, 4, 346-358.

### a) Les différents types de virus

Les différents types de virus exploités dans le cadre de la thérapie génique sont toujours plus nombreux. Cinq grandes classes de virus appliqués cliniquement peuvent être distinguées, chacune ayant leur spécificité (Tableau 1) :

Nom	Description	Avantages	Inconvénients
<b>Oncorétrovirus</b>	Constitués d'ARN transcrit dans le cytoplasme en ADN <sup>19</sup>	⇒ Les premiers utilisés en recherche, <sup>20</sup> puis ayant donné lieu à un essai clinique <sup>7</sup> ⇒ Expression à long terme	⇒ Ils doivent attendre la mitose pour pénétrer le noyau ⇒ Intégration non contrôlée dans le génome hôte. <sup>12</sup>
<b>Lentivirus</b>	Rétrovirus dérivés du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH)	⇒ Infectent les cellules quiescentes <sup>21</sup> ⇒ Expression à long terme car intégration dans le génome ⇒ Optimisation : vecteurs auto-inactivant (SIN) <sup>18</sup>	⇒ Immunogènes (gènes de HIV encore présents) ⇒ Difficiles à produire en grande quantité
<b>Adénovirus</b>	ADN double brin qui reste en position épisomale	⇒ Infectent les cellules quiescentes ⇒ Très forte efficacité de transfection dans beaucoup de tissus	⇒ Expression transitoire du gène ⇒ Forte immunogénicité, qui peut être réduite en limitant les gènes viraux <sup>18</sup>
<b>Virus Associés aux Adénovirus (AAV)</b>	ADN simple brin Nécessité de les associer aux adénovirus pour les propriétés d'encapsidation	⇒ Non immunogènes	⇒ Taille du gène limitée (5kb)
<b>Herpes Simplex HSV-1</b>	ADN double brin qui devient circulaire dans le noyau	⇒ Large capacité (40kb) ⇒ Transfecte cellules en division ou non	⇒ Tropicité naturelle pour les neurones <sup>18</sup> ⇒ Immunogénique

Tableau 1 : Différents types de virus utilisés en essais cliniques

Ces vecteurs se caractérisent en général par une forte efficacité du transfert de gènes dans l'organisme hôte. On peut citer par exemple le succès récent de l'équipe d'O. Danos sur la myopathie de Duchenne.<sup>22</sup> Cette maladie se caractérise par l'absence de production, par les muscles, de la protéine appelée dystrophine. Un mois après une simple injection du gène écourté de la dystrophine dans un virus associé aux adénovirus, 80% des fibres musculaires ont sécrété la protéine à un taux normal et fonctionnel. Cette thérapie a permis de corriger les

<sup>19</sup> Barquerino J., Eixarch H., Perez-Melgosa M. (2004) Retroviral Vectors : New Applications for an Old Tool, *Gene Ther.*, 11, S3-S9.

<sup>20</sup> Cone R.D., Mulligan R.C. (1984) High Efficiency Gene Transfer into Mammalian Cells : Generation of Helper-Free Recombinant Retrovirus with Broad Mammalian Host Range, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81, 6349-6353.

<sup>21</sup> Uchida N., Sutton R. E., Frieria A. M., He D., Reitsma M. J., Chang W. C., Veres G., Scollay R., Weissman I. L. (1998) HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> human hematopoietic stem cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 11939-11944.

<sup>22</sup> Goyenvalle A., Vulin A., Fougere F., Leturcq F., Kaplan J-C., Garcia L., Danos O. (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping, *Science*, 306, 1796-1799.

effets de la maladie : les animaux ont retrouvé leurs propriétés mécaniques. Ces résultats ont levé une vague d'espoir pour le traitement de la myopathie de Duchenne.<sup>23</sup>

## **b) Les problèmes liés aux virus**

C'est grâce à leur supériorité en matière d'efficacité que les vecteurs viraux représentent 70 % des essais cliniques (Figure 5). Cependant, ils possèdent des inconvénients communs importants.

### ➤ **La réponse immunitaire**

Le talon d'Achille de ces vecteurs est lié à leur nature virale qui active le système de défense de l'organisme, souvent de façon imprévisible et incontrôlée, comme le montre le décès de Jesse Gelsinger. La réponse peut être non spécifique (particulièrement forte dans le cas des adénovirus) et/ou spécifique après activation des cellules présentatrices d'antigènes.<sup>24</sup> Pour éviter cette réponse, il est possible d'induire une tolérance, préalablement au traitement, *e.g.* par l'utilisation de cellules dendritiques, ou de cibler les vecteurs en utilisant un promoteur spécifique d'un tissu.<sup>25</sup>

### ➤ **L'intégration aléatoire dans le génôme hôte**

Le développement des leucémies, lors de l'essai clinique sur les enfants atteints de déficience immunitaire sévère (SCID), a soulevé la question de l'intégration des gènes dans le génome hôte.<sup>12</sup> Il apparaît que les rétrovirus ont une préférence pour certains chromosomes et particulièrement pour les régions riches en gènes transcrits plutôt que pour les régions non-codantes.<sup>18</sup> La solution préconisée serait de développer des vecteurs capables d'intégrer leur matériel génétique, dans des sites prédéterminés, afin de connaître sa localisation.

### ➤ **La production en grande quantité**

La production en masse des vecteurs viraux est très délicate pour des raisons de biosécurité. De plus, les rendements obtenus grâce aux cellules d'encapsidation (*cf.* I.A.1., p.13) sont souvent faibles.

Il est difficile de prédire si les améliorations continues de ces vecteurs viraux pourront remédier à ces problèmes inhérents à leur nature. C'est pourquoi des vecteurs non viraux ont été développés en parallèle.

---

<sup>23</sup> Athanasopoulos T., Graham I. R., Foster H., Dickson G. (2004) Recombinants adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), *Gene Ther.*, 11, S109-S121.

<sup>24</sup> Bessis N., Garcia Cozar F. J., Boissier M-C. (2004) Immune responses to gene therapy vectors : influence on vector function and effector mechanisms, *Gene Ther.*, 11, S10-S17.

<sup>25</sup> Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarthy T., Landers S., Maples P., Romel L., Randlev B., Reid T., Kaye S., Kirn D. (2000) Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer : a phase II trial, *Cancer Res.*, 60, 6359-6366.



### 3. Les vecteurs non viraux

Alors que les virus possèdent déjà une structure bien définie qu'il suffit de modifier, les vecteurs non viraux doivent être construits de toutes pièces. Les éléments constitutifs d'un tel vecteur sont le gène thérapeutique – il faut alors trouver sous quelle forme il peut être transporté – et le moyen de le vectoriser. Ce peut être une méthode physique ou l'utilisation de composés chimiques. On parle dans ce dernier cas de vecteurs synthétiques.

#### a) Le matériel génétique

Les virus véhiculent leur matériel génétique, selon leur nature, sous forme d'ADN ou d'ARN. Dans le cas des vecteurs non viraux, il faut choisir sous quelle forme utiliser l'information génétique.

##### ➤ Les oligonucléotides

Il est possible d'administrer des petits oligonucléotides. Leur but est souvent de stopper l'expression d'un gène, en bloquant une étape de sa transcription. Ils peuvent bloquer la maturation des ARN messagers, c'est la stratégie *antisense*,<sup>26</sup> ou même les dégrader, *e.g.* grâce aux siRNA, petits oligonucléotides à double brin.<sup>27,28</sup> Ces stratégies sont dites de pharmacologie génétique car elles utilisent des acides nucléiques pour induire une réponse thérapeutique ; mais elles ne sont pas porteuses d'information génétique proprement dite.

##### ➤ Les plasmides

Afin d'introduire un gène qui code pour une protéine donnée, la méthode la plus utilisée est l'utilisation de petites molécules circulaires d'ADN double brin appelées plasmides.<sup>29</sup> Ces derniers peuvent être facilement produits, en grande quantité, par les bactéries, et modifiés par simple insertion du gène d'intérêt dans des plasmides « vides ». Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé le plasmide pVax Luc dont la structure est la suivante (Figure 8):

---

<sup>26</sup> Kurreck J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.*, 270, 8, 1628-1644.

<sup>27</sup> Ryther R. C., Flynt A. S., Phillips III J. A., Patton J. G. (2005) siRNA therapeutics : big potential from small RNAs, *Gene Ther.*, 12, 5-11.

<sup>28</sup> Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschli T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411, 494-498.

<sup>29</sup> Middaugh C. R., Evans R. K., Montgomery D. L., Casimiro D. R. (1998) Analysis of plasmid DNA from a pharmaceutical perspective, *J. Pharm. Sci.*, 87, 2, 130-146.

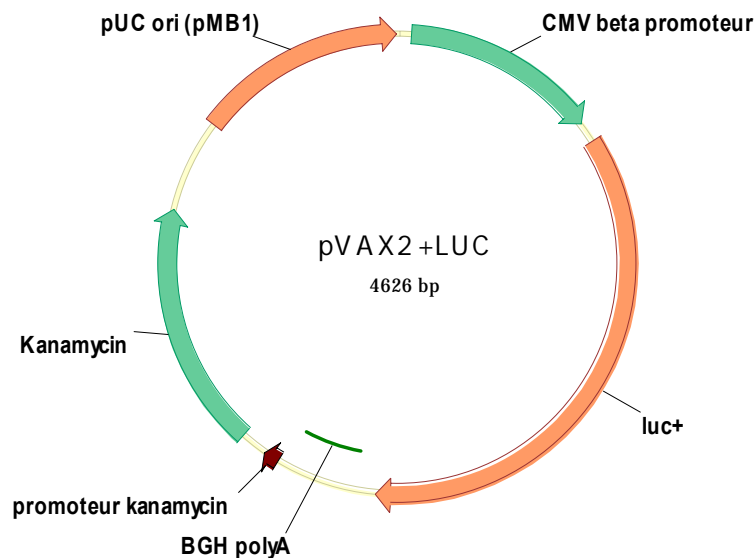


Figure 8 : Carte du plasmide pVax2luc

Comme tout plasmide, il comporte :

- **Une cassette d'expression**, constituée du gène thérapeutique (ici, la luciférase, un gène rapporteur facile à quantifier), du promoteur pour réguler son expression (le promoteur du cytomégalo virus CMV est un promoteur viral qui permet une forte expression dans tous les types de tissus), et d'une séquence de terminaison (BGH PolyA),
- **Une origine de répllication** bactérienne (pUCori (pMB1)), qui permet la production de plasmides dans des souches bactériennes,
- **Un gène de résistance à un antibiotique** (ici la kanamycine) qui permet de sélectionner les bactéries ayant effectivement produit le plasmide.

De nombreuses études portent sur l'optimisation des plasmides pour les essais de thérapie génique. En effet, l'origine bactérienne de cet ADN entraîne une réaction immunitaire de l'hôte. Pour la réduire, il est possible de limiter l'apport bactérien, notamment en supprimant les séquences CpG, particulièrement peu méthylées chez les bactéries,<sup>30</sup> ou en modifiant l'origine de répllication et le gène de résistance à un antibiotique, comme dans les plasmides appelés pCor.<sup>31</sup> Par ailleurs, on peut rendre les plasmides davantage spécifiques en utilisant des promoteurs propres à un tissu<sup>32</sup> ou contrôlables par un système de régulation.<sup>33</sup>

## b) Méthodes physiques

Il est possible d'injecter directement le plasmide dans l'organisme ou d'utiliser des techniques physiques pour l'aider à pénétrer dans les cellules cibles (Figure 9).

<sup>30</sup> Niidome T., Huang L. (2002) Gene therapy progress and prospects : non viral vectors, *Gene Ther.*, 9, 1647-1652.

<sup>31</sup> Soubrier F., Cameron B., Somarriba S., Dubertret C., Jaslin G., Jung G., Le Caer C., Dang D., Mouvault J-M., Scherman D., Mayaux J. F., Crouzet J. (1999) pCor : a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy, *Gene Ther.*, 6, 1482-1488.

<sup>32</sup> Herweijer H., Wolff J. A. (2003) Progress and prospects : naked DNA gene transfer and therapy, *Gene Ther.*, 10, 453-458.

<sup>33</sup> Perez N., Bigey P., Scherman D., Danos O., Piechaczyk M., Pelegrin M. (2004) Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation, *Gen. Vacc. & Ther.*, 2, 1, 2-6.

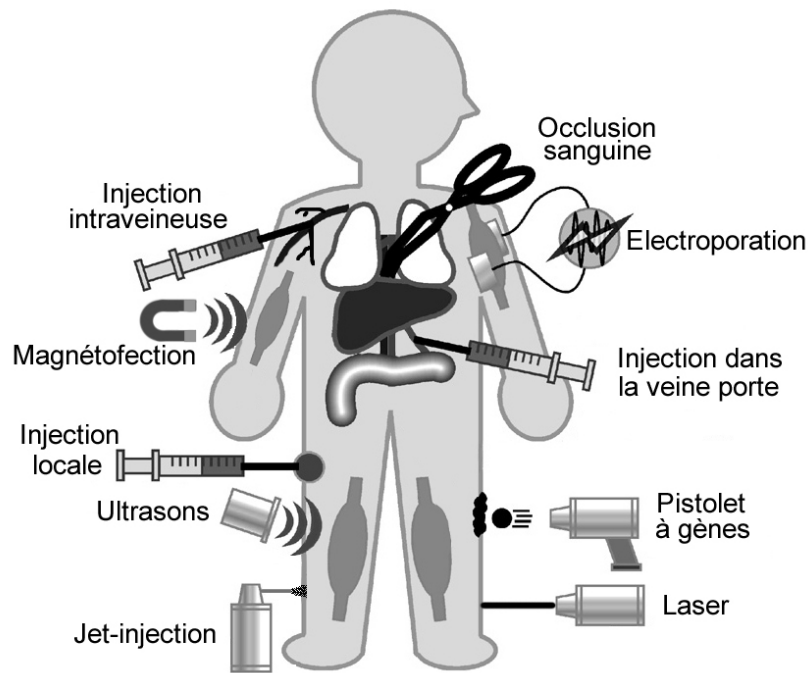


Figure 9 : Principales méthodes physiques de transfert de gènes<sup>34</sup>

### ➤ L'ADN nu

La méthode la plus simple pour administrer du matériel génétique est l'injection d'ADN plasmidique, dit « nu », dans un tissu ou dans un vaisseau sanguin. C'est d'ailleurs la méthode la plus sûre car l'absence de vecteur réduit les risques de réponse immunitaire. Elle a donné lieu à des essais cliniques, notamment, récemment, pour traiter le cancer de la vessie.<sup>35</sup> L'injection systémique peut, par exemple, constituer une première indication sur la toxicité potentielle d'un gène thérapeutique.<sup>36</sup> Réalisée à proximité des muscles, elle permet de transfecter 40% des myofibrilles, ce qui est suffisant pour induire une réponse thérapeutique significative dans le cas des myopathies de Duchenne.<sup>32</sup> Cependant, l'ADN, non protégé, est susceptible d'être dégradé rapidement par les DNases. Il est donc nécessaire d'injecter de grandes quantités pour obtenir une réponse significative ; c'est le cas par exemple de l'injection, dite hydrodynamique, pratiquée dans la veine de la queue des souris, caractérisée par une rapidité d'injection (5 à 7 secondes) et un grand volume (10% du poids de la souris).<sup>37</sup> Le cœur, ne pouvant faire face seul à ce flot hydrodynamique soudain, le renvoie principalement vers le foie, organe où les taux de transfection sont les plus élevés. De meilleurs résultats sont obtenus si une occlusion préalable des vaisseaux est effectuée. Son application à l'homme pourrait se faire par des cathéters dans la veine porte, comme cela a été fait sur des lapins.<sup>32</sup>

<sup>34</sup> Source : Niidome T., Huang L. (2002) Gene therapy progress and prospects : nonviral vectors, *Gene Ther.*, 9, 1647-1652.

<sup>35</sup> Ohana P., Gofrit O., Ayesh S., Al-Sharef W., Mizrahi A., Birman T., Schneider T., Matouk I., de Groot N., Tavdy E., Sidi A. A., Hochberg A. (2004) Regulatory sequences of the H19 gene in DNA-based therapy of bladder cancer, *Gene Ther. & Mol. Biol.*, 8, 181-192.

<sup>36</sup> Lui V. W. Y., Falo L. D., Huang L. (2001) Systemic production of IL-12 naked DNA mediated gene transfer : toxicity and attenuation of transgene expression, *J. Gene Med.*, 3, 384-393.

<sup>37</sup> Liu F., Song Y. K., Liu D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther.*, 6, 1258-1266.

### ➤ **Le pistolet à gènes**

Appelée aussi biolistique,<sup>38</sup> cette technique permet d'envoyer des particules, d'or ou de tungstène, recouvertes d'ADN, directement dans le cytoplasme des cellules, voire dans le noyau. Elle est particulièrement employée dans le domaine végétal pour la création d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Si cette méthode est prometteuse pour transfecter *in vitro* des cellules difficilement accessibles par les techniques classiques, comme les neurones ou celles du cerveau, son principal défaut est de n'avoir qu'un faible taux de pénétration dans les tissus *in vivo*.

### ➤ **L'injection sans aiguille**

Elle peut être réalisée sous haute pression, grâce à un système de propulsion à air comprimé, appelé « jet injection ».<sup>39</sup> Les travaux de W. Walther ont montré que cette technique endommage peu l'ADN et qu'elle permet une bonne pénétration dans les tissus, meilleure qu'avec une aiguille ou un pistolet à gènes.<sup>40</sup>

### ➤ **L'électrotransfert**

Depuis le premier succès *in vitro* de H. Potter en 1984,<sup>41</sup> la méthode apparaît comme une réelle alternative aux vecteurs viraux. Elle consiste, après l'injection locale d'ADN, en l'application de courtes impulsions d'un champ électrique, qui induit une électroperméabilisation des membranes cellulaires à laquelle s'ajoute un effet électrophorétique qui permet la migration de l'ADN.<sup>42</sup> Les principaux paramètres à prendre en considération sont la quantité d'ADN, la durée et le voltage des impulsions, la nature de l'électrode et l'orientation du champ électrique par rapport aux cellules. L'optimisation de ces paramètres a permis une expression du transgène, 100 fois supérieure à l'ADN nu, stable pendant au moins 9 mois dans les muscles de divers animaux,<sup>43</sup> ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules transfectées et du nombre de copies de gènes insérées.<sup>44</sup> Aujourd'hui, cette technique a fait ses preuves sur un grand nombre de tissus : principalement le muscle squelettique et les tumeurs mais aussi l'artère carotidienne, la cornée, le foie, le tendon, la vessie, le cerveau,<sup>45</sup> les poumons,<sup>46</sup> et la peau.<sup>47</sup> L'injection intramusculaire a été

---

<sup>38</sup> O'Brien J., Lummis S. C. R. (2004) Biolistic and diolistic transfection : using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells, *Methods*, 33, 121-125.

<sup>39</sup> Sawamura D., Ina S., Itai K., Meng X., Kon A., Tamai K., Hanada K., Hashimoto I. (1999) *In vivo* gene introduction into keratinocytes using jet injection, *Gene Ther.*, 6, 1785-1787.

<sup>40</sup> Walther W., Stein U., Fichtner I., Malcherek L., Lemm M., Schlag P. M. (2001) Non viral *in vivo* gene delivery into tumors using a novel low volume jet injection technology, *Gene Ther.*, 8, 173-180.

<sup>41</sup> Potter H., Weir L., Leder P. (1984) Enhanced-dependent expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7161-7165.

<sup>42</sup> Bloquel C., Fabre E., Bureau M. F., Scherman D. (2004) Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression : new methodological developments and applications, *J. Gene Med.*, 6, S11-S23.

<sup>43</sup> Mir L. M., Bureau M. F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J-M., Delaere P., Branellec D., Schwartz B., Scherman D. (1999) High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4262-4267.

<sup>44</sup> Aihara H., Miyazaki J-I. (1998) Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*, *Nature Biotechnology*, 16, 867-870.

<sup>45</sup> André F., Mir L. M. (2004) DNA Electrotransfer : its principles and an updated review of its therapeutic applications, *Gene Ther.*, 11, S33-S42.

<sup>46</sup> Dean D. A., -achado-Aranda D., Blair-Parks K., Yelandi A. V., Young J. L. (2003) Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung, *Gene Ther.*, 10, 1608-1615.

<sup>47</sup> Pavselj N., Préat V. (2005) DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high and one low-voltage pulse, *J. Controlled Release*, 106, 407-415.

particulièrement utilisée car le muscle peut produire des protéines en vue de leur circulation dans le sang. Ainsi, ils sont capables de sécréter des antigènes qui peuvent induire une réponse immunitaire cellulaire ou humorale, à des fins de vaccination.<sup>48</sup> Cependant, le principal inconvénient de cette technique est une réaction inflammatoire non négligeable observée sur les tissus perméabilisés.<sup>49</sup>

#### ➤ **Les ultrasons**

Utilisés cliniquement à des fins diagnostiques et thérapeutiques, ils peuvent également améliorer le transfert de gènes après injection locale. L'équipe de Taniyama a montré que les ultrasons peuvent induire la formation de pores dans les membranes cellulaires et faciliter la translocation de l'ADN.<sup>50</sup> Ce phénomène est amplifié par l'utilisation d'agents de nucléation. L'un d'eux, appelé Optison, est capable d'encapsuler les plasmides et d'améliorer la transfection d'un facteur 7000. Cette méthode non invasive est particulièrement intéressante pour une application clinique.

#### ➤ **Le laser**

Le laser est une autre source d'énergie qui permet de faciliter l'entrée du plasmide dans le cytoplasme. En utilisant un laser femtoseconde dans le proche infrarouge, l'équipe de Zeira a obtenu une expression prolongée (>100 jours) du gène de l'érythropoïétine sans dommage dans les tissus ni effet secondaire.<sup>51</sup>

#### ➤ **La magnétofection**

L'utilisation d'un fort champ magnétique sur des vecteurs associés à des nanoparticules superparamagnétiques (à base d'oxyde de fer) permet l'accumulation rapide des vecteurs sur les membranes des cellules cibles et par conséquent un pic de transfection plus haut et plus précoce.<sup>52</sup>

La plupart de ces méthodes sont encore aux premiers stades de développement. Actuellement, l'électrotransfert est la technique la plus largement utilisée grâce à son efficacité démontrée dans un grand nombre de tissus. Cependant, la mise en œuvre de cette technique peut présenter un inconvénient car elle demande un matériel spécifique et des personnes qualifiées, contrairement aux vecteurs synthétiques, qui ne nécessitent qu'une simple injection.

---

<sup>48</sup> Prud'homme G. (2005) DNA vaccination against tumors, *J. Gene Med.*, 7, 3-17.

<sup>49</sup> Wells D. J. (2004) Gene therapy progress and prospects : Electroporation and other physical methods, *Gene Ther.*, 11, 1363-1369.

<sup>50</sup> Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Aoki M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R. (2002) Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound : enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle, *Gene Ther.*, 9, 372-380.

<sup>51</sup> Zeira E., Manevitch A., Khatchatourians A., Pappo O., Hyam E., Darash-Yahana M., Tavor E., Honigam A., Lewis A., Galun E. (2003) Femtosecond infrared laser – An efficient and safe *in vivo* gene delivery system for prolonged expression, *Molecular Therapy*, 8, 2, 342-350.

<sup>52</sup> Scherer F., Anton M., Schilinger U., Henke J., Bergemann C., Krüger A., Gänsbacher B., Planck C. (2002) Magnetofection : enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.*, 9, 102-109.

### c) Vecteurs chimiques

Le but est ici de construire des virus artificiels<sup>53</sup> qui miment le mécanisme d'action si efficace des virus, tout en limitant l'apport viral. Ces systèmes présentent les avantages suivants :

- **Pas d'immunogénicité** confirmée par les essais cliniques réalisés avec ce type de vecteurs,<sup>54</sup>
- Transport du matériel génétique **sans limitation de taille**,
- **Facilité de production** en grandes quantités et en toute sécurité,
- **Possibilité d'administrations répétées** car il n'y a pas de réponse immunitaire spécifique,
- **Très faible fréquence d'intégration** dans le génome et donc absence de risque de recombinaison virale.

Malgré ces avantages, l'inconvénient majeur de ces vecteurs est de ne pas atteindre l'efficacité thérapeutique des vecteurs viraux.<sup>30</sup>

Il existe des stratégies nombreuses et variées pour mettre au point un vecteur synthétique. Certaines se sont inspirées de la vectorisation des protéines. Par exemple, l'équipe de B. Lebleu a utilisé des peptides, permettant la pénétration cellulaire des protéines (*Cell Penetrating Peptides*), dérivés de la protéine Tat du VIH pour internaliser des oligonucléotides.<sup>55</sup> D'autre part, les nanoparticules, permettant la libération prolongée d'agents thérapeutiques, peuvent être utilisées pour encapsuler et transporter l'ADN en conservant son intégrité.<sup>56</sup> Néanmoins, les vecteurs synthétiques les plus développés à l'heure actuelle sont les lipides et les polymères cationiques. Leur charge leur confère deux avantages majeurs : elle permet de complexer l'ADN puis de pénétrer les cellules grâce à l'interaction avec les membranes cellulaires anioniques.

## B. Les vecteurs cationiques

### 1. Lipides cationiques

Ce fut Felgner qui, en 1987, introduisit le premier vecteur synthétique ayant une activité de transfection : il s'agit du lipide cationique DOTMA<sup>57</sup> qui forme avec l'ADN des vésicules unilamellaires. Depuis, de nombreux lipides ont été développés et commercialisés.

---

<sup>53</sup> Zuber G., Dauty E., Nothisen M., Belguise P., Behr J-P. (2001) Towards synthetic viruses, *Adv. Durg. Deliv. Rev.*, 52, 245-253.

<sup>54</sup> Nabel G. J., Nabel E. G., Yang Z-Y., Fox B. A., Plautz G. E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D., Chang A. E. (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma : expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11307-11311.

<sup>55</sup> Brooks H., Lebleu B. Vives E. (2005) Tat peptide-mediated cellular delivery : back to basics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 559-577.

<sup>56</sup> Csaba N. Caamano P., Sanchez A., Dominguez F., Alonso M-J. (2005) PLGA :poloxamer and PLGA :poloxamine blend nanoparticles : new carriers for gene delivery, *Biomacromolecules*, 6, 271-278.

<sup>57</sup> Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987) Lipofection : a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417.

Un lipide cationique est généralement composé de trois parties : une ancre hydrophobe, un espaceur et une tête hydrophile cationique (Figure 10).

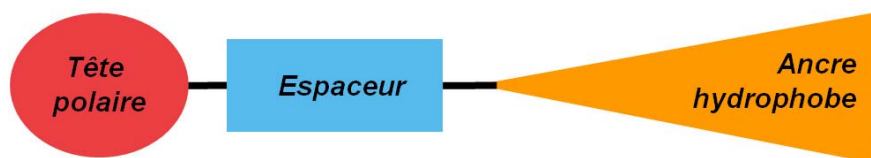


Figure 10 : Représentation schématique d'un lipide cationique

Les lipides cationiques développés se différencient par ces paramètres (Tableau 2, Tableau 3) :

### ➤ La tête cationique

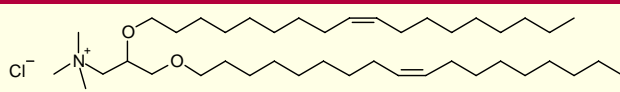
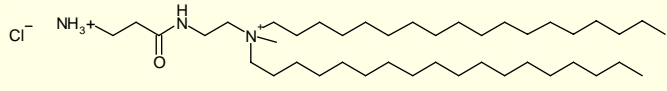
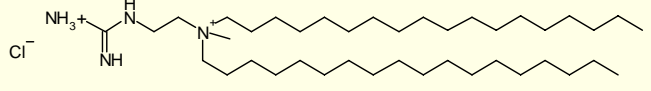
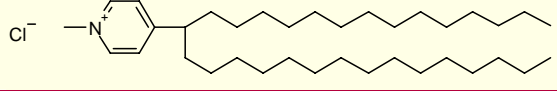
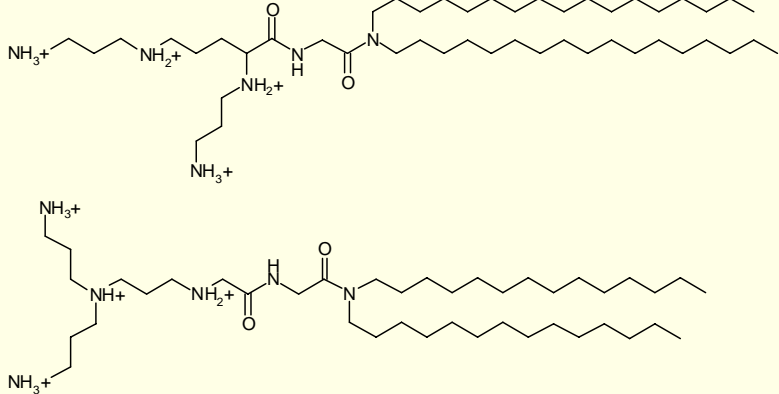
Nature de la tête	Exemple	Structure
Ammonium quaternaire	DOTMA <sup>57</sup>	
Acides aminés	Alanine <sup>58</sup>	
Guanidinium <sup>59</sup>		
Pyridinium	SAINTs <sup>60</sup>	
Polyamines	DOGS <sup>61</sup>  RPR 209120 <sup>62</sup>	

Tableau 2 : Lipides cationiques selon la nature de leur tête

<sup>58</sup> Sen J., Chaudhuri A. (2005) Gene transfer efficacies of novel cationic amphiphiles with alanine,  $\beta$ -alanine, and serine headgroups : a structure-activity investigation, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 903-912.

<sup>59</sup> Sen J., Chaudhuri A. (2004) Design, synthesis and transfection biology of novel non-cholesterol-based guanidinylated cationic lipids, *J. Med. Chem.*, 48, 3, 812-820.

<sup>60</sup> Van Der Woude I., Wagenaar A., Meekel A. A., Ter Beest M. B., Ruiters M. H., Engberts J. B., Hoekstra D. (1997) Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic *in vitro* gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1160, 1165.

<sup>61</sup> Kabanov A.V., Kabanov V.A. (1995) DNA Complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells, *Bioconjugate Chem.*, 6, 7-20.

<sup>62</sup> Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D. (1998) Synthesis, activity and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer, *J. Med. Chem.*, 41, 224-235.

➤ La nature de l'ancre hydrophobe

Nature de l'ancre hydrophobe	Exemple	Structure
Lipidique saturée	DMRIE	
Lipidique insaturée	DOTAP <sup>63</sup>	
Phospho-lipidique	DPPE <sup>61</sup>	
Cholestérol	DC-Chol <sup>64</sup> BGTC <sup>65</sup>	

Tableau 3 : Lipides cationiques selon la nature de leur ancre hydrophobe

Les particules, formées en solution aqueuse par ce type de lipides, sont appelées des liposomes cationiques. Elles peuvent s'associer à l'ADN qui peut s'insérer dans l'espace aqueux des vésicules.<sup>66</sup> Le complexe formé est appelé « lipoplexe ».<sup>67</sup> Si leur structure est encore mal connue, l'équipe de Rädler a publié une structure aux rayons X où l'ADN serait intercalé entre deux bicouches lipidiques,<sup>68</sup> selon le schéma suivant (Figure 11) :

<sup>63</sup> Massing U., Kley J. T., Gürtesch L., Fankhaenel S. (2000) A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids, *Chemistry and Physics of Lipids*, 105, 189-190.

<sup>64</sup> Gao X., Huang L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 179, 1, 280-285.

<sup>65</sup> Vigneron J.P., Oudrhiri N., Fauquet M., Vergely L., Bradley J.C., Basseville M., Lehn P., Lehn J.-M. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids : efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9682-9686.

<sup>66</sup> Rädler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposomes complexes : DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, *Science*, 275, 5301, 810-814.

<sup>67</sup> Felgner P. L., Barenholz Y., Behr J.-P., Cheng S. H., Cullis P., Huang L., Jessee J. A., Seymour L., Szoka F., Thierry A. R., Wagner E., Wu G. (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene Ther.*, 8, 5, 511-512.

<sup>68</sup> Rädler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C.R. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes : DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packaging regimes, *Science*, 275, 5301, 810-814.



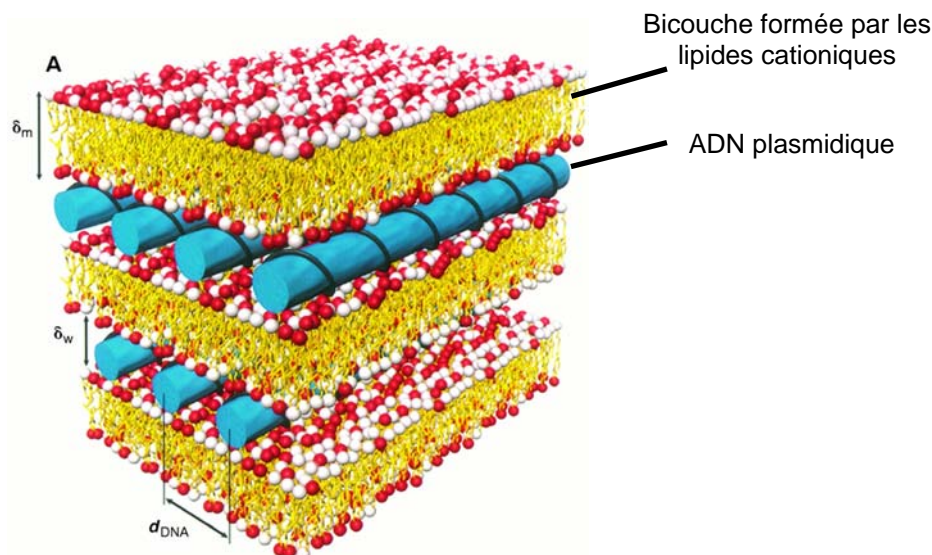


Figure 11 : Structure d'un lipoplexe<sup>69</sup>

Les lipides cationiques sont nombreux et extrêmement variés. Désormais ce sont les systèmes synthétiques les plus utilisés. Ils ont donné lieu à de nombreuses études précliniques et cliniques. Ainsi, l'injection du gène de l'interleukine IL-2 associé à un vecteur de type DMRIE a été réalisée chez des patients atteints de divers cancers. Le traitement a été bien toléré et deux patients ont montré une réponse antitumorale partielle pendant 16 à 19 mois.<sup>70</sup> Les recherches actuelles se focalisent maintenant sur l'amélioration de l'efficacité, toujours limitée, de ces systèmes. Des éléments peuvent être ajoutés dans la formulation, comme des lipides neutres ou des agents fusogènes qui modifient la stabilité du complexe, des ligands pour le ciblage, etc.<sup>71</sup>

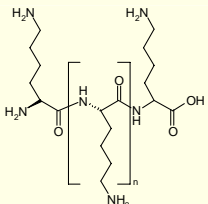
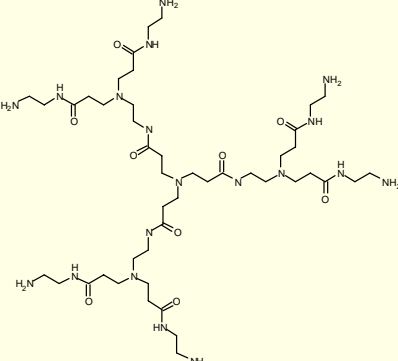
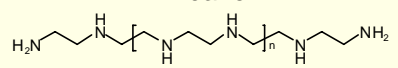
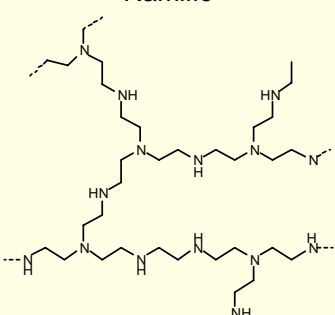
## 2. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques interagissent également de façon électrostatique avec l'ADN et forment des particules appelées « polyplexes ». Voici quelques exemples (Tableau 4) :

<sup>69</sup> Safinya C. R. (2001) Structure of lipid-DNA complexes : supramolecular assembly and gene delivery, *Curr. Op. Str. Biol.*, 11, 440-448.

<sup>70</sup> Galanis E., Hersch E. M., Stopeck A. T., Gonzalez R., Burch P., Spier C., Akporiaye E. T., Rinehart J. J., Edmonson J., Sobol R. E., Forscher C., Sondak V. K., Lewis B. D., Unger E. C., O'Driscoll M., Selk L., Rubin J. (1999) Immunotherapy of advanced malignancy by direct gene transfer of an interleukin-2 DNA/DMRIE/DOPE lipid complex : phase I/II experience, *J. Clinic. Oncol.*, 17, 10, 3313-3323.

<sup>71</sup> Zhdanov R. I., Podobed O. V., Vlassov V. V. (2002) Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes – for gene transfer and therapy, *Bioelectrochemistry*, 58, 53-64.

Nom	Structure	Avantage	Inconvénient
<b>Polylysine</b>		<p>⇒ Premier polymère développé<sup>72</sup></p> <p>⇒ Modèle d'étude<sup>73</sup></p>	<p>⇒ Efficacité relative</p> <p>⇒ Toxicité</p>
<b>Dendrimère de polyamido-amine PAMAM<sup>74</sup></b>		<p>⇒ Forte transfection grâce à ses amines, non protonées à pH physiologiques et qui peuvent jouer le rôle d'éponge à proton dans l'endosome, ce qui évite la dégradation des complexes dans le lysosome.</p> <p>⇒ Faible toxicité</p>	
<b>Polyéthylèneimine<sup>75</sup> PEI</b>	<p><b>Linéaire</b></p>  <p><b>Ramifié</b></p> 	<p>⇒ Très forte efficacité de transfection grâce au pouvoir tampon des amines internes (20% protonées à pH physiologique)<sup>76</sup></p> <p>⇒ Efficacité <i>in vivo</i> dans le cerveau et les poumons<sup>77</sup></p> <p>⇒ Essais d'optimisation par ciblage et diminution des charges de surface<sup>78</sup></p>	<p>⇒ Forte toxicité à cause de sa charge positive<sup>79</sup></p>

<sup>72</sup> Zhou X. H., Klivanov A.L., Huang L. (1991) Lipophilic polylysine mediate efficient DNA transfection in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1065 (1), 8-14.

<sup>73</sup> Zhou X. H., Huang L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine : characterisation and mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1189, 195-203.

<sup>74</sup> Turumen M.P., Hiltunen M.O., Ruponen M., Virkamäki L., Szoka Jr F.C., Urtti A., Ylä-Herttuala (1999) Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes, *Gene Ther.*, 6, 6-11.

<sup>75</sup> Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : Polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7297-7301.

<sup>76</sup> Akinc A., Thomas M., Klivanov A. M., Langer R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.*, 7, 657-663.

<sup>77</sup> Bragonzi A., Dina A., Calori G., Biffi A., Bordignon C., Assael B.M., Conese M. (2000) Biodistribution and transgene expression with non viral cationic vector/DNA complexes in the lungs, *Gene Ther.*, 7, 1753-1760.

<sup>78</sup> Neu M., Fischer D., Kissel T. (2005) Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene Med.*, 7, 992-1009.

<sup>79</sup> Godbey W.T., Mikos A.G. (2001) Recent progress in gene delivery using non viral gene transfer complexes, *J. Controlled Release*, 72, 115-125.

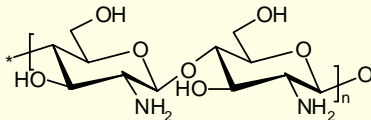
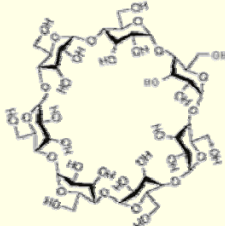
<p><b>Chitosan,</b> dérivé de la chitine</p>		<p>⇒ Biodégradable et non toxique</p> <p>⇒ Sortie de l'endosome possible par la dégradation du polymère dans le lysosome<sup>80</sup></p> <p>⇒ Efficacité comparable à celle du PEI pour le polymère de 18 unités<sup>81</sup></p>	<p>⇒ Pas de pouvoir tampon</p>
<p><b>Cyclo-dextrines</b></p>		<p>⇒ Biocompatibles</p> <p>⇒ Couplés à un motif guanidine<sup>82</sup> ou à un polymère<sup>83</sup> mais montre alors une efficacité comparable au PEI.</p>	<p>⇒ Pas assez d'interaction avec l'ADN, doit être associé à un motif ou polymère cationique</p>

Tableau 4 : Exemples de polymères cationiques

D'autres stratégies diverses ont été développées : pour améliorer la sortie des complexes de l'endosome, on peut utiliser les **polyhistidines**<sup>84</sup> ou des polymères **pH-sensibles**.<sup>84</sup> Grâce à un **assemblage de plusieurs polymères** on peut rassembler des propriétés complémentaires<sup>85</sup> ou contrôler la libération de l'ADN, en fonction de la température<sup>86</sup> par exemple.

Les lipides et polymères cationiques sont les vecteurs synthétiques les plus étudiés à l'heure actuelle. L'amélioration de ces systèmes est conditionnée par la compréhension des phénomènes biologiques impliqués dans leur transport vers les cellules cibles.

### 3. Barrières au transfert de gènes

Pour assurer une bonne compaction de l'ADN, les lipides ou polymères sont généralement mis en excès et il en résulte une charge positive globale du complexe. Ces vecteurs ont pour

<sup>80</sup> Köping Höggard M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Varum K.M., Artursson P. (2001) Chitosan as a non viral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*, *Gene Ther.*, 8, 1108-1121.

<sup>81</sup> Köping Höggard M., Varum K.M., Issa M., Danielsen S., Christensen B.E., Stokke B.T., Artursson P. (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers, *Gene Ther.*, 11, 1441-1452.

<sup>82</sup> Gonzalez H., Hwang S.J., Davis M. E. (1999) New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074.

<sup>83</sup> Shuai X., Merdan T., Unger F., Kissel T. (2005) Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility, *Bioconjugate Chem.*, 16, 322-329.

<sup>84</sup> Pack D. W., Hoffman A. S., Pun S., Stayton P. S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery, *Nature Rev. Drug Discovery*, 4, 581-593.

<sup>85</sup> Agarwal A., Unfer R., Mallapragada S. K. (2005) Novel cationic pentablock copolymers as non viral vectors for gene therapy, *J. Controlled Release*, 103, 245-258.

<sup>86</sup> Sun S., Liu W., Cheng N., Zhang B., Cao Z., Yao K., Liang D., Zuo A., Guo G., Zhang J. (2005) A thermoresponsive chitosan-NIPAAm/Vinyl Laurate Copolymer Vector for gene Transfection, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 972-980.

mission de livrer l'ADN dans le noyau des cellules cibles. Après une injection systémique, l'ADN doit franchir un certain nombre de barrières biologiques<sup>87</sup> : la circulation sanguine, l'entrée dans la cellule, la libération de l'ADN, le transport dans le cytosol et l'entrée dans le noyau.

### a) La circulation sanguine

Lors d'une injection systémique, les complexes doivent circuler assez longtemps pour atteindre leur cellule cible. En effet, les raisons d'élimination sont nombreuses. Les complexes peuvent interagir avec :

- **Les opsonines** (protéines du complément, immunoglobulines de type IgG, fibronectine, etc.) par des interactions hydrophobes.<sup>88</sup> Les vecteurs recouverts d'opsonines sont alors reconnaissables par le système réticulo-endothélial (RES) et captés par les macrophages, principalement au niveau du foie (cellules de Kupffer) ou de la rate,
- **Les protéines anioniques du sérum**, qui neutralisent les complexes et entraînent leur agrégation puis leur prise en charge par le RES,<sup>89</sup>
- **Les poumons**, dans lesquels les complexes s'accumulent après une injection systémique.<sup>90</sup> En effet le faible diamètre de leurs capillaires joue le rôle de filtre pour les particules trop larges.

Ces phénomènes d'élimination dépendent de paramètres physico-chimiques des complexes : en utilisant des particules de petite taille, de faible charge, possédant une surface hydrophile, il est possible de réduire leur importance.

### b) L'entrée dans la cellule cible

Si le complexe a réussi à atteindre les cellules cibles, il doit encore y être internalisé. Pour cela, de nombreux mécanismes sont envisageables, selon différents paramètres, comme le mode d'interaction avec les membranes, la taille des particules ou le type cellulaire (Figure 12).

---

<sup>87</sup> Bally M. B., Harvie P. H., Wong F. M., Kong S., Wasan E. K., Reimer D. L. (1999) Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 38, 291-315.

<sup>88</sup> Stolnik S., Illum L., Davis S.S. (1995) Long circulating microparticulate drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16, 195-214.

<sup>89</sup> Yang J-P., Huang L. (1997) Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ration of cationic liposome to DNA, *Gene Ther.*, 4, 950-960.

<sup>90</sup> Simberg D., Weisman S., Talmon Y., Faerman A., Tzipora S., Barenholz Y. (2003) The role of organ vascularisation and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection, *J. Biol. Chem.*, 278, 41, 39858-39865.

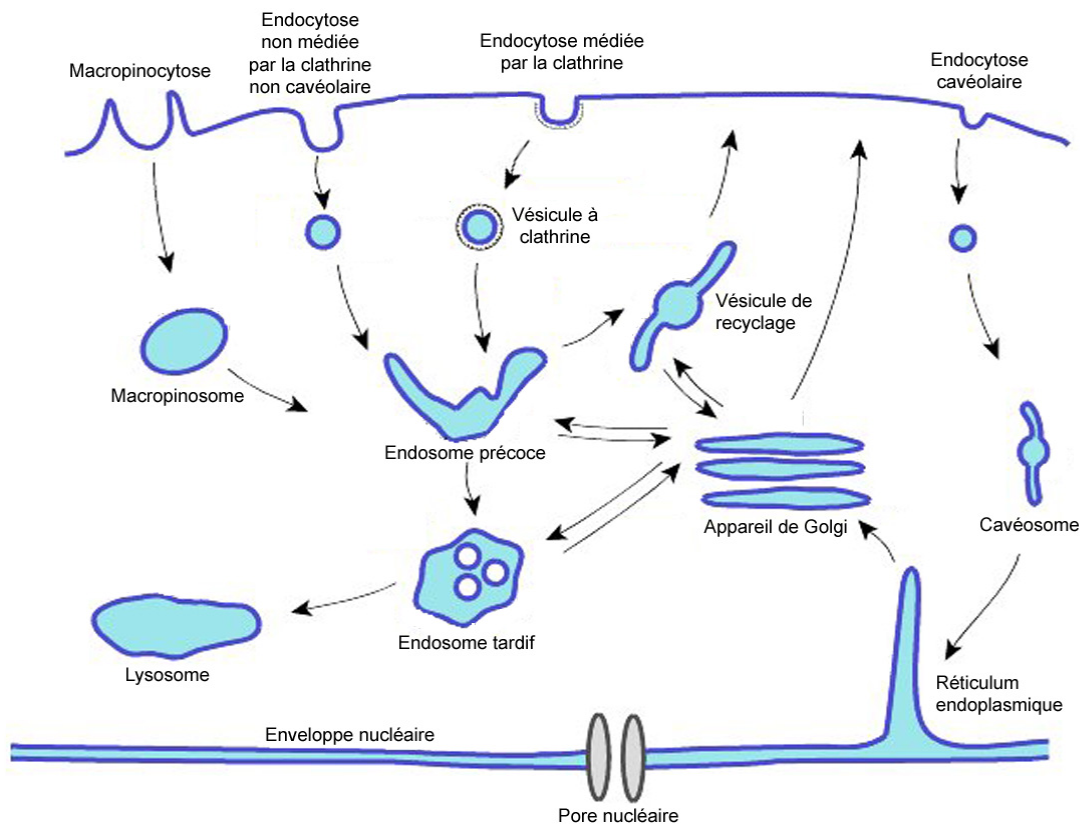


Figure 12 : Schéma des différentes voies d'entrée dans une cellule

Si certains systèmes ont été étudiés précisément, montrant par exemple la pénétration des lipopolyamines par une endocytose faisant intervenir la clathrine,<sup>91</sup> il est difficile d'en déduire un comportement général pour les systèmes cationiques. Schématiquement, nous pouvons considérer que les vecteurs ont en commun les étapes suivantes :

### ➤ L'interaction avec les membranes cellulaires

Elle peut se faire grâce à la charge cationique des complexes qui interagissent avec les glycosaminoglycans (GAG), i.e. les terminaisons des protéines membranaires appelées protéoglycans.<sup>92</sup> On peut citer par exemple l'acide hyaluronique ou le sulfate d'héparane. Il a été montré qu'un traitement préalable des souris par l'héparinase réduit la transfection dans leurs poumons, prouvant ainsi l'implication de ces composés dans le mécanisme de transfection.<sup>93</sup>

Par ailleurs, l'interaction peut être ciblée, grâce à l'utilisation de ligands spécifiques des récepteurs des cellules visées. Cette stratégie a l'avantage de privilégier les interactions spécifiques et permet, *a priori*, un ciblage plus efficace et donc une diminution de la quantité de complexes administrés. Les premiers ligands développés ont été les asialoorosomucoïdes,

<sup>91</sup> Labat-Moleur F., Steffan A-M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberlong F., Brambilla E., Behr J-P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines, *Gene Ther.*, 3, 1010-1017.

<sup>92</sup> Ruponen M., Honkakoski P., Rönkkö S., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A (2003) Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery, *J. Controlled Release*, 93, 213-217.

<sup>93</sup> Medina-Kauwe L. K., Xie J., Hamm-Alvarez S. (2005) Intracellular trafficking of non viral vectors, *Gene Ther.*, 11, 1-18.

qui, couplés à la polylysine par exemple, permettent de transférer les hépatocytes *in vitro* et *in vivo*.<sup>94</sup> Depuis, de nombreux ligands ont été développés, comme la transférine, le folate,<sup>95</sup> et toute une gamme d'anticorps dirigés contre les récepteurs de certains types de cellules.<sup>96</sup>

### ➤ L'entrée dans la cellule

La majorité des polyplexes et lipoplexes entreraient par un mécanisme d'endocytose faisant intervenir la clathrine,<sup>97</sup> même si un phénomène de fusion entre les lipides cationiques et la membrane cellulaire, proposé à l'origine,<sup>57</sup> n'est pas exclu.

Si le complexe ADN/vecteur peut emprunter plusieurs voies différentes (Figure 12), tous ces mécanismes ont un intermédiaire commun : une vésicule de transport intracellulaire. Pour plus de facilités, elle sera appelée « endosome », quelle que soit la voie utilisée pour entrer dans la cellule. Cet endosome évolue vers les lysosomes dont le contenu est détruit par les enzymes de dégradation. Au cours de cette maturation, les endosomes sont progressivement acidifiés par des pompes à protons, qui importent des ions à travers la membrane. Les vecteurs internalisés par ce mécanisme doivent s'échapper de l'endosome avant l'arrivée dans le lysosome.

### c) La sortie de l'endosome

L'inefficacité reconnue des vecteurs synthétiques est probablement liée à ce moment crucial du transfert de gènes. En effet, si l'on observe souvent une forte internalisation des complexes, ce n'est pas pour autant que la transfection a lieu. Il a été mis en évidence que la plus grande partie des complexes est piégée et dégradée dans les endosomes et que seule une infime quantité gagne le cytosol.<sup>98</sup>

### ➤ Pour les polyplexes

Il est possible d'utiliser le pouvoir tampon des amines non protonées. Après internalisation dans les endosomes, le polyplexe peut tamponner l'acidification du milieu conduite par les ATPases. Ces dernières doivent alors transporter davantage de protons vers l'endosome pour maintenir l'acidité du milieu (Figure 13). Ce flux s'accompagne de l'entrée stoechiométrique d'ions chlorure et conduit donc à une augmentation de la concentration saline. Ceci mène à l'éclatement osmotique de la vésicule, à la rupture de l'endosome et à la libération des complexes dans le cytosol. Un tel mécanisme, appelé « éponge à proton »<sup>99</sup> évite la dégradation des complexes dans les lysosomes et améliore de fait l'efficacité de la transfection. C'est actuellement l'argument principal quant à la forte efficacité du PEI *in vitro*.

---

<sup>94</sup> Wu G.Y., Wu C.H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, 263, 14621-14624.

<sup>95</sup> Hofland H. E., Masson C., Iginla S., Osetinsky I., Reddy J. A., Leamon C. P., Scherman D., Bessodes M., Wils P. (2002) Folate-targeted gene transfer *in vivo*, *Mol. Ther.*, 5, 6, 739-744.

<sup>96</sup> Merdan T., Kopecek J., Kissel T. (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 715-758.

<sup>97</sup> Labat-Moleur F., Steffan A-M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberlong F., Brambilla E., Behr J-P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines, *Gene Ther.*, 3, 1010-1017.

<sup>98</sup> Lechardeur D., Verkman A. S., Lukacs G. L. (2005) Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 755-767.

<sup>99</sup> Behr J.P. (1997) The proton sponge : a trick to enter cells the viruses did not exploit, *Chimia*, 51, 34-36.

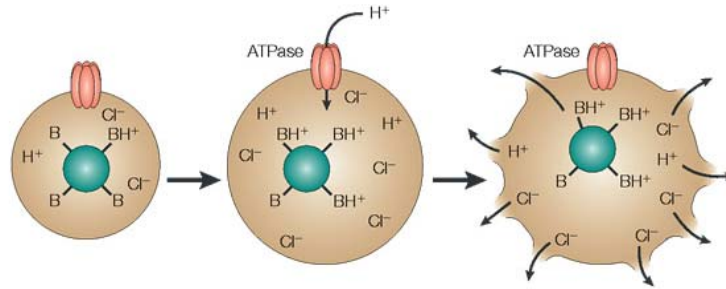


Figure 13 : Mécanisme de l'éponge à proton<sup>100</sup>

### ➤ Pour les lipoplexes

L'équipe de Szoka a proposé un mécanisme de « flip flop » pour l'ADN<sup>101</sup> comme pour les oligonucléotides.<sup>102</sup> Ayant constaté que l'ajout de lipides anioniques déstabilisait les lipoplexes et conduisait au relargage de l'ADN, ils ont suggéré que le complexe initie la déstabilisation de la membrane endosomale par une inversion des lipides anioniques principalement situés sur la paroi cytoplasmique (Figure 14). Ils pourraient ensuite diffuser dans les complexes pour former des paires avec les lipides cationiques. Cette nouvelle interaction déplacerait l'ADN qui serait alors libéré dans le cytoplasme.

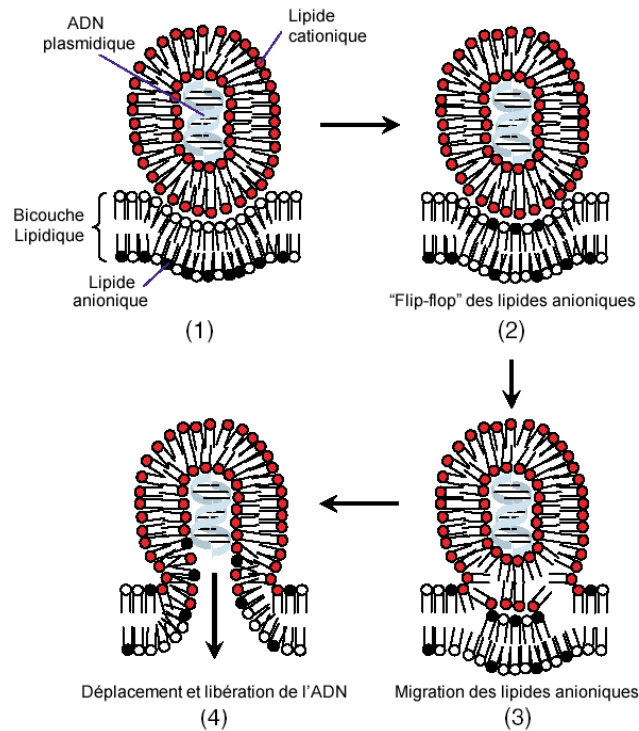


Figure 14 : Mécanisme proposé de « flip-flop »<sup>103</sup>

<sup>100</sup> Source : Pack D. W., Hoffman A. S., Pun S., Stayton P. S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 581-593.

<sup>101</sup> Xu Y, Szoka F. C. Jr (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry*, 35, 5616-5623.

<sup>102</sup> Zelphati O., Szoka F. C. Jr (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11493-11498.

<sup>103</sup> Source : Medina-Kauwe L. K., Xie J., Hamm-Alvarez S. (2005) Intracellular trafficking of non viral vectors, *Gene Ther.*, 11, 1-18.



Pour augmenter la quantité de complexes qui s'échappent de l'endosome, de nombreuses stratégies ont été développées :

- L'ajout de la dioleoylphosphatidylethanolamine (**DOPE**) dans la formulation permet d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes, probablement en favorisant la transition de la phase lamellaire vers la phase hexagonale nécessaire à la déstabilisation de la membrane endosomale.<sup>93</sup>
- L'utilisation de **peptides fusogènes**, d'origine virale ou synthétique, capables d'induire la fusion ou la lyse des endosomes.<sup>96</sup>
- **Les liposomes acido-sensibles**, stables à pH physiologique mais qui ont la particularité de déstabiliser les bicouches lipidiques et d'acquérir des propriétés fusogènes en milieu acide et donc dans les endosomes.<sup>104</sup>

#### d) Le transport dans le cytosol

Si de nombreuses études ont porté sur les étapes précédentes du transfert de gènes, peu d'informations sont disponibles sur le devenir du complexe à la sortie de l'endosome. Si les complexes sont microinjectés directement dans le noyau, ils n'induisent pas des taux de transfection élevés,<sup>101</sup> ce qui signifie que l'ADN doit être libéré avant l'entrée dans le noyau. Cette hypothèse a été vérifiée par l'utilisation de la T7 polymérase, qui a permis la transcription du gène rapporteur dans le cytoplasme.<sup>98</sup> Pourtant, les travaux de Lukacs semblent contradictoires avec ces résultats : ils ont montré que la mobilité de l'ADN est inversement proportionnelle à sa taille et qu'un ADN de plus de 2 kb est immobile dans le cytoplasme et a une durée de vie très limitée car il est facilement accessible aux enzymes de dégradation telles que les DNases.<sup>105</sup> Des études mécanistiques sont encore nécessaires pour comprendre où et comment ont lieu la libération de l'ADN et son transport jusqu'au noyau.

#### e) L'entrée dans le noyau

Le noyau est le dernier rempart contre l'invasion de corps étrangers et, par conséquent le mieux protégé. Il a été montré qu'un plasmide injecté dans le cytoplasme d'une cellule ne donne aucune réponse de transfection, alors que l'injection dans le noyau entraîne l'expression du gène dans plus de la moitié des cellules.<sup>106</sup> Pour pénétrer dans le noyau, les vecteurs profitent généralement de la mitose : les cellules en division sont beaucoup plus faciles à transfecter que les cellules quiescentes et le transfert de gènes est beaucoup plus efficace lorsqu'il précède la mitose.<sup>107</sup> Lors de la division cellulaire, l'enveloppe du noyau est désorganisée et permet l'intrusion d'une petite quantité d'ADN qui engendre l'expression du gène.

---

<sup>104</sup> Simoes S., Moreira J. N., Fonseca C., Düzgünes N., Pedrosa de Lima M. (2004) On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 947-965.

<sup>105</sup> Lukacs G. L., Haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N., Verkman A. S. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J. Biol. Chem.*, 275, 3, 1625-1629.

<sup>106</sup> Dean D. A., Strong D. D., Zimmer W. E. (2005) Nuclear entry of nonviral vectors, *Gene Ther.*, 12, 881-890.

<sup>107</sup> Brunner S., Sauer T., Carotta S., Cotten M., Saltik M., Wagner E. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus, *Gene Ther.*, 7, 401-407.



En dehors de la mitose, l'entrée dans le noyau ne peut se faire que par les complexes de pores nucléaires<sup>108</sup> (NPC), canaux étroits qui permettent la diffusion passive des petites molécules (maximum 9 nm de diamètre) ou le transport actif des plus grandes (jusqu'à 28 nm de diamètre). On peut augmenter la pénétration nucléaire des plasmides en utilisant des protéines nucléaires habilitées à traverser les NPC, comme les facteurs de transcription qui s'associent aux NPC par l'intermédiaire des importines. En effet, l'introduction d'une séquence ciblant le noyau – *DNA nuclear targeting sequences*, DTS – dans la cassette d'expression pourrait permettre l'interaction avec ces facteurs de transcription, puis avec les importines, et donc le transport actif dans le noyau<sup>106</sup> (Figure 15). Il est aussi possible de plagier le mécanisme d'action des virus, qui possèdent des signaux de localisation cellulaire (NLS). L'ajout de tels peptides – par exemple issus du virus SV-40 – à la formulation permet la reconnaissance par les importines et la translocation des plasmides dans le noyau.<sup>108</sup>

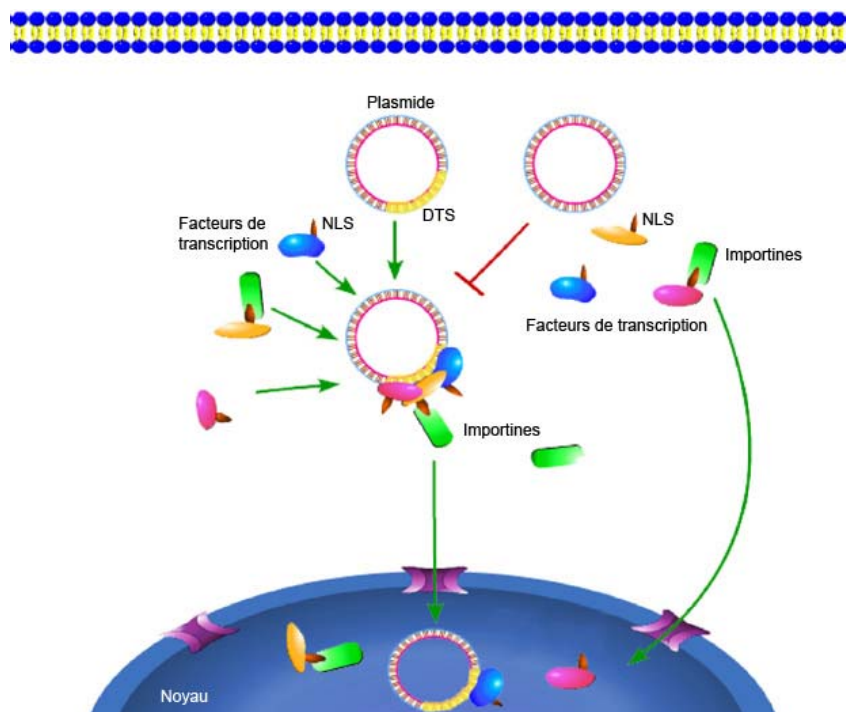


Figure 15 : Stratégie « DTS » pour la pénétration nucléaire<sup>109</sup>

En résumé, le trajet d'un vecteur apparaît semé d'embûches qui ne sont pas encore toutes identifiées et qui rendent la conception d'un système de transfert de gènes particulièrement complexe. Les vecteurs cationiques ont en général une très bonne efficacité *in vitro*, mais considérablement réduite *in vivo*. En effet, les particules sont rapidement éliminées de la circulation sanguine, généralement avant d'atteindre leur cible. Ceci est attribué à la forte charge cationique des complexes qui induit des interactions non spécifiques avec tout type de cellules et qui entraîne une forte toxicité. C'est pourquoi les systèmes non cationiques sont de plus en plus développés.

<sup>108</sup> Escriou V., Carrière M., Scherman D., Wils P. (2003) NLS bioconjugates for targeting therapeutics genes to the nucleus, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 295-306.

<sup>109</sup> Source : Dean D. A., Strong D. D., Zimmer W. E. (2005) Nuclear entry of nonviral vectors, *Gene Ther.*, 12, 881-890.

## C. Les Vecteurs non cationiques

### 1. Vecteurs anioniques

L'alternative logique à un composé cationique est son homologue anionique. Il existe en effet de nombreux lipides anioniques capables de former des liposomes, comme l'association DOPG/DOPE ou CHEMS/DOPE. Leur charge négative présente un handicap quant à son interaction avec l'ADN, lui aussi polyanionique, et c'est pour cela qu'il est nécessaire d'ajouter un agent de condensation cationique. Ce peut être :

- Le **calcium**, qui entraîne un changement conformationnel de l'ADN vers une structure plus compacte, cependant différente de la conformation de l'ADN dans un lipide cationique,<sup>110</sup>
- Un **polycation**, comme la protamine, protéine naturelle dont le rôle est de condenser le matériel génétique dans les gamètes mâles,<sup>111</sup>
- Un **polymère cationique**, comme le PEI, permettant d'encapsuler les polyplexes dans des liposomes anioniques,<sup>112</sup>

Avec les vecteurs anioniques, on constate une forte diminution de la toxicité des complexes, et une meilleure résistance au sérum. Mais l'internalisation est beaucoup moins importante que celle des lipides cationiques du fait de leur charge de surface négative.<sup>113</sup> Par conséquent, l'efficacité de transfection est généralement moins bonne que les systèmes cationiques. Ces systèmes peuvent être optimisés en y ajoutant des agents fusogènes,<sup>114</sup> et des éléments de ciblage.<sup>112</sup>

Cependant, l'équipe de Papahadjopoulos a montré qu'une forte charge négative peut induire une élimination rapide *in vivo* et que finalement c'est avec une faible charge de surface – positive ou négative – que la durée de vie des particules est la plus grande.<sup>115</sup>

### 2. Les vecteurs neutres existants

L'attrait des vecteurs de faible charge de surface est donc très grand. Il a été constaté depuis longtemps que les particules dont le ratio lipide cationique/ADN, appelée aussi +/- ou N/P est égal à 1 sont particulièrement efficaces *in vitro*.<sup>116</sup> Ceci est dû à l'agrégation des complexes et à leur sédimentation sur la surface des cellules, qui augmentent la probabilité de pénétration. Cependant, ce système n'est pas applicable *in vivo* car les grosses particules sont

---

<sup>110</sup> Patil S. D., Rhodes D. G. (2000) Conformation of oligodeoxynucleotides associated with anionic liposomes, *Nucleic Acid Research*, 28, 21, 4125-4129.

<sup>111</sup> Guo W., Lee R. J. (2000) Efficient gene delivery using anionic liposomes-complexes polyplexes (LPDII), *Bioscience Reports*, 20, 5, 419-432.

<sup>112</sup> Mady M. M., Ghannam M. M., Khalil W. A., Repp R., Markus M., Rascher W., Müller R., Fahr A. (2004) Efficient gene delivery with serum into human cancer cells using targeted anionic liposomes, *J. Drug Targeting*, 12, 1, 11-18.

<sup>113</sup> Patil S. D., Rhodes D. G., Burgess D. J. (2005) Biophysical characterization of anionic lipoplexes, *Biochem. Biophys. Acta*, 1711, 1-11.

<sup>114</sup> Lorenzi G. L., Lee K-D. (2005) Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation, *J. Gene Med.*, 7, 1077-1085.

<sup>115</sup> Gabizon A., Papahadjopoulos D. (1992) The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1103, 1, 94-100.

<sup>116</sup> Escriou V., Ciolina C., Lacroix F., Byk G., Scherman D. Wils P. (1998) Cationic lipid-mediated gene transfer : effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1368, 2, 276-288.

rapidement éliminées et seules circulent celles de taille nanométrique. Les efforts se sont donc concentrés sur l'obtention de particules neutres stables colloïdalement. Pour cela, plusieurs stratégies sont possibles : soit masquer les charges positives des complexes ADN/vecteurs, soit utiliser des systèmes neutres et les adapter à l'encapsulation d'ADN.

### a) Le masquage des charges de surface

La solution la plus utilisée est de partir d'un complexe ADN/vecteur dont les propriétés de transfection sont bonnes, et de masquer les charges excessives par différentes techniques.

#### ➤ La modification chimique en surface des particules

Il s'agit de neutraliser les amines libres de surface, *e.g.* par une réaction d'amidation. Cela peut être fait soit avant la complexation de l'ADN, comme pour le dendrimère PAMAM,<sup>117</sup> on constate alors une réduction de sa toxicité ; soit après la formation du lipoplexe, par une méthode de *post-grafting* qui a l'avantage de ne pas modifier l'association avec l'ADN, et permet d'augmenter le temps de circulation systémique *in vivo*.<sup>118</sup>

#### ➤ L'ajout d'agents fusogènes ou ciblant dans la formulation

L'ajout d'éléments de ciblage peut modifier la charge de surface des particules. Par exemple, les polysaccharides, permettent, à la fois, de réduire la taille et la charge des particules et d'induire des interactions spécifiques avec les hépatocytes.<sup>119</sup> Il en est de même avec certains peptides fusogènes anioniques qui augmentent l'efficacité de transfection tout en diminuant la toxicité des vecteurs et qui se révèlent prometteurs *in vivo*.<sup>120</sup>

#### ➤ L'enrobage par le polyéthylène glycol (PEG)

C'est le moyen le plus utilisé actuellement, développé au départ pour les liposomes et la vectorisation de médicaments.<sup>121</sup> Le polyéthylène glycol est un polymère hydrophile et neutre, qui peut être couplé à un lipide et s'insérer ainsi dans la bicouche lipidique. La présence du polymère en surface permet de stabiliser les particules, d'éviter leur agrégation, de réduire la charge de surface et les interactions avec les membranes cellulaires. *In vivo*, cela se traduit par une diminution de l'interaction avec les protéines sériques et une augmentation du temps de circulation.<sup>88</sup> On parle alors de liposomes «furtifs» (Figure 16). L'application aux lipoplexes<sup>122</sup> comme aux polyplexes<sup>123</sup> donne des résultats similaires et prometteurs en

---

<sup>117</sup> Lee J. H., Lim Y-B, Choi J. S., Kim T., Kim H. J., Yoon J. K., Kim K., Park J. (2003) Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency, *Bioconjugate Chem.*, 14, 1214-1221.

<sup>118</sup> Thompson B., Mignet N., Hofland H., Lamons D., Seguin J., Nicolazzi C., de la Figuera N., Kuen R. L., Meng X. Y., Scherman D., Bessodes M. (2005) Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery, *Bioconjugate Chem.*, 16, 608-614.

<sup>119</sup> Bettinger T., Remy J-S., Erbacher P. (1999) Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes, *Bioconjugate Chem.*, 10, 558-561.

<sup>120</sup> Simões S., Slepishkin V., Gaspar R., Pedroso de Lima M. C., Düzgünes N. (1998) Gene delivery by negatively charged ternary complexed of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusogenic peptides, *Gene Ther.*, 5, 955-964.

<sup>121</sup> Papahadjopoulos D., Allen T. M., Bagizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S. K., Lee K-D., Woodle M. C., Lasic D. D., Redemann C., Martin F. J. (1991) Sterically stabilized liposomes : improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11460-11464.

<sup>122</sup> Tam P., Monck M., Lee D., Ludkovski O., Leng E.C., Clow K., Stark H., Scherrer P., Graham R. W., Cullis P. R. (2000) Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy, *Gene Ther.*, 7, 1867-1874.

fonction de la longueur du polymère et de sa proportion dans la formulation.<sup>124</sup> Malheureusement, la présence du PEG inhibe la transfection *in vitro*.<sup>125</sup> Le polymère pourrait stabiliser la phase lamellaire et empêcher la transition en phase hexagonale nécessaire à la déstabilisation dans l'endosome.<sup>126</sup> Par ailleurs, la charge de surface reste toujours légèrement positive car le polymère peut adopter une structure dite en « champignon » et ne pas se déployer sur toute la surface des particules.<sup>127</sup>

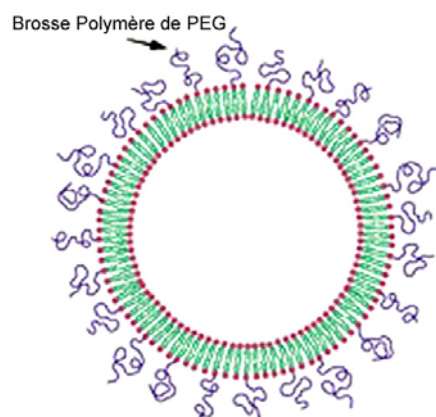


Figure 16 : Représentation schématique d'un liposome furtif<sup>128</sup>

### ➤ L'association avec une protéine sérique, l'albumine

L'équipe de Simões a développé cette stratégie originale pour pallier les problèmes d'inhibition de la transfection par le sérum. En associant l'albumine, protéine anionique, aux lipoplexes cationiques, la transfection est largement améliorée *in vitro* sans modification de la taille des particules dans le sérum, probablement grâce à la capacité de l'albumine à favoriser l'endocytose. Malheureusement, les interactions avec les autres protéines plasmatiques ne sont pas diminuées, notamment avec les protéines du complément qui induisent l'opsonisation.<sup>129</sup>

<sup>123</sup> Bromberg L., Deshmukh S., Temchenko M., Iourtchenko L., Alakhov V., Alvarez-Lorenzo C., Barreiro-Iglesias R., Concheiro A., Hatton T. A. (2005) Polycationic block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) for cell transfection, *Bioconjugate Chem*, 16, 3, 626-633.

<sup>124</sup> Harvie P., Wong F. M. P., Bally M. B. (2000) Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles, *J. Pharm. Sci.*, 89, 5, 652-663.

<sup>125</sup> Song L. Y., Ahkong Q. F., Rong Q., Wang Z., Ansell S., Hope M. J., Mui B. (2002) Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1558, 1-13.

<sup>126</sup> Shi F., Wasingu L., Nomoden A., Stuart M. C. A., Polushkin E., Engberts J. B., Hoekstra D. (2002) Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides ; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions, *Biochem. J.*, 366, 333-341.

<sup>127</sup> Nicolazzi C., Mignet N., de la Figuera N., cadet M., Torero Ibad R., Seguin J., Scherman D., Bessodes M. (2003) Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmic circulation time, *J. Controlled Release*, 88, 429-443.

<sup>128</sup> source : <http://www.rxlist.com/cgi/images/doxil4.gif>

<sup>129</sup> Faneca H., Simões S., Pedroso de Lima M. C. (2004) Association of albumin or protamine to lipoplexes : enhancement of transfection and resistance to serum, *J. Gene Med.*, 6, 681-692.

### ➤ Un autre mode d'assemblage des complexes

L'équipe de Jean-Paul Behr a développé des détergents cationiques à terminaison thiol qui ont la particularité de s'oxyder spontanément pour former des particules stables avec l'ADN<sup>130</sup> (Figure 17). Ces complexes ont une charge de surface négative et un temps de circulation systémique augmenté par rapport aux systèmes cationiques.<sup>131</sup> De plus, dans l'endosome, le réseau de ponts disulfure peut se dénouer et libérer les détergents qui permettent au plasmide de s'échapper de l'endosome :<sup>132</sup>

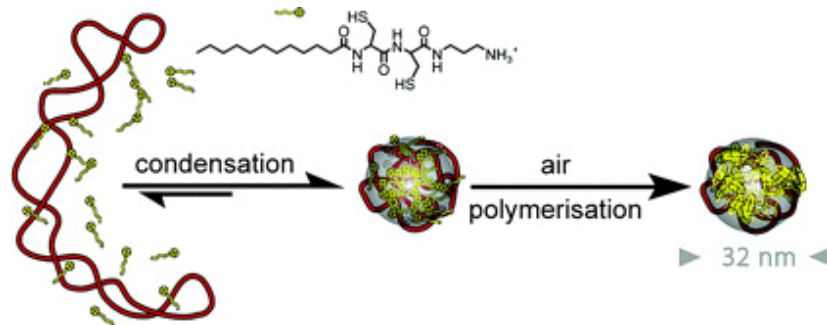


Figure 17 : Condensation de l'ADN par un détergent cationique oxydable<sup>131</sup>

### b) Systèmes neutres

En parallèle, des systèmes intrinsèquement neutres ont été développés, permettant *a priori* d'éviter les inconvénients des systèmes chargés.

### ➤ L'encapsulation d'ADN dans les liposomes

Les premiers essais de vecteurs d'ADN datent de 1979 et consistent à introduire des fragments d'ADN dans le compartiment aqueux des liposomes.<sup>133</sup> L'équipe de Papahadjopoulos a réussi à induire une transfection d'ADN viral dans des cellules de mammifères 100 fois plus efficace qu'avec de l'ADN nu, montrant ainsi toute la potentialité de cette technique.<sup>134</sup> Mais le taux d'encapsulation reste faible, entre 10% et 50%<sup>135</sup> du fait du manque d'interactions favorables entre les lipides et l'ADN. Une méthode originale mise au point par Sullivan<sup>136</sup> a permis d'atteindre des taux d'encapsulation voisins de 80%. Il s'agit tout d'abord d'ajouter aux liposomes des quantités précises de calcium et d'éthanol, pour provoquer la condensation de l'ADN, puis de les éliminer par dialyse. Il en résulte de petits liposomes neutres, stables, qui protègent l'ADN et circulent dans le sang (une heure après

<sup>130</sup> Blessing T., Remy J-S., Behr J-P. (1998) Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1427-1431.

<sup>131</sup> Chittimalla C. Zammuto-Italiano L., Zuber G., Behr J-P. (2005) Monomolecular DNA nanoparticles for intravenous delivery of genes, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 32, 11436-11441.

<sup>132</sup> Dauty E., Remy J-S., Zuber G., Behr J-P. (2002) Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor, *Bioconjugate Chem.*, 13, 831-839.

<sup>133</sup> Mannino R. J., Allebach E. S., Strohl W. A. (1979) Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles, *FEBS Lett.*, 101, 2, 229-232.

<sup>134</sup> Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells, *J. Biol. Chem.*, 255, 21, 10431-10435.

<sup>135</sup> Perrie Y., Gregoriadis G. (2000) Liposome-entrapped plasmid DNA : characterisation studies, *Biochem. Biophys. Acta*, 1475, 125-132.

<sup>136</sup> Bailey A., Sullivan S. M. (2000) Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium, *Biochim. Biophys. Acta*, 1468, 239-252.

l'injection, 30% de la dose est retrouvée dans la circulation sanguine) ; mais ils n'ont pas montré d'activité de transfection.

### ➤ Les sphérulites

Les sphérulites sont constitués de phospholipides comme les liposomes mais du fait de leur méthode de préparation, leur structure ne possède pas de centre hydrophile. Ils sont constitués d'une alternance de bicouches concentriques d'amphiphiles et d'espaces aqueux jusqu'au centre de la particule.<sup>137</sup> L'équipe de D. Roux a montré qu'il était possible d'y insérer des oligonucléotides<sup>138</sup> ou de l'ADN plasmidique<sup>139</sup> et de les utiliser ainsi comme vecteurs de gènes *in vivo*, puisqu'ils ne sont pas toxiques et ne s'associent pas aux protéines plasmatiques. Cependant ils n'ont pas encore montré d'efficacité de transfection.<sup>140</sup>

En résumé, les systèmes neutres sont encore peu développés et ne sont pas capables de concurrencer les systèmes cationiques, probablement car ils n'ont pas d'interaction particulière avec l'ADN. Il faudrait, pour les améliorer, trouver un moyen alternatif d'interagir avec l'ADN en l'absence de charges positives.

### 3. Vers un nouveau type d'interaction avec l'ADN

Les liaisons hydrogène jouent un rôle considérable dans la structure tridimensionnelle des protéines et des acides nucléiques. Leur énergie est d'environ 5 kcal/mol, ce qui est suffisamment élevé pour associer deux composés et suffisamment faible pour être réversible. Il serait donc intéressant d'exploiter ce moyen pour associer l'ADN. Quelques travaux ont été menés sur cette stratégie :

- Les lipides développés récemment par P. Barthélémy possèdent **une base nucléosidique**. Seuls, ils forment des assemblages supramoléculaires, notamment des hydrogels, capables de piéger l'ADN dans leurs cavités.<sup>141</sup> L'ajout d'un motif glucose permet l'interaction et l'association avec l'ADN, comme l'ont montré les études spectroscopiques.<sup>142</sup>
- L'équipe de Aoyama a mis au point des **clusters saccharidiques** capables d'associer un plasmide pour former des particules d'environ 50 nm qui donnent une transfection dix fois plus importante qu'un lipide cationique classique.<sup>143</sup>
- Des travaux ont été réalisés à partir du composé polyaromatique **Hoechst 33258**, connu pour sa capacité à s'insérer dans le petit sillon de l'ADN. Seul ou greffé sur un

<sup>137</sup> Pott T., Roux D. (2002) DNA intercalation in neutral multilamellar membranes, *FEBS Lett.*, 511, 150-154.

<sup>138</sup> Mignet N., Brun A., Degert C., Delord B., Roux D., Hélène C., Laversanne R., François J-C. (2000) The spherulites : a promising carrier for oligonucleotides delivery, *Nucleic Acid Res.*, 28, 16, 3134-3142.

<sup>139</sup> Freunf O., Mahy P., Amedee J., Roux D., Laversanne R. (2000) Encapsulation of DNA in new multilamellar vesicles prepared by shearing a lyotropic lamellar phase, *J. Microencapsulation*, 17, 2, 157-168.

<sup>140</sup> Roux D. Chenevier D. Pott T., Navailles L., Regev O., Mondain Monval O. (2004) Conception and realization of a non-viral and non-cationic DNA vector, *Curr. Med. Chem.*, 11, 2, 169-177.

<sup>141</sup> Moreau L., Barthélémy P., El Maataoui M., Grinstaff M. W. (2004) Supramolecular assemblies of nucleoside phosphocholine amphiphiles, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 7533-7539.

<sup>142</sup> Arignon J., Prat C. A., Grinstaff M. W., Barthélémy P. (2005) Nucleic acid complexing glycosyl nucleoside-based amphiphile, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 864-872.

<sup>143</sup> Aoyama Y., Kanamori T., Nakai T., Sasaki T., Horiuchi S., Shinsuke S., Niidome T. (2003) Artificial viruses and their application to gene delivery. Size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3455-3457.

lipide,<sup>144</sup> il est capable de former des complexes avec l'ADN. Simplement associé à l'ADN, il a permis d'obtenir une transfection comparable à des lipides cationiques *in vitro*.<sup>145</sup> Il semble emprunter une voie différente des lipides cationiques car l'interaction avec les protéoglycans chargés négativement n'est pas nécessaire et peu de complexes sont retrouvés dans les endosomes, mais très vite dans la région périnucléaire.

Dans le cadre du présent travail, notre stratégie se positionne dans cette lignée : nous avons choisi la fonction thiourée pour interagir par des liaisons hydrogène avec l'ADN.

## **D. Les lipopolythiourées**

### **1. La fonction thiourée**

Les dérivés thiourée sont des composés industriels très répandus. La production annuelle mondiale est supérieure à 10 000 tonnes. La thiourée, NH<sub>2</sub>-CS-NH<sub>2</sub>, est principalement utilisée comme intermédiaire en synthèse organique, accélérateur de vulcanisation dans la production du caoutchouc ; elle entre dans la composition des colles, des résines anti-feu, des agents antiternissement.<sup>146</sup> En biologie, la thiourée peut limiter les dommages causés par les radicaux hydroxyle sur les protéines.<sup>147</sup>

#### **a) Donneur de liaisons hydrogène**

Les thiourées sont reconnues pour leur forte capacité à former des liaisons hydrogène (Figure 18). Seules, elles peuvent former des solides dont l'organisation dépend des liaisons hydrogène intermoléculaires.<sup>148</sup> Ces propriétés leur permettent aussi d'être de bons agents gélifiants dans les solvants organiques<sup>149</sup> et de forts ligands de métaux.<sup>150</sup> Il est encore possible de conserver la structure hélicoïdale de duplexes d'oligonucléotides en modifiant les fonctions phosphodiester par des motifs thiourée.<sup>151</sup>

---

<sup>144</sup> Soto J., Bessodes M., Pitard B., Mailhe P., Scherman P., Byk G. (2000) Non electrostatic complexes with DNA : towards novel synthetic gene delivery systems, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 10, 911-914.

<sup>145</sup> Fong S., Heath T., Fong P., Liggitt D., Debs R. J. (2004) Membrane-permeant, DNA-binding agents alter intracellular trafficking and increase the transfection efficiency of complexed plasmid DNA, *Mol. Ther.*, 10, 4, 706-718.

<sup>146</sup> Ziegler-Skylakakis K., Nill S., Pan J. F., Andrae U. (1998) S-Oxygenation of thiourea results in the formation of genotoxic products, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31, 362-373.

<sup>147</sup> Zhu B-Z., Antholine W. E., Frei B. (2002) Thiourea protects against copper-induced oxidative damage by formation of a redox-inactive thiourea-copper complex, *Free radical Biology & Medicine*, 32, 12, 1333-1338.

<sup>148</sup> Custelcean R., Gorbunova M. G., Bonnesen V. (2005) Steric control over hydrogen bonding in crystalline organic solids : a structural study of N,N-dialkylthioureas, *Chem. Eur. J.*, 11, 1459-1466.

<sup>149</sup> George M., Tan G., John V. T., Weiss R. G. (2005) Urea and thiourea derivatives as low molecular-mass organogelators, *Chem. Eur. J.*, 11, 3243-3254.

<sup>150</sup> Cucumano M., Di Pietro M-L., Giannetto A., Vainiglia P-A. (2005) The intercalation to DNA of bipyridyl complexes of platinum(II) with thioureas, *J. Inorg. Biochem.*, 99, 560-565.

<sup>151</sup> Challa H., Bruice T. C. (2001) Incorporation of positively charged deoxynucleic S-methylthiourea linkages into oligodeoxyribonucleotides, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 2423-2427.

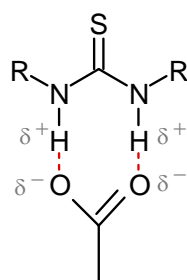


Figure 18 : Liaisons hydrogène induites par la fonction thiourée

Par rapport à l'urée, plus répandue, la fonction thiourée présente certains avantages qui conduisent à la choisir :

- La fonction thiourée est un meilleur donneur de liaisons hydrogène que l'urée car les protons portés par l'azote sont plus acides que ceux de l'urée ( $pK_A=21,1$  vs  $26,9$  dans le DMSO),<sup>152</sup>
- Les liaisons hydrogène intermoléculaires sont plus faibles que dans le cas de l'urée car le soufre est moins bon accepteur de liaisons hydrogène que l'oxygène,<sup>153</sup>
- Les liaisons hydrogène formées sont plus flexibles du fait de la plus forte polarisation du soufre par rapport à l'oxygène,<sup>154</sup>
- La thiourée a une meilleure capacité à chélater les anions que l'urée.<sup>155</sup>

### b) Ligand d'anions

Ces fortes liaisons hydrogène ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la reconnaissance moléculaire des anions.<sup>156</sup> Ce sont en effet de très bons récepteurs d'anions, tels que les carboxylates,<sup>157</sup> les sulfates,<sup>158</sup> les nitrates, les chlorures, les chlorates ou bien les phosphates.<sup>159</sup> De plus, une très forte sélectivité a été notée pour ces derniers,<sup>160</sup> probablement à cause de la forte basicité des anions phosphate,<sup>161</sup> de la multiplicité des liaisons possibles et

<sup>152</sup> Bordwell F. G., Algrim D. J., Harrelson J. A. (1988) The relative ease of removing a proton, a hydrogen atom, or an electron from carboxamides versus thiocarboxamides, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5903-5904.

<sup>153</sup> Scheerder J., Engbersen J. F., Casnati A., Ungaro R., Reinhoudt D. N. (1995) Complexation of halide anions and tricarboxylate anions by neutral urea-derivatized p-tert-butylcalix[6]arenes, *J. Org. Chem.*, 60, 6448-6454.

<sup>154</sup> Kato R., Nishizawa S., Hayashita T., Teramae N. (2001) A thiourea-based chromoionophore for selective binding and sensing of acetate, *Tet. Lett.*, 42, 30, 5053-5056.

<sup>155</sup> Gomez D. E., Fabbri L., Licchelli M., Monzani E. (2005) Urea vs. Thiourea in anion recognition, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 1495-1500.

<sup>156</sup> Beer P. D., Gale P. A. (2001) Anion recognition and sensing : the state of the art and future perspectives, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 486-516.

<sup>157</sup> Benito J. M., Gomez-Marcia M., Jimenez Blanco J. L., Ortiz Mellet C., Garcia Fernandez J. M. (2001) Carbohydrate-based receptors with multiple thiourea binding sites. Multipoint hydrogen bond recognition of dicarboxylates and monosaccharides, *J. Org. Chem.*, 66, 1366-1372.

<sup>158</sup> Wilcox C. S., Kim E-I., Romano D., Kuo L. H., Burt A. L., Curran D. P. (1995) Experimental and theoretical studies of substituent effects in hydrogen bond based molecular recognition of a zwitterion by substituted arylureas, *Tetrahedron*, 51, 2, 621-634.

<sup>159</sup> Bühlmann P., Nishizawa S., Xiao K. P., Umezawa Y. (1997) Strong hydrogen bond-mediated complexation of  $H_2PO_4^-$  by neutral bis-thiourea hosts, *Tetrahedron*, 53, 5, 1647-1654.

<sup>160</sup> Nishizawa S., Bühlmann P., Iwao M., Umezawa Y. (1995) Anion recognition by urea and thiourea groups : remarkably simple neutral receptors for dihydrogenphosphate, *Tet. Lett.*, 36, 36, 6483-6486.

<sup>161</sup> Sasaki S-I., Mizuno M., Naemura K., Tobe Y. (1999) Synthesis and anion-selective complexation of cyclophane-based cyclic thioureas, *J. Org. Chem.*, 65, 2, 275-283.



de la géométrie particulière adoptée par le complexe.<sup>162</sup> L'interaction peut être étudiée en spectroscopie UV,<sup>155,160,155,162</sup> RMN<sup>161,159,153,162,155,160</sup> et IR.<sup>153</sup>

Par ailleurs, les motifs phosphodiester présents dans le squelette de l'ADN sont particulièrement sensibles aux interactions par liaison hydrogène.<sup>163</sup> Des études d'interaction sur support solide ont montré que la fonction thiourée a une affinité comparable à celle des ammoniums pour l'ADN.<sup>164</sup> C'est pourquoi il a été envisagé de bâtir un nouveau vecteur d'ADN avec une tête polaire comportant des motifs thiourée, capables d'interagir avec l'ADN par des liaisons hydrogène. Ce travail a été initié au sein de l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique.<sup>165</sup> Il a débuté par la synthèse d'un lipide neutre sur le modèle d'un lipide cationique déjà développé, le RPR 122766.<sup>166</sup>

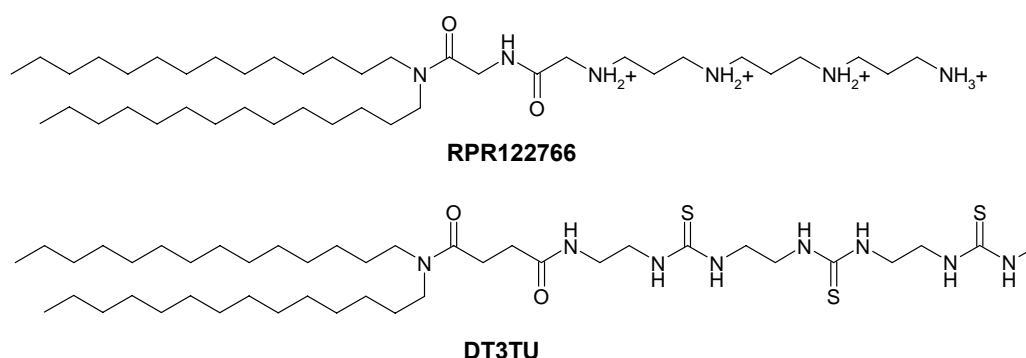


Figure 19 : Structure des RPR122766 et DT3TU

## 2. Résultats du lipide DT3TU

La synthèse et l'évaluation de ce modèle ont été réalisées au cours du travail de thèse d'I. Tranchant.<sup>167</sup> Nous allons en résumer les résultats essentiels. L'évaluation de ce composé en tant que vecteur de gènes a compris plusieurs étapes. Il a d'abord été synthétisé puis formulé sous forme de liposomes, l'ADN plasmidique y a alors été associé et l'interaction entre les deux constituants évaluée. Les propriétés biologiques de ces complexes ont pu ensuite être testées, en particulier leur capacité de transfection *in vitro* et leur comportement *in vivo*.

### a) Synthèse

Deux méthodes ont été mises au point :

<sup>162</sup> Lee D. H., Lee K. H., Hong J-I. (2001) An azophenol-based chromogenic anion sensor, *Org. Lett.*, 3, 1, 5-8.

<sup>163</sup> Jubian V., Dixon R. P., Hamilton A. D. (1992) Molecular recognition and catalysis. Acceleration of phosphodiester cleavage by simple hydrogen-bonding receptor, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1120-1121.

<sup>164</sup> Girard C., Tranchant I., Gorteau V., Potey L., Herscovici J. (2004) Development of a DNA interaction test with small molecules still grafted on solid phase, *J. Comb. Chem.*, 6, 275-278.

<sup>165</sup> Tranchant I., Mignet N., Crozat E., Leblond J., Girard C., Scherman D., Herscovici J. (2004) DNA complexing lipopolythiourea, *Bioconjugate Chem.*, 15, 1342-1348.

<sup>166</sup> Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D. (1998) Synthesis, activity and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer, *J. Med. Chem.*, 41, 224-235.

<sup>167</sup> Tranchant I. (2002) Conception et synthèse de vecteurs non cationiques pour le transfert de gènes, *Thèse de doctorat de l'université Paris VI*.

- La première stratégie, en phase homogène, permet d'obtenir le lipide DT3TU en 10 étapes avec 13% de rendement global.
- La seconde méthode met en jeu le greffage de la tête thiourée sur support solide afin de fixer l'ancre hydrophobe. Cette stratégie offre la possibilité d'introduire une certaine diversité au niveau de la chaîne et des terminaisons.

Dans les deux cas, la synthèse est délicate à cause de la faible solubilité des dérivés thiourés et de leur purification difficile.

### b) Etudes de formulation

Lors de l'évaluation physico-chimique du lipide DT3TU, son caractère fortement hydrophobe a été rapidement constaté. Il a constitué un handicap majeur dans ces études. La formation de liposomes a nécessité l'ajout d'un co-lipide neutre, la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Avec un ratio 1/2 DT3TU/DPPC, il est possible d'obtenir des particules d'environ 100 nm (Figure 20), qui ne présentent pas de structure organisée connue, d'après les études de diffraction des rayons X.

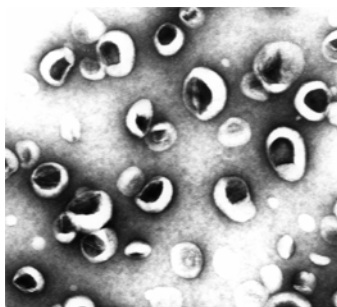


Figure 20 : Suspension de DT3TU/DPPC 1/2 observée au microscope en transmission électronique (agent de contraste : acétate d'uranyle)

### c) Etude de l'interaction avec l'ADN

L'incubation de ces liposomes DT3TU/DPPC 1/2 avec l'ADN donne naissance à des agrégats de 800 nm (Figure 21), ce qui montre que l'ADN s'est associé au liposome. Il est possible de retrouver une zone de stabilité colloïdale en excès de lipide (>15 nmol DT3TU/ $\mu$ g d'ADN).

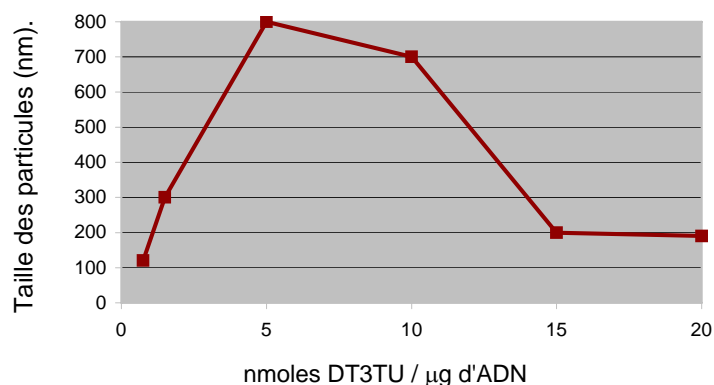


Figure 21 : Diamètre hydrodynamique des complexes DT3TU/DPPC/ADN

Cette interaction est confirmée par le test de retard électrophorétique sur gel d'agarose. Il montre que la migration de l'ADN est retardée dès 5 nmol DT3TU/ $\mu$ g d'ADN et que l'ADN est complètement retenu à 20 nmol DT3TU/ $\mu$ g d'ADN. Enfin, l'utilisation du bromure d'éthidium (BET) permet d'étudier l'accessibilité de l'ADN dans les complexes car il fluoresce lorsqu'il est intercalé entre les bases de l'ADN. La Figure 22 montre que la présence de lipide DT3TU réduit l'accessibilité de l'ADN au BET jusqu'à 90%, ce qui indique l'association intime du lipide à l'ADN.

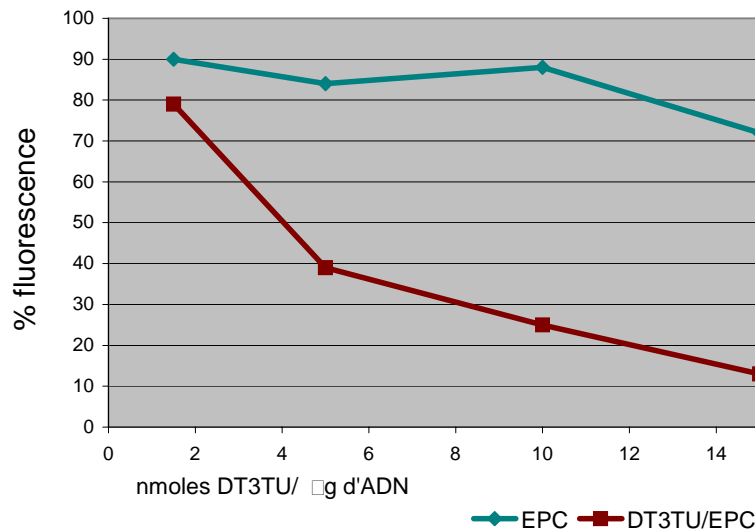


Figure 22 : Accessibilité de l'ADN dans les complexes de DT3TU/EPC/ADN.<sup>168</sup>  
L'intensité de fluorescence est exprimée en pourcentage par rapport à la fluorescence du BET en présence d'ADN libre.

Ces résultats montrent qu'il existe une interaction entre les liposomes DT3TU/DPPC et l'ADN, qui conduit à la formation de complexes de taille homogène, dans lesquels l'ADN n'est pas accessible au bromure d'éthidium. Par ailleurs, il a été montré que l'ADN de ces complexes n'est pas dégradé après 30 minutes d'incubation dans le sérum ou traitement par les DNases. Enfin, le caractère non cationique de la DT3TU a été étudié par la mesure de la charge de surface (potentiel zêta). La valeur obtenue est légèrement cationique, +20mV, et peu reproductible. Un test à la fluorescamine a permis de s'assurer de l'absence d'amines.

#### d) Evaluation biologique

Les complexes DT3TU/DPPC/ADN ont montré une activité de transfection sur des cellules HeLa *in vitro* avec le gène rapporteur de la luciférase, à partir de 5nmol DT3TU/ $\mu$ g d'ADN ; toutefois ce résultat reste peu reproductible, puisqu'aucun signal n'a été détecté avec le gène rapporteur de la *Green Fluorescent Protein*, par exemple. Des études mécanistiques ont montré que les complexes sont internalisés car ils sont observés dans le cytoplasme. Par ailleurs, aucune toxicité n'a été observée sur les cellules jusqu'à 20 nmol DT3TU/ $\mu$ g d'ADN, en présence comme en absence de sérum.

<sup>168</sup> L'EPC est la phosphatidylcholine issue de l'œuf

Le comportement de ces complexes a ensuite été évalué *in vivo* et comparé aux lipides cationiques. Injectés par voie intraveineuse sur des souris porteuses de tumeurs, leur localisation a été étudiée 30 minutes après l'injection (Figure 23).

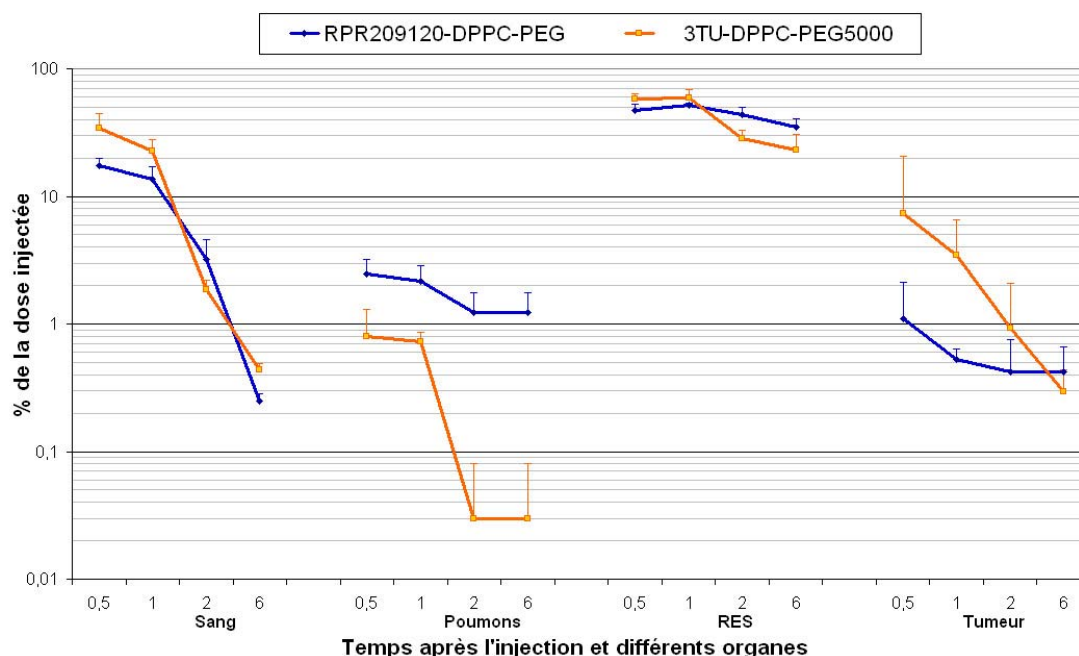


Figure 23 : Biodistribution des complexes à base de DT3TU

Par rapport au lipide cationique RPR209120, une lipopolyamine prise comme référence au laboratoire, on observe une amélioration du temps de circulation dans le sang : 34% de la dose injectée est encore présente 30 minutes après l'injection, contre 17% dans le cas du lipide cationique. Par ailleurs, l'accumulation des complexes dans les poumons est diminuée de deux tiers, ce qui pourrait traduire une diminution des interactions non spécifiques grâce au caractère non cationique des particules. Enfin, on observe une accumulation passive dans les tumeurs 7 fois supérieure au RPR209120 en 30 minutes, ce qui semble particulièrement intéressant dans une optique de ciblage des tumeurs.

### 3. Conclusion

Le lipide DT3TU est capable de s'associer à l'ADN et de former, en présence d'un co-lipide comme la DPPC, des complexes homogènes où le plasmide est protégé de l'action des enzymes telles que les DNases. Ces particules présentent l'avantage d'être deux fois moins rapidement éliminées de la circulation sanguine, après injection intraveineuse, qu'un lipide cationique tel que le RPR 209120. Ces résultats prometteurs ont donné lieu à un brevet.<sup>169</sup> Cependant, certains paramètres restent à optimiser : il serait nécessaire de diminuer l'hydrophobie des lipides afin de faciliter leur formulation et peut-être de favoriser une meilleure efficacité de transfection.

<sup>169</sup> Herscovici J., Scherman D., Tranchant I., Mignet N., Girard C., Aventis Pharma S.A. (14/05/2001) Polythiourea lipid derivatives, Patent WO02092558, WO2002FR01626, FR20010006330, US20010297482P.

## II. Objectif du travail

### A. Définition du projet

Si la thérapie génique représente une stratégie prometteuse pour le traitement des maladies génétiques ainsi que pour des maladies acquises comme le cancer,<sup>6</sup> l'efficacité clinique de cette thérapie est limitée par le transport du gène thérapeutique jusqu'aux cellules cibles.<sup>15</sup> L'objectif de cette thèse est de rechercher un système de transfert de gènes efficace, *i.e.* capable d'entraîner l'expression d'un gène après l'administration dans un organisme vivant.

Pour cela, divers types de vecteurs ont été utilisés. Ainsi les virus sont des systèmes efficaces mais non dénués de risques intrinsèques d'immunogénicité difficiles à maîtriser.<sup>18</sup> Pour cette raison, beaucoup de recherches se tournent vers des vecteurs synthétiques. Les lipides cationiques, conçus comme des virus artificiels,<sup>53</sup> présentent l'avantage d'être non immunogènes et de pouvoir transporter une plus grande quantité d'ADN.<sup>30</sup> Malgré leur efficacité *in vitro*, leur utilisation *in vivo* entraîne de nombreux problèmes du fait de leur charge cationique : ils sont rapidement éliminés de la circulation sanguine et n'ont qu'une faible efficacité de transfection.<sup>87</sup>

Il apparaît prometteur d'utiliser des systèmes neutres capables de vectoriser l'ADN. Parmi ceux-ci, les lipopolythiourées constituent une alternative aux lipides cationiques.<sup>167</sup> Ces lipides sont capables d'associer l'ADN, probablement par liaisons hydrogène entre les fonctions thiourée et les groupements phosphate de l'ADN.<sup>164</sup> Les complexes ainsi formés, injectés par voie intraveineuse dans des souris, sont moins rapidement éliminés de la circulation sanguine, et s'accumulent sept fois plus que les lipides cationiques dans les tumeurs.<sup>165</sup> C'est pourquoi nous avons porté notre choix sur ce type de système.

Cependant, les lipopolythiourées déjà développées, comme le lipide DT3TU, présentent des inconvénients : leur caractère fortement hydrophobe entraîne des difficultés de formulation et des problèmes de reproductibilité. Ainsi, une faible activité de transfection observée n'a pas pu être confirmée par des expériences postérieures.

Le but de mon travail a été de concevoir, de synthétiser et d'étudier de nouveaux modèles de lipopolythiourées amphiphiles pour le transfert de gènes. Pour cela, nous avons synthétisé une famille de vecteurs sur le modèle du lipide DT3TU. Les vecteurs doivent :

- Etre faciles à synthétiser et rapidement accessibles,
- Présenter une large diversité pour envisager des études structure/propriétés,
- Etre plus hydrophiles que le lipide DT3TU pour une meilleure formulation,
- Montrer des résultats biologiques plus reproductibles que le lipide DT3TU.

## B. Réalisation

La réalisation du projet a débuté par le choix de la structure générale des lipopolythiourées. Elle est basée sur la structure générale d'un lipide cationique (Figure 24) : une tête polaire, un espaceur et une ancre hydrophobe. Pour construire une famille, nous avons fixé certains éléments essentiels, et diversifié les autres.

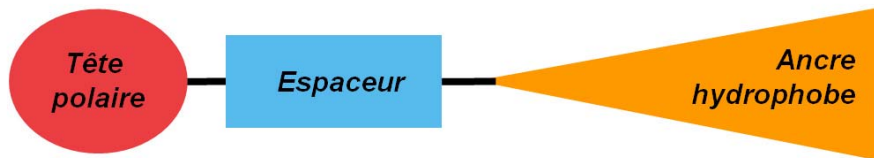


Figure 24 : Représentation schématique d'un lipide cationique

### 1. Les éléments fixes

L'élément essentiel à conserver dans toutes les structures des lipopolythiourées est la présence de motifs thiourée dans la tête polaire car ils sont responsables de l'interaction avec l'ADN. Cependant nous avons choisi de modifier légèrement la structure de la tête du lipide DT3TU :

- **La tête polaire a été choisie branchée** plutôt que linéaire, puisque cette modification permet d'améliorer le transfert de gènes dans le cas des lipopolyamines cationiques.<sup>170</sup> Une structure bi-antennée permet par ailleurs l'introduction de deux terminaisons, au lieu d'une, que l'on peut faire varier.
- **Le nombre de motifs thiourée a été réduit à deux**, conséquence de la structure bi-antennée. Dans les travaux d'I. Tranchant, l'influence du nombre de motifs thiourées n'a pas été clairement définie, puisqu'une bonne association avec l'ADN est observée avec 3 ou 4 motifs. Cependant, il a été constaté que les motifs thiourées rendent la formulation particulièrement difficile pour des raisons de solubilité. Il était donc important d'évaluer le nombre minimum de fonctions thiourée nécessaires à maintenir l'interaction avec l'ADN.

### 2. Structure de la famille de lipopolythiourées

Nous avons donc choisi de synthétiser une famille possédant une tête branchée à deux motifs thiourées. En revanche, les autres éléments ont été diversifiés, comme le montre la Figure 25.

---

<sup>170</sup> Marshall J., Nietupski J., Lee E., Siegel C., Rafter P., Rudginsky S., Chang C., Eastma, S., Harris D., Scheule R., Cheng S. (2000) Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung, *J. Drug. Target.*, 7, 453-469.

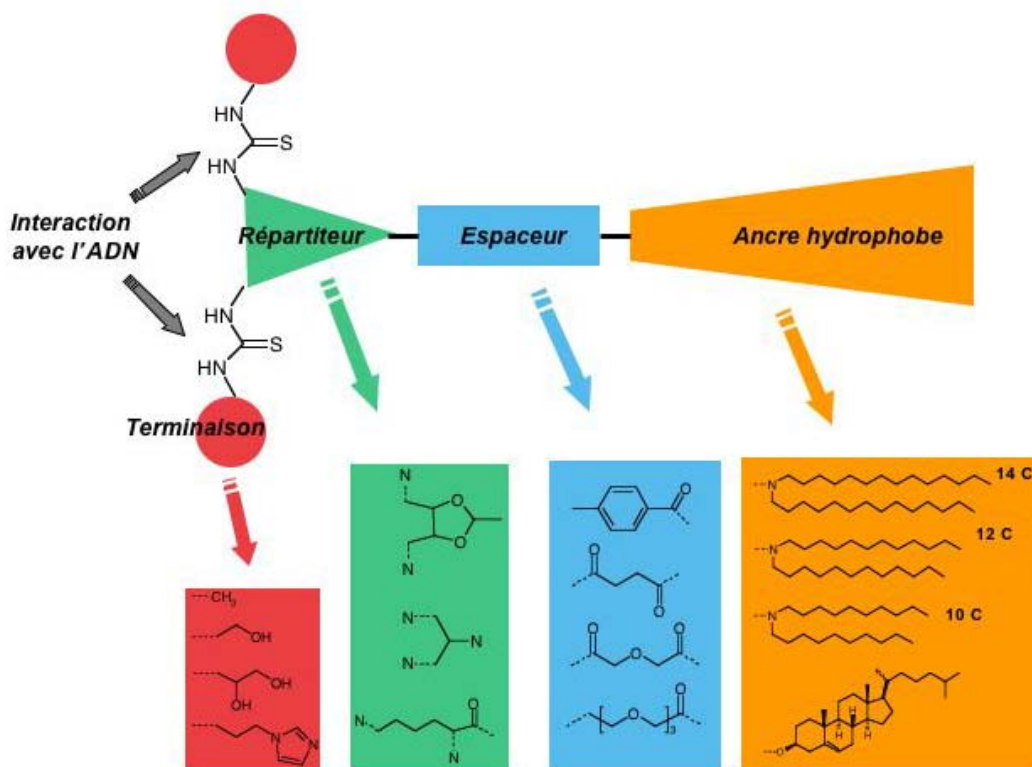


Figure 25 : Structure générale de la famille de lipopolythiourées

### 3. Les éléments variables

Le choix des éléments variables a été inspiré des études structure/propriétés de la littérature concernant les lipides cationiques.<sup>166,171</sup> Nous avons choisi de modifier les éléments suivants pour moduler l'hydrophilie des composés :

#### ➤ Le domaine hydrophobe

Les études sur la longueur de la chaîne concluent en général qu'un lipide portant une double chaîne de 14 carbones est plus efficace qu'une double chaîne de 16 ou 18 carbones. Un tel lipide a une température de transition plus basse, et une moins grande rigidité,<sup>172</sup> ce qui peut promouvoir l'échange de lipides dans les membranes et les phénomènes de fusion.<sup>173</sup> La DT3TU possède deux chaînes à 14 carbones mais présente encore une hydrophobie importante. Ceci pourrait être dû au fait que sa tête n'est pas chargée et ne présente pas une aussi grande hydrophilie que les têtes polaires des lipides cationiques. Nous avons alors envisagé de réduire à 12 ou 10 carbones la longueur des chaînes aliphatiques. De plus, le cholestérol est connu pour rigidifier les bicouches et interagir de façon particulière avec les membranes et,

<sup>171</sup> Sen J., Chaudhuri A. (2005) Gene transfer efficacies of novel cationic amphiphiles with alanine,  $\beta$ -alanine, and serine headgroups : a structure-activity investigation, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 903-912.

<sup>172</sup> Felgner J. H., Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. Y., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.*, 269, 4, 2550-2561.

<sup>173</sup> Heyes J. A., Niculescu-Duvaz D., Cooper R. G., Springer C. J. (2002) Synthesis of novel cationic lipids : effect of structural modification on the efficiency of gene transfer, *J. Med. Chem.*, 45, 99-114.

dans certains cas, améliorer la transfection.<sup>174</sup> Nous l'avons également choisi comme alternative aux chaînes aliphatiques.

### ➤ L'espaceur

S'il est difficile de conclure sur son influence directe sur la transfection, il a été montré que sa présence était nécessaire.<sup>175</sup> Nous avons fait varier sa longueur et son hydrophilie, par l'introduction d'un groupe aromatique, l'utilisation d'anhydride succinique et diglycolique et enfin de triéthylène glycol. Par ailleurs, il est nécessaire d'introduire un « répartiteur » pour obtenir une tête branchée. Nous avons choisi différentes structures : un groupe acétal cyclique, un simple sérinol plus flexible, et une lysine, qui introduit une certaine dissymétrie.

### ➤ La tête polaire

Si nous avons fixé ici sa nature non cationique, il est possible de moduler son interaction avec l'ADN par l'ajout de terminaisons variables. L'introduction de groupements hydroxyle à proximité de la tête a permis d'améliorer l'efficacité de transfection des lipides cationiques.<sup>176</sup> Ceci est probablement dû à la formation de liaisons hydrogène avec l'ADN,<sup>177</sup> car son effet diminue avec l'éloignement de la tête cationique.<sup>178</sup> Dans le cas de la DT3TU, la terminaison méthyle a été modifiée par l'introduction d'un diol, ce qui a permis une meilleure formulation des composés, tout en conservant son interaction avec l'ADN. Dans le même esprit, nous avons pu jouer sur les terminaisons en introduisant un méthyle, un alcool ou un diol à chaque extrémité. De plus, nous avons envisagé l'introduction d'une fonction imidazole qui pourrait éventuellement présenter un pouvoir tampon lors de l'acidification des endosomes et améliorer la libération des complexes après internalisation.

Le chapitre suivant décrit la synthèse de ces différents composés, suivant leur espaceur, leur tête et leur ancre hydrophobe. Le quatrième chapitre de ce mémoire présente les résultats de l'évaluation de ces composés en tant que vecteurs de gènes. Enfin, le cinquième chapitre engage une discussion sur les relations structure/propriétés des lipopolythiourées et leur utilisation pour le transfert de gènes.

---

<sup>174</sup> Fichert T., Regelin A., Massing U. (2000) Synthesis and transfection properties of novel non-toxic monocationic lipids. Variations of lipid anchor, spacer and head group structure, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 787-791.

<sup>175</sup> Remy J-S., Sirlin C., Vierling P., Behr J-P. (1994) gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules, *Bioconjugate Chem.*, 5, 647-654.

<sup>176</sup> Majeti B. K., Karmali P. P., Reddy B. S., Chaudhuri A. (2005) In vitro gene transfer efficacies of N,N-dialkylpyrrolidinium chlorides : a structure-activity investigation, *J. Med. Chem.*, 48, 11, 3784-3795.

<sup>177</sup> Narang A. S., Thoma L., Miller D. D., Mahato R. I. (2004) Cationic lipids with increased DNA binding affinity for non viral gene transfer in dividing and non dividing cells, *Bioconjugate Chem.*, 16, 1, 156-168.

<sup>178</sup> Mahidar Y. V., Rajesh M., Madhavendra S. S., Chaudhuri A. (2004) Distance of hydroxyl functionality from the quaternized center influence DNA binding and in vitro gene delivery of cationic lipids with hydroxyalkyl headgroups, *J. Med. Chem.*, 47, 23, 5712-5728.



### III. Synthèse d'une famille de lipopolythiourées

#### A. Généralités

##### 1. Stratégie

Pour la synthèse des lipopolythiourées, nous avons procédé par étapes. Dans un premier temps, nous avons synthétisé un premier modèle qui a pour but d'être rapidement évalué en physico-chimie. Nous avons ainsi pu constater que le modèle choisi, *i.e.* un lipide comportant une tête branchée à deux motifs thiourée, permettait une interaction comparable à celle du lipide DT3TU. Après cette confirmation, nous avons envisagé la synthèse de la famille. Nous avons tout d'abord modifié la longueur, l'hydrophilie et la géométrie de l'espaceur. Puis nous avons fait varier les extrémités de la tête polaire, en ajoutant soit un ou deux motifs hydroxyles, soit un groupement imidazole. Enfin, nous avons modifié l'ancre hydrophobe en diminuant la longueur de la chaîne ou en la remplaçant par un cholestérol.

##### 2. Réactions « clé »

La formation de la fonction thiourée constitue une réaction clé pour toutes les lipopolythiourées synthétisées. De nombreuses méthodes de préparation sont décrites dans la littérature. Il est possible de coupler une amine avec du thiophosgène,<sup>179,180</sup> du disulfure de carbone,<sup>181</sup> ou du thiocyanate d'ammonium,<sup>182</sup> pour former des thiourées symétriques. Par ailleurs, la réaction d'une amine avec un isothiocyanate conduit à l'obtention de thiourées dissymétriques.<sup>183,184</sup> Le mécanisme est décrit par le Schéma 1 :

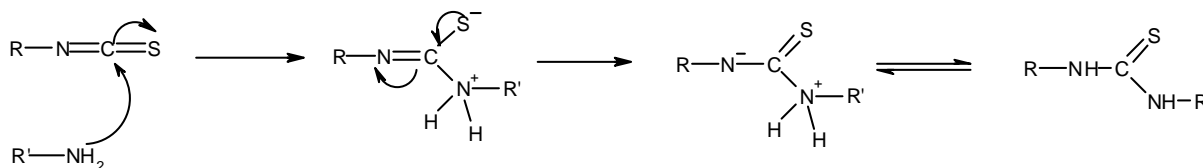


Schéma 1 : Mécanisme de formation de la thiourée

<sup>179</sup> Buchardt O., Ehrbar U., Larsen C., Moller J., Nielsen P. E., Thomsen T., Wätjen F., Hansen J. B. (1984) Designing photoaffinity labelling reagents for chromatin studies, *J. Org. Chem.*, 49, 4123-4127.

<sup>180</sup> Herges R., Dikmans A., Jana U., Köhler F., Jones P. G., Dix I., Fricke T., König B. (2002) Design of a neutral macrocyclic ionophore : synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions, *Eur. J. Org. Chem.*, 17, 3004-3014.

<sup>181</sup> Williams A., Ibrahim I. T. (1981) A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide EDC, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 7090-7095.

<sup>182</sup> Herr R. J., Kuhler J. L., Meckler H., Opalka C. J. (2000) A convenient method for the preparation of primary and symmetrical N,N'-disubstituted thioureas, *Synthesis*, 11, 1569-1574.

<sup>183</sup> Tommasino M. L., Casalta M., Breuzard J. A., Lemaire M. (2000) Asymmetric hydrogenation of enamides with catalysts containing chiral thiourea ligands, *Tetrahedron Asymmetry*, 11, 4835-4841.

<sup>184</sup> Linton B. R., Carr A. C., Orner B. P., Hamilton A. D. (2000) A versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates, *J. Org. Chem.*, 65, 1566-1568.

L'isothiocyanate peut être préparé par différentes méthodes :

➤ **Par l'utilisation du disulfure de carbone et d'un agent de couplage**

Ce peut être le chloroformate d'éthyle,<sup>185</sup> le DCC<sup>186</sup> ou le chlorure de tosylo,<sup>187</sup> en présence d'une base organique comme la DIPEA ou la triéthylamine. Le mécanisme est proche, que ce soit avec le DCC ou le chlorure de tosylo, qui agissent comme agents désulfurants (Schéma 2) :

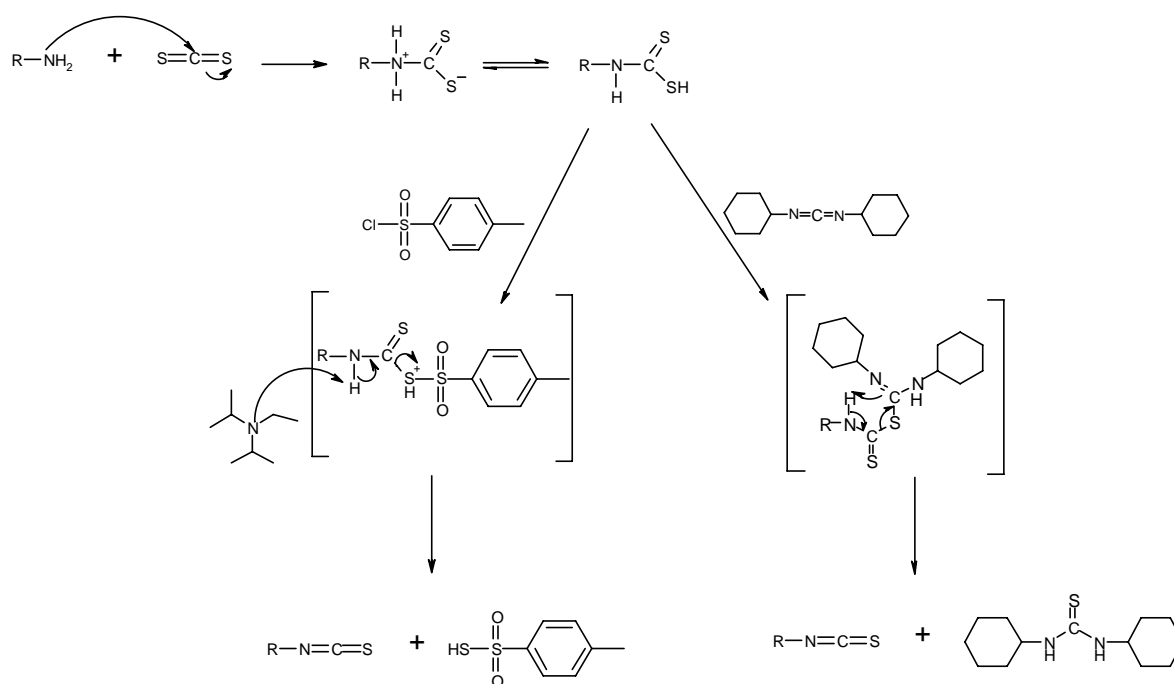


Schéma 2 : Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par CS<sub>2</sub> et DCC ou TsCl

➤ **Par l'utilisation du thionocarbonate de di-2-pyridyle<sup>188</sup>**

D'autres agents de couplage du même type peuvent être utilisés, comme le 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone,<sup>189</sup> ou le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole.<sup>190</sup> Le mécanisme suivant peut être envisagé (Schéma 3) :

<sup>185</sup> Tournaire-Arellano C., Younes-El Hage S., Valès P., Caujolle R., Sanon A., Bories C., Loiseau P. (1998) Synthesis and biological evaluation of ureido and thioureido derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and related aminoalcohols as N-acetyl-β-D-hexosaminidase inhibitors, *Carbohydrate Research*, 314, 47-63.

<sup>186</sup> Kneeland D., Ariga K., Lynch V., Huang C-Y., Anslyn E. (1993) Bis(alkylguanidinium) receptors for phosphodiester: effect of counterions, solvent mixtures, and cavity flexibility on complexation, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10042-10055.

<sup>187</sup> Stephensen H., Zaragoza F. (1997) Resin-bound isothiocyanates and their synthetic equivalents as intermediates for the solid-phase synthesis of substituted thiophenes, *J. Org. Chem.*, 62, 6096-6097.

<sup>188</sup> Park S., Hayes B. L., Marankan F., Mulhearn D. C., Wanna L., Mesecar A. D., Santarsiero B. D., Johnson M. E., Venton D. L. (2003) Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents, *J. Med. Chem.*, 46, 6, 936-953.

<sup>189</sup> Lee J., Lee J., Kang M., Shin M., Kim J-M., Kang S-U., Lim J-O., Choi H-H., Suh Y-G., Park H-G., Oh U., Kim H-D., Park Y-H., Ha H-J., Kim Y-H., Wang Y., Tran R., Pearce L., Lundberg D., Blumberg P. (2003) N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor, *J. Med. Chem.*, 46, 3116-3126.

<sup>190</sup> Le V-D., Wong C-H. (2000) Synthesis of 2-substituted polyhydroxytetrahydropyrimidines (N-hydroxy cyclic guanidino-sugars): transition-state mimics of enzymatic glycosidic cleavage, *J. Org. Chem.*, 65, 2399-2409.

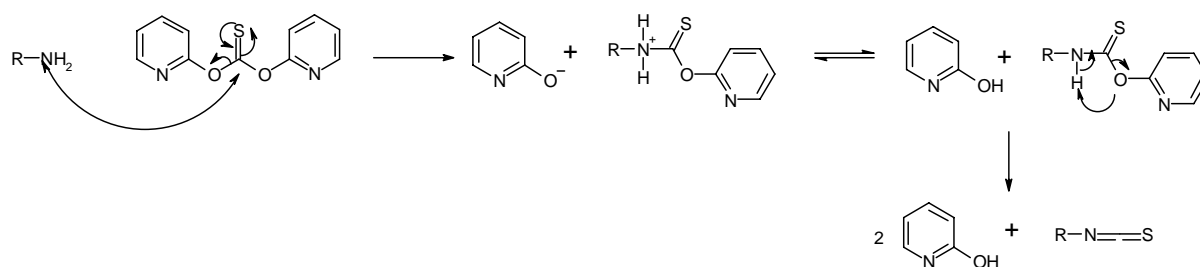


Schéma 3 : Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par le di-2-pyridylthionocarbonate

Au cours de nos synthèses, nous avons principalement utilisé le disulfure de carbone, avec le DCC ou le chlorure de tosyl, et occasionnellement le di-2-pyridylthionocarbonate.

## B. Préparation des premières lipopolythiourées

Dans un premier temps, nous avons voulu accéder rapidement à une lipopolythiourée pour valider le choix des deux motifs thiourée et de la structure branchée. Le choix de cette structure a été guidé par l'utilisation d'un acétal comme répartiteur (Figure 26). En effet, ses trois entrées permettent de coupler, d'un côté la chaîne lipidique et, des deux autres, les motifs thiourée. De plus, sa structure cyclique confère une certaine rigidité à l'ensemble.

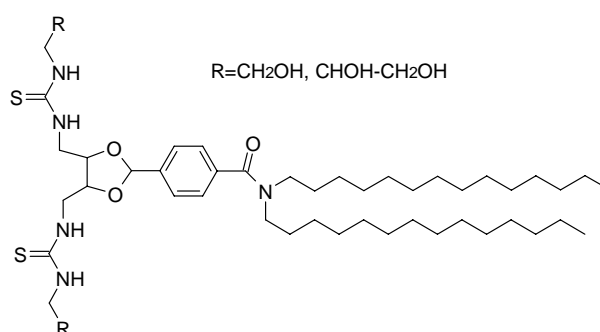


Figure 26 : Structure du premier modèle

### 1. Rétrosynthèse

La rétrosynthèse envisagée est la suivante (Schéma 4) :

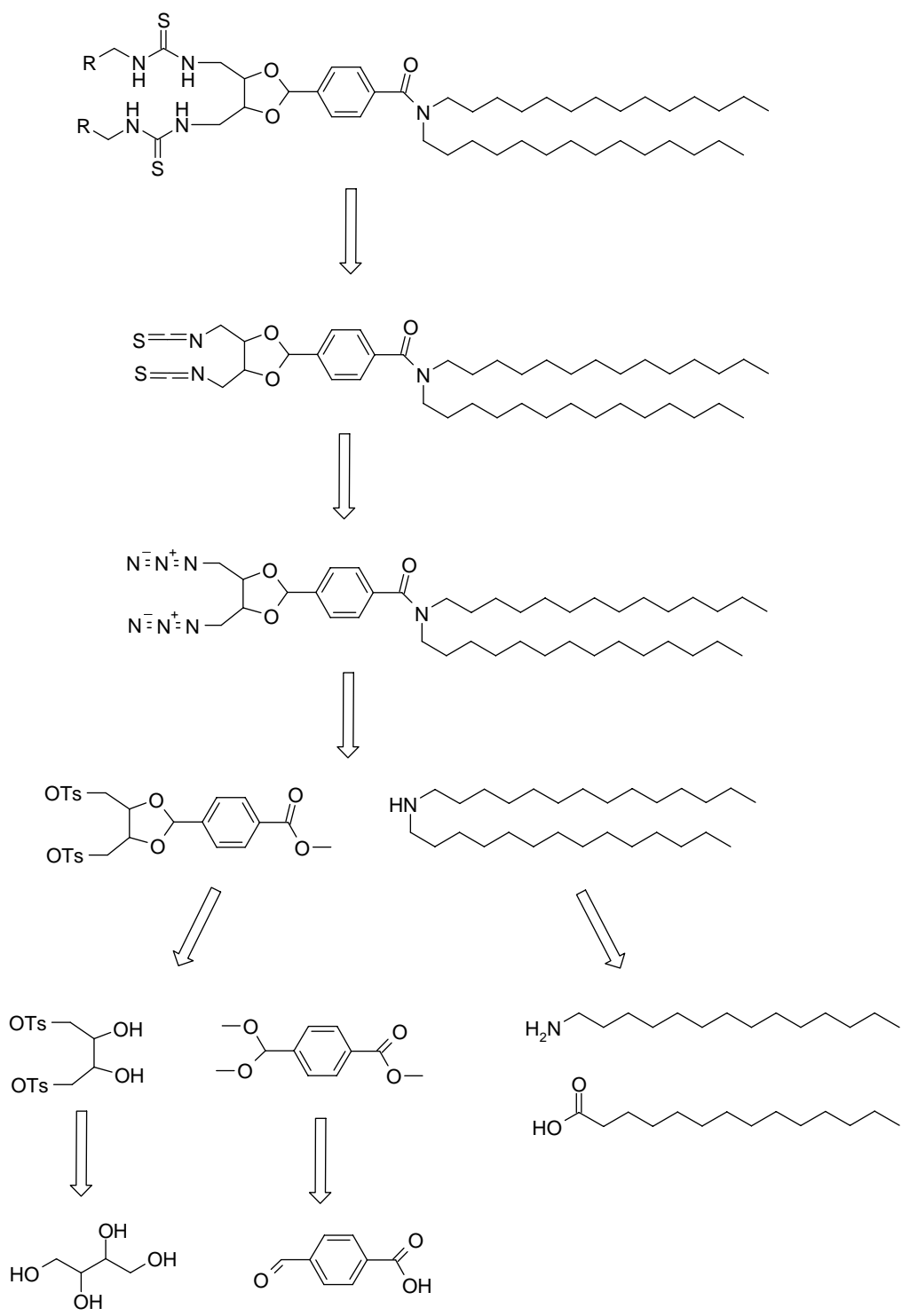


Schéma 4 : Rétrosynthèse du premier modèle de lipide thiourée

La fonction thiourée est introduite en dernier lieu par la réaction d'une amine sur le lipide isothiocyanate, provenant de l'amine. Celui-ci est obtenu par réduction de l'azide, préparé à partir du tosylate correspondant. Ce lipide tosylé résulte du couplage de la ditétradécylamine sur l'espaceur aromatique. Ce dernier peut être synthétisé à partir du carboxybenzaldéhyde et du thréitol, commerciaux. Quant à la ditétradécylamine, elle est obtenue à partir de l'acide myristique et de la tétradécylamine.

## 2. Synthèse des précurseurs

### a) Chaîne lipidique

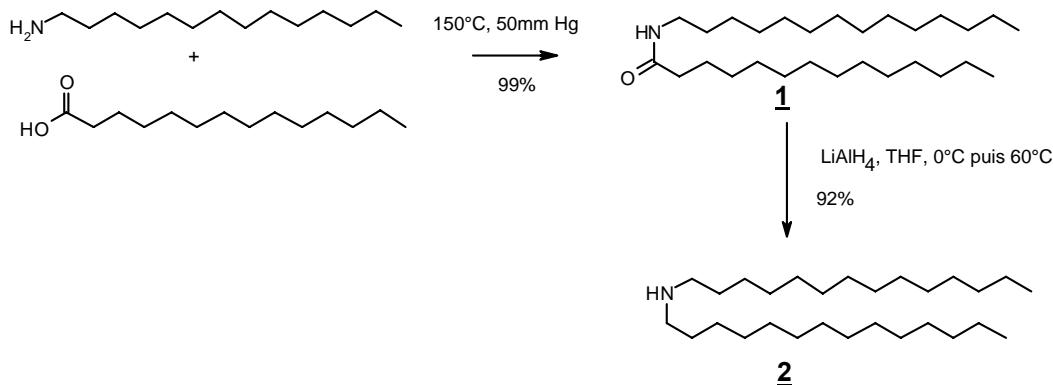


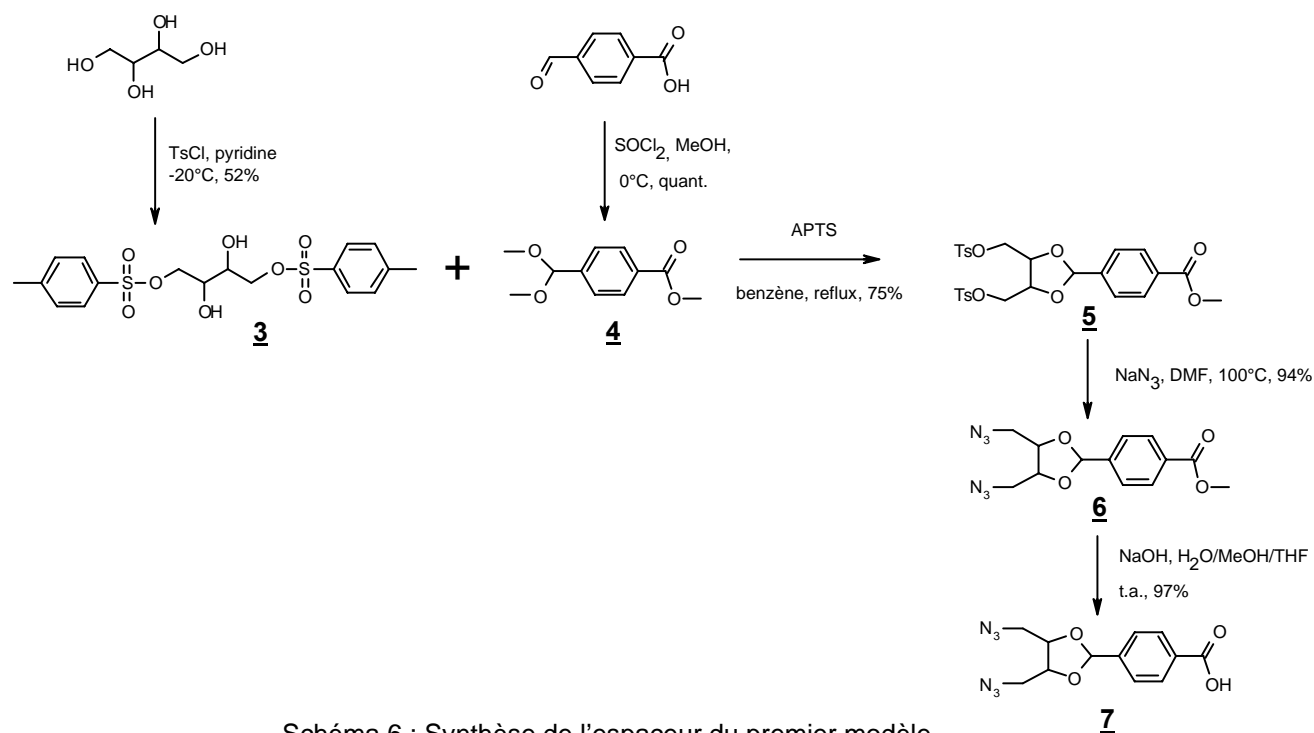
Schéma 5 : Synthèse de la ditétradécylamine

La ditétradécylamide **1** aurait pu être obtenue par couplage peptidique classique. Cependant nous avons préféré une méthode plus efficace (Schéma 5) : il s'agit d'un procédé de fusion entre l'acide myristique et la tétradécylamine, sous pression réduite à 150°C.<sup>191</sup> La réaction a été effectuée en 4 heures, elle est confirmée par le déplacement des signaux en  $\alpha$  du carbonyle et de l'azote. La réduction de cet amide **1** par LiAlH<sub>4</sub> a donné la ditétradécylamine **2** avec 92% de rendement. L'amine est identifiée en RMN <sup>1</sup>H par le triplet à 2,58 ppm.

### b) Synthèse de l'espaceur

L'espaceur **7** a été préparé en 5 étapes à partir du *D,L*-thréitol et de l'acide 4-formylbenzoïque selon le Schéma 6 :

<sup>191</sup> Roe, E. T., Scalan, J. T., Swern, D. (1949) Fatty acid amines. Preparation of amides of oleic and the dihydroxystearic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2215-2218.



La synthèse a débuté par la protection du *D,L*-thréitol à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans la pyridine,<sup>192,193</sup> ce qui a conduit au dérivé di-tosyle **3** (52%), majoritaire par rapport au composé tri-tosyle (8%). L'utilisation du chlorure de trisyle,<sup>194</sup> un chlorure de tosyle plus encombré, n'a pas donné de meilleurs résultats. Puis, nous avons préparé l'acétal **4**, qui a été obtenu en une étape par la réaction de l'acide 4-formyl-benzoïque avec le chlorure de thionyle dans le méthanol.<sup>195</sup> L'acétalisation de l'aldéhyde a été favorisée par la libération de l'acide chlorhydrique résultant de la formation de l'ester méthylique (Schéma 7). La présence du diméthylacétal est attestée en RMN  $^1\text{H}$  par la présence des singulets à 3,30 ppm et 5,47 ppm.

<sup>192</sup> Sommerdijk N. A., Hoeks T. H., Synak M., Feiters M. C., Nolte R. J., Zwanenborg B. (1997) Stereodependent fusion of vesicles : calcium binding of synthetic gemini phospholipids containing two phosphate groups, *J. Am. Chem. Soc.*, *119*, 4338-4344.

<sup>193</sup> Star A., Goldberg I., Lemcoff N. G., Fuchs B. (1999) New supramolecular hosts systems. The stereoisomeric diaminobutanediol and dioxadiazadecalin systems : synthesis, structure, stereoelectronics, and conformation – Theory vs. Experiment, *Eur. J. Org. Chem.*, 2033-2044.

<sup>194</sup> White J. D., Bolton G. L.M., Dantanarayana A. P., Fox C. M., Hiner R. N., Jackson R. W., Sakuma K., Warriar U. S. (1995) Total synthesis of the antiparasitic agent avermectin B1a, *J. Am. Chem. Soc.*, *117*, 7, 1908-1939.

<sup>195</sup> Sharma S. K., Tandon M., Lown J. W. (2000) Synthesis of geometrically constrained unsymmetrical bis(polyamides) related to the antiviral dystamycin, *Eur. J. Org. Chem.*, *11*, 2095-2103.

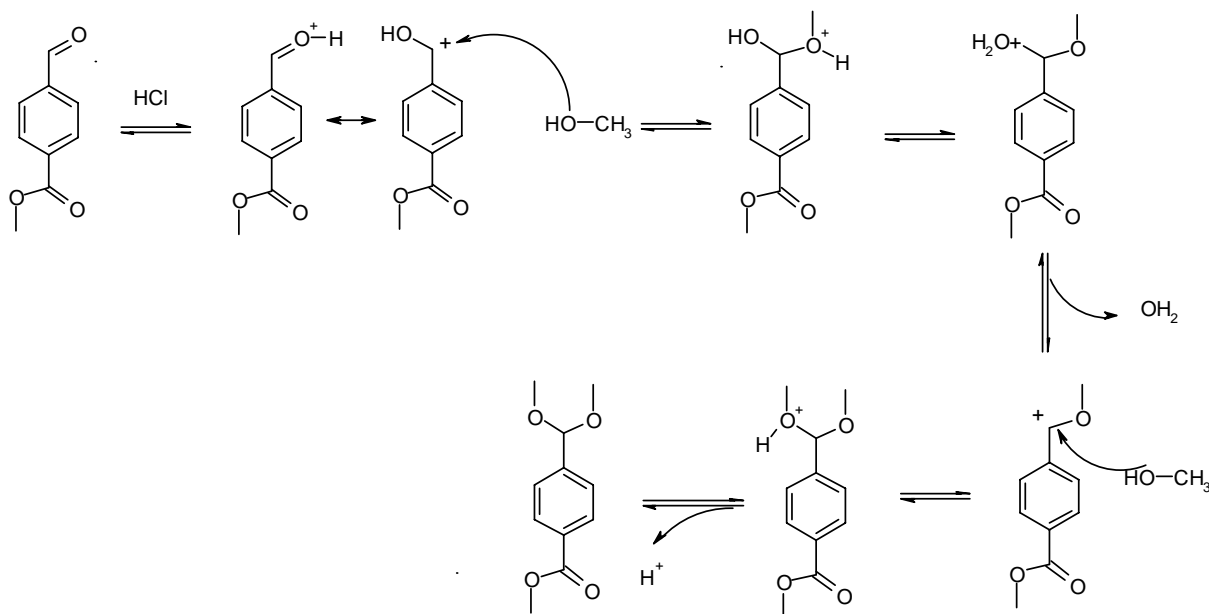


Schéma 7 : Mécanisme de d'acétalisation de l'aldéhyde

La transacétalation de **4** avec le di-tosyle **3** a été réalisée en utilisant un piège de Dean Stark pour éliminer le méthanol.<sup>196</sup> Elle a conduit à l'acétal **5** avec un rendement de 75%. Sa structure a été établie à partir des spectres RMN qui montre la disparition, en <sup>1</sup>H, des singulets à 3,30 ppm et le déplacement des carbones du cycle à 75 ppm. Le traitement de **5** par l'azoture de sodium dans la DMF à 100°C<sup>197</sup> a donné le di-azide **6**, caractérisé par un fort signal du carbone en  $\alpha$  de l'azide à 51 ppm. Finalement, l'ester méthylique a été saponifié<sup>198</sup> pour aboutir à l'acide carboxylique **7** comme la montre la disparition du singulet à 3,90 ppm sur le spectre RMN <sup>1</sup>H.

### 3. Assemblage du vecteur

Les lipopolythiourées ont ensuite été obtenues en 4 étapes à partir de la ditétradécylamine **2** et l'espaceur **7**, selon le Schéma 8.

<sup>196</sup> Harada T., Nakamura T., Kinusaga M., Oku A. (1999) Mechanism of chiral lewis acid mediated enantiotopic group-selective ring cleavage of cyclic acetals derived from meso-1,2-diols, *J. Org. Chem.*, 64, 7594-7600.

<sup>197</sup> Kim D.-K., Kim G., Gam J., Cho Y.-B., Kim H.-T., Tai J.-H., Kim K. H., Hong W.-S., Park J.-G. (1994) Synthesis and antitumor activity of a series of [2-substituted-4,5-bis(aminomethyl)-1,3-dioxolane]platinum(II) complexes, *J. Med. Chem.*, 37, 1471-1485.

<sup>198</sup> Sun M., Deng Y., Batyreva E., Sha W., Salomon R. (2002) Novel bioactive phospholipids : practical total synthesis of products from oxidation of arachidonic and linoleic esters of 2-Lysophosphatidylcholine, *J. Org. Chem.*, 67, 3575-3584.

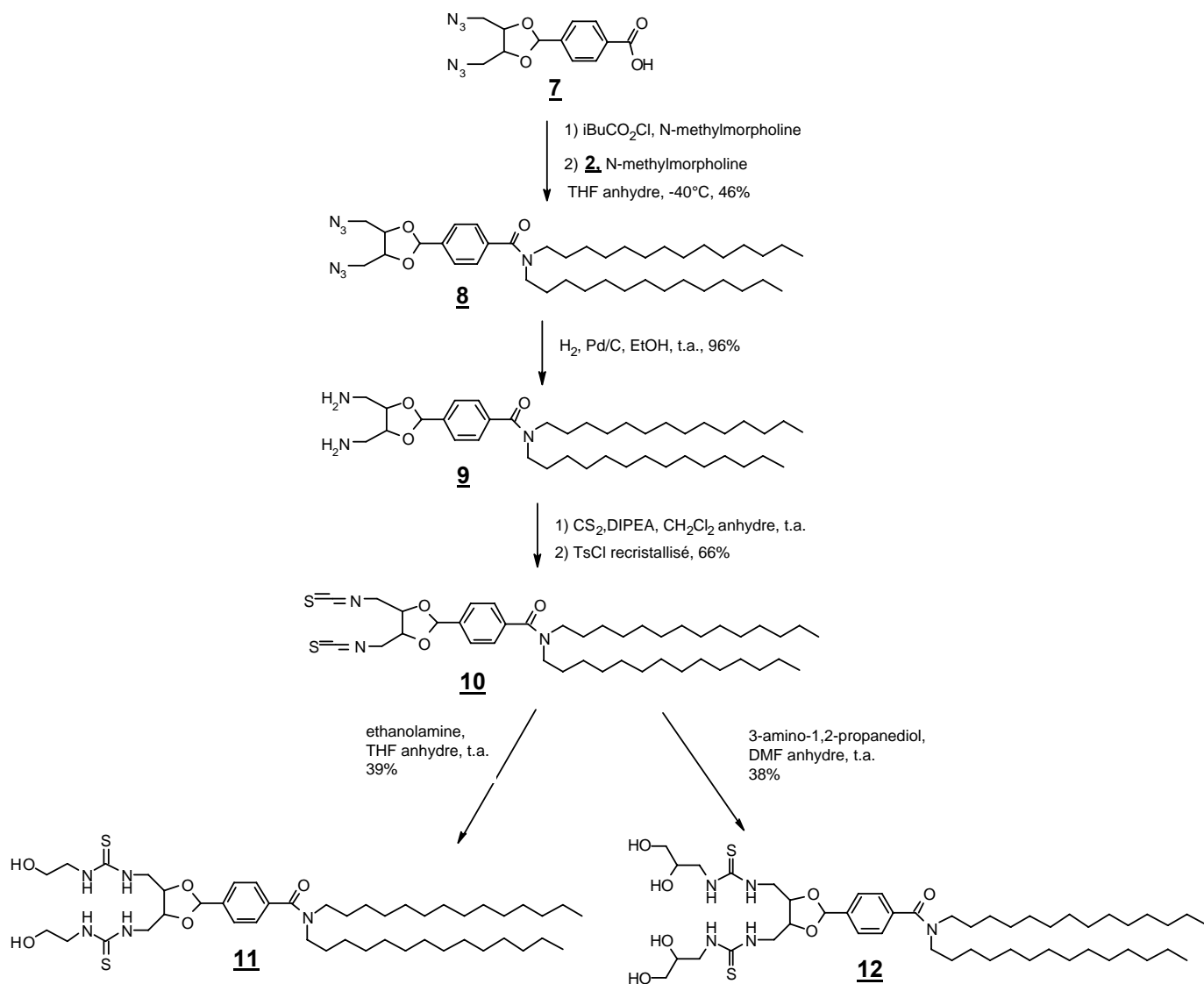


Schéma 8 : Synthèse du premier modèle

Le couplage de l'acide **7** avec la ditétradécylamine **2** a été réalisé par l'utilisation du chloroformate d'isobutyle<sup>199</sup> et a permis d'obtenir l'amide **8** avec un rendement de 46% (Schéma 9).

<sup>199</sup> Wender P. A., Jessop T. C., Pattabiraman K., Pelkey E. T., VanDeusen C. L. (2001) An efficient, Scalable synthesis of the novel Molecular transporter Octa-Arginine via a segment doubling strategy, *Org. Lett.*, 3, 21, 3229-3232.



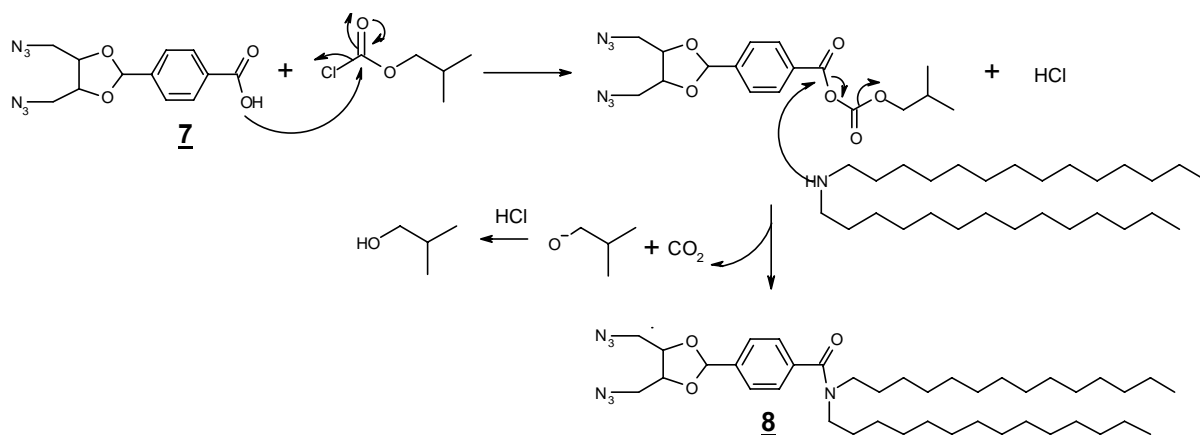


Schéma 9 : Mécanisme du couplage peptidique avec l'isobutylchloroformate

L'hydrogénation catalytique<sup>200</sup> de **8** a permis d'accéder à l'amine **9**, identifiée par le signal du carbone en  $\alpha$  de l'amine à 42 ppm. Le traitement de **9** par le disulfure de carbone en présence de chlorure de tosyle a donné l'isothiocyanate **10** avec un rendement de 66%. Ce dernier est caractérisé par le signal du carbone à 132 ppm et par la bande de vibration infrarouge  $\nu_{\text{N=C=S}}$  à  $2048 \text{ cm}^{-1}$ . Enfin la formation des thiourées **11** et **12** a été réalisée en excès d'amine avec un rendement de 38% et 39%, respectivement. La fonction thiourée est identifiée par l'apparition du signal caractéristique des thiourées à 182 ppm en  $^{13}\text{C}$  RMN.

Les deux lipopolythiourées **11** et **12** constituent le premier modèle de lipide qui comporte une tête branchée à deux motifs thiourée. Ils ont été évalués en physico-chimie (*cf.* IV.B.1, p.94). En bref, ces lipides sont capables de s'associer à l'ADN de la même façon que le lipide DT3TU, ce qui confirme qu'une tête branchée à deux motifs thiourée permet l'interaction avec l'ADN. Ceci nous a incité à continuer la synthèse des structures envisagées.

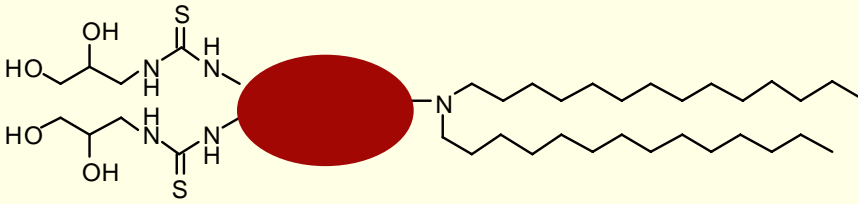
### C. Variation de l'espaceur et du répartiteur

Les résultats des études physico-chimiques sur les lipides **11** et **12** ont mis en évidence leur capacité d'interaction avec l'ADN, mais ces molécules restent encore difficiles à solubiliser et à formuler. Même si l'augmentation du nombre de motifs alcool permet d'améliorer légèrement l'hydrophilie du composé, elle n'est pas encore suffisante. Pour diminuer leur caractère hydrophobe nous avons envisagé de remplacer le cycle aromatique par :

- Un lien succinique, comme dans la structure du lipide DT3TU,
- Son homologue oxygéné, provenant de l'anhydride diglycolique,
- Un lien dérivé du triéthylène glycol, qui permet d'introduire plusieurs motifs oxygénés.

<sup>200</sup> Meunier S. J., Wu Q., Wang S-N., Roy R. (1997) Synthesis of hyperbranched glycodendrimers incorporating  $\alpha$ -thiosialosides bases on a gallic acid core, *Can. J. Chem.*, 75, 1472-1482.

Ces choix ont été justifiés par le calcul virtuel du  $\log P^{201}$ , coefficient de partition d'une molécule entre l'octanol et l'eau, qui a permis de modéliser l'influence *a priori* des différents espaceurs (Tableau 5). Plus le log P est élevé, plus l'hydrophobie est grande.



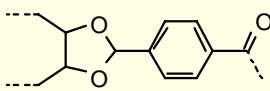
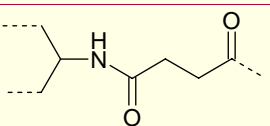
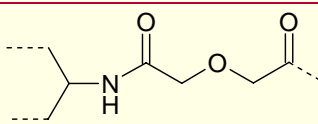
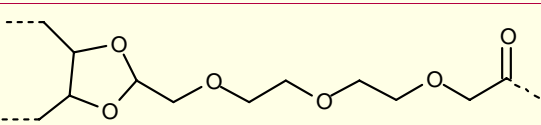
Type d'espaceur	Structure	logP
Aromatique		9,27
Succinique		6,91
Diglycolique		6,38
Triéthylène glycol		7,29

Tableau 5 : Calcul du logP de différents espaceurs

La suppression du cycle benzénique paraît très bénéfique, puisque les motifs succinique et diglycolique ou PEG permettent de gagner plus de deux unités logarithmiques. Dans tous les cas, les composés formés sont *a priori* plus hydrophiles que la DT3TU, dont le logP est de 8,21.

### 1. Espaceurs succinique et diglycolique

Les espaceurs succinique et diglycolique ne permettent pas d'avoir une structure ramifiée, il nous faut donc introduire un « répartiteur ». Pour cela, nous avons choisi une structure dérivée du triaminopropane. Nos composés cibles sont les suivants (Figure 27):

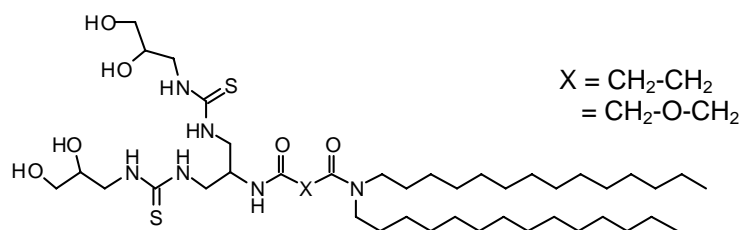


Figure 27 : Lipopolythiourées à espaceurs succinique et diglycolique

<sup>201</sup> Ce calcul a été réalisé à l'aide du logiciel MarvinSketch®.

### a) Retrosynthèse

Nous pouvons envisager la rétrosynthèse suivante (Schéma 10) :

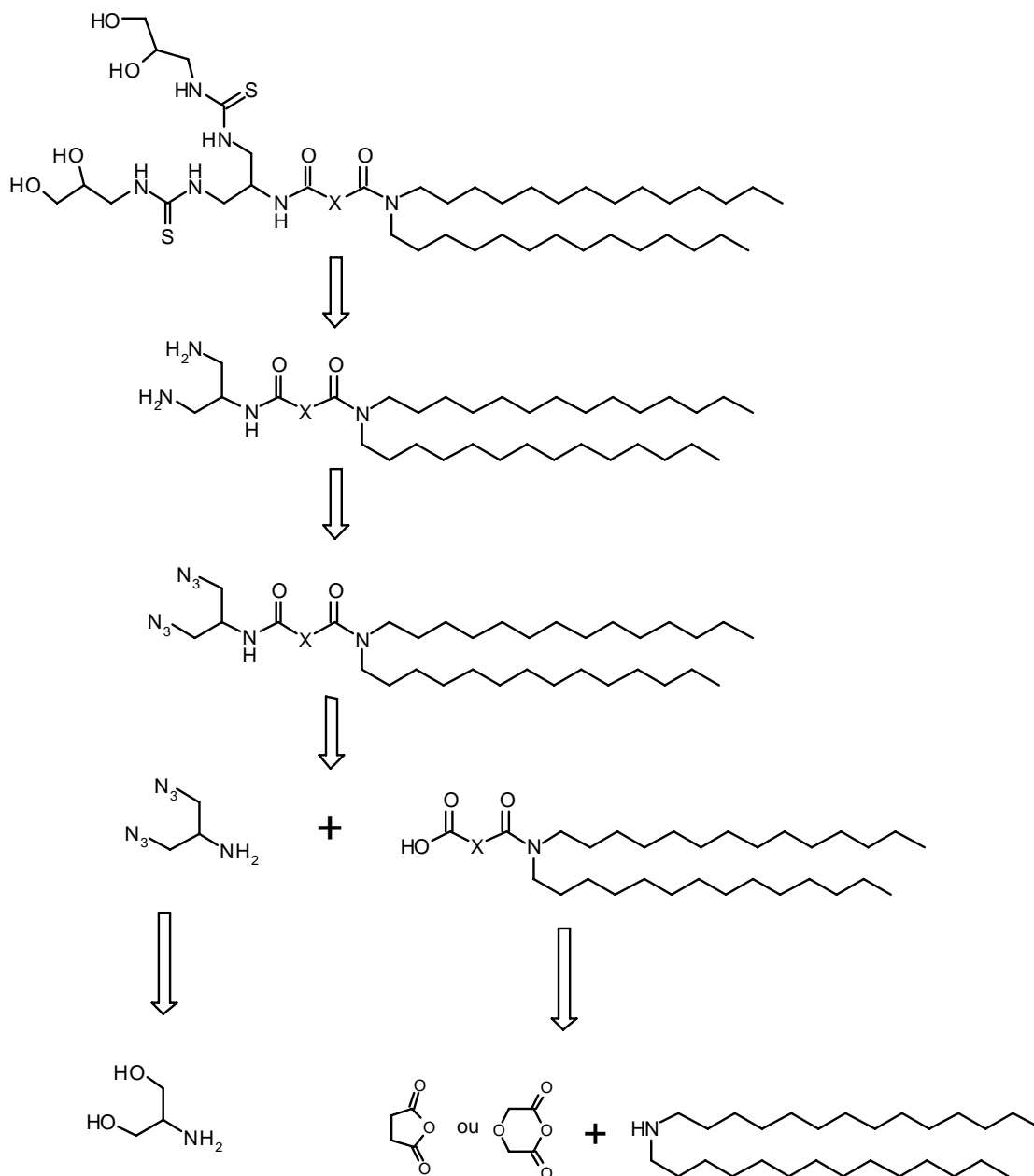


Schéma 10 : Rétrosynthèse des lipides à espaceurs succinique et diglycolique

Comme précédemment, la thiourée est introduite par les fonctions amine terminales du lipide, provenant des azides correspondants. L'intermédiaire azide résulte du couplage peptidique entre un « répartiteur », synthétisé à partir du sérinol, d'une part, et le lipide issu du couplage des anhydrides sur la ditétradécylamine, d'autre part.

## b) Synthèse

Nous avons d'abord synthétisé le répartiteur **17** en 4 étapes à partir du sérinol.<sup>202</sup>

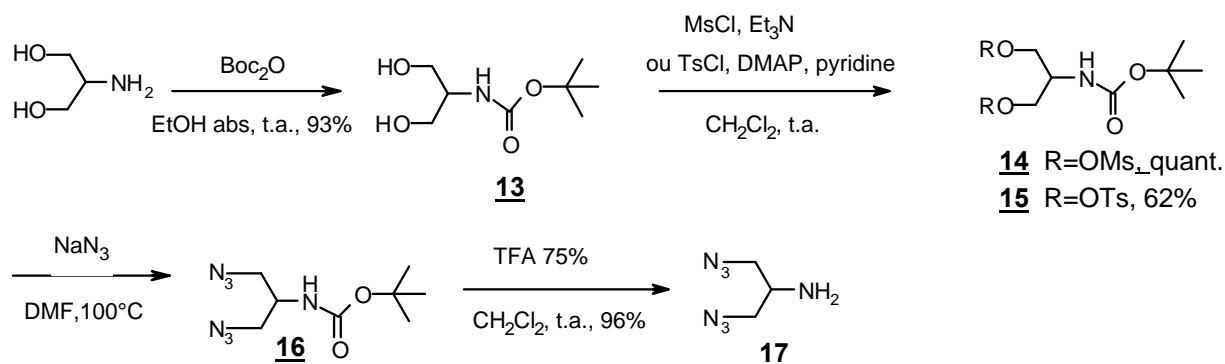


Schéma 11 : Synthèse du répartiteur à partir du sérinol

La préparation du composé **17** a débuté par la protection de l'amine du sérinol par le groupe *tert*-butoxycarbonyl (Boc). Après recristallisation dans l'heptane, le diol **13** isolé avec 93% de rendement et identifié par les protons du *tert*-butyle à 1,45 ppm. Le traitement de **13** par le chlorure de mésyle dans la pyridine a conduit au composé **14** de façon quantitative, alors que la réaction du chlorure de tosylo n'a donné le composé **15** qu'avec 62% de rendement. L'examen du spectre RMN confirme la réaction des deux fonctions alcool. La substitution nucléophile de **14** ou **15** par l'azoture de sodium a été réalisée dans la DMF à 100°C et a permis d'obtenir le diazide **16** quantitativement. Ce dernier est caractérisé par le signal du carbone en  $\alpha$  de l'azide à 51 ppm. Enfin, l'hydrolyse du carbamate est effectuée par l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, elle est attestée par la disparition du signal des protons du Boc à 1,45 ppm. Le répartiteur **17** est finalement obtenu avec un rendement global de 89%.

Nous avons préparé les ancrs hydrophobes à partir de la ditétradécylamine **2** (Schéma 12). Le couplage avec les anhydrides succinique ou diglycolique est réalisé à température ambiante dans le dichlorométhane, conditions plus douces que dans la littérature.<sup>203,204</sup> Les acides **18** et **19** sont caractérisés par le dédoublement des signaux des protons en  $\alpha$  de l'azote et l'apparition des signaux des protons en  $\alpha$  des carbonyles.

<sup>202</sup> Benoist E., Loussouarn A., Remaud P., Chatal J-F., Geston J-F. (1998) Convenient and simplified approaches to N-monoprotected triaminopropane derivatives : key intermediates for bifunctional chelating agent synthesis, *Synthesis*, 1113-1118.

<sup>203</sup> Sainlos M. Belmont P., Vigneron J-P., Lehn P., Lehn J-M. (2003) Aminoglycoside derived cationic lipids for gene transfection : Synthesis of kanamycin A derivatives, *Eur. J. Org. Chem.* 15, 2764-2774.

<sup>204</sup> Schlesinger P. H., Ferdani R., Liu J., Pajewska J., Pajewski R., Saito M., Shabany H., Gokel G. W. (2002) SCMTR : A chloride selective, membrane-anchored peptide channel that exhibits voltage gating, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 9, 1848-1849.

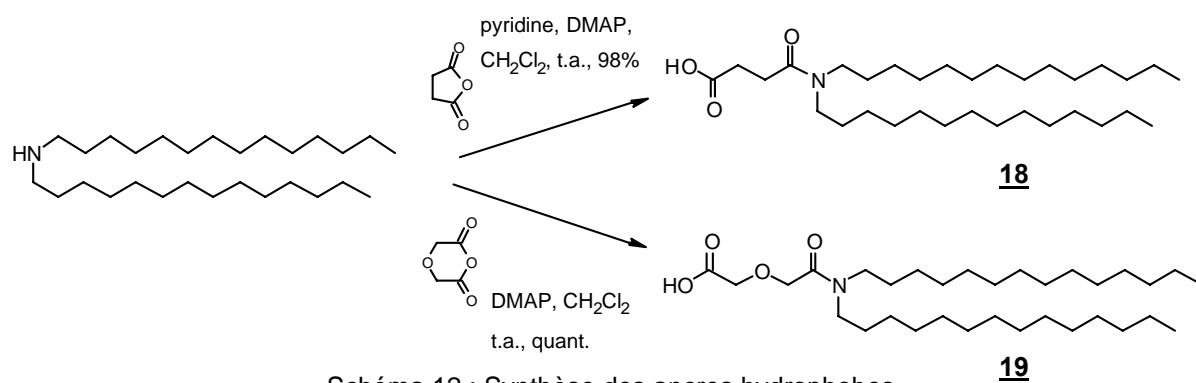


Schéma 12 : Synthèse des ancres hydrophobes

Plusieurs conditions ont été testées pour le couplage peptidique du répartiteur **17** avec les parties lipidiques **18** et **19**.

- Le chloroformate d'isobutyle,<sup>199</sup> qui a conduit au composé **20** avec 60% de rendement,
- Le chlorure de thionyle et la résine A-21,<sup>205</sup> qui a donné **20** avec 61% de rendement,
- Le DCC, qui a permis d'obtenir **20** et **21** avec des rendements de 93% et 98%, respectivement.<sup>206</sup>

L'examen des spectres RMN confirme la réaction par le déplacement à 4,15 ppm du proton en  $\alpha$  de l'azote du répartiteur. L'hydrogénation catalytique des di-azides **20** et **21** en présence de palladium sur charbon a permis d'obtenir les di-amines **22** et **23** quasi-quantitativement (Schéma 13).

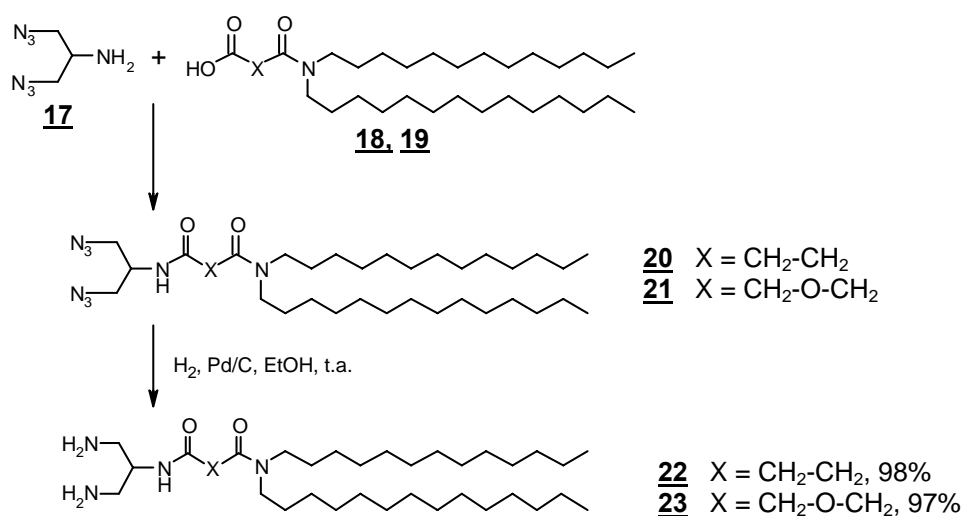


Schéma 13 : Couplage peptidique et réduction

Les dernières étapes diffèrent suivant l'espaceur :

<sup>205</sup> Girard C., Tranchant I., Nioré P-A., Herscovici J. (2000) A convenient method for the synthesis and one-pot reaction of acyl chlorides using a scavenging resin, *Synlett*, 11, 1577-1580.

<sup>206</sup> Mikolajczyk M., Kielbasinski P. (1981) Recent developments in the carbodiimide chemistry, *Tetrahedron*, 37, 233-284.

### ➤ Pour les composés dérivés de l'anhydride succinique

L'isothiocyanate **24** a été obtenu de façon similaire à la première synthèse, par réaction du disulfure de carbone en présence de chlorure de tosyloxy (Schéma 14).

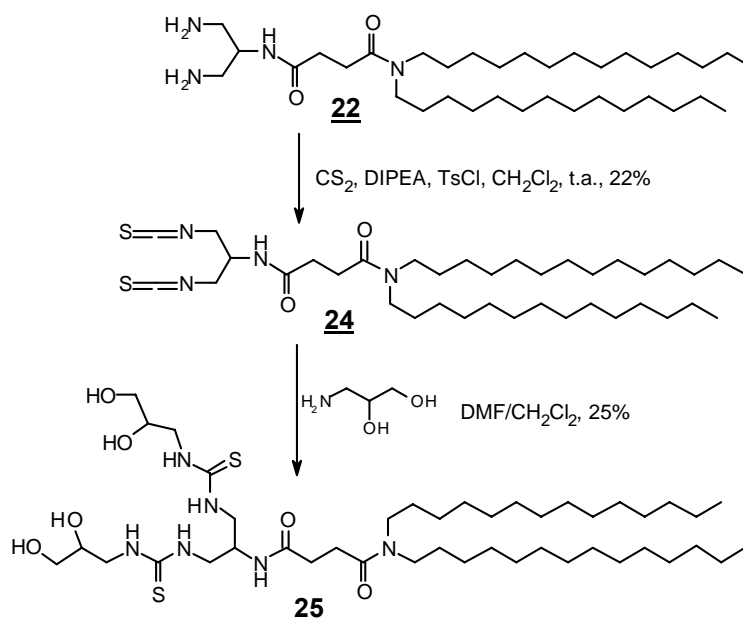


Schéma 14 : Formation de la thiourée avec l'espaceur succinique

Le faible rendement obtenu pourrait s'expliquer par une réaction intramoléculaire qui mènerait à une thiourée cyclique (Schéma 15). Cette réaction est décrite dans la littérature en présence de  $\text{CS}_2$  et d'EDC analogue du DCC.<sup>207</sup> Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence ce produit secondaire. Finalement, la lipopolythiourée **25** est obtenue par réaction de l'isothiocyanate **24** sur le 1-amino-2,3-propanediol. Elle est identifiée par l'apparition des signaux des protons thiourée à 7 ppm et le déplacement des signaux des protons en  $\alpha$  de la fonction thiourée.

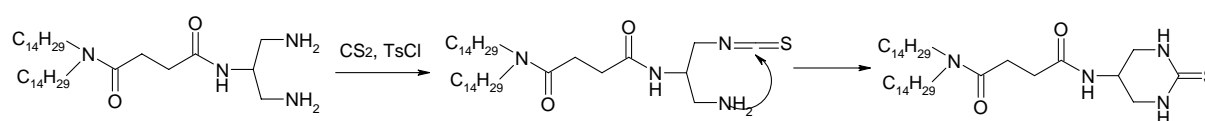


Schéma 15 : Formation d'une thiourée cyclique

### ➤ Pour les dérivés de l'anhydride diglycolique

Compte tenu des faibles rendements obtenus pour la lipopolythiourée **25**, nous avons adopté une autre stratégie pour la formation de la thiourée **28** (Schéma 16).

<sup>207</sup> Marmillon C., Bompart J., Calas M., Escale R., Bonnet P-A. (2000) Solution parallel synthesis of cyclic guanidines, *Heterocycles*, 53, 6, 1317-1328.

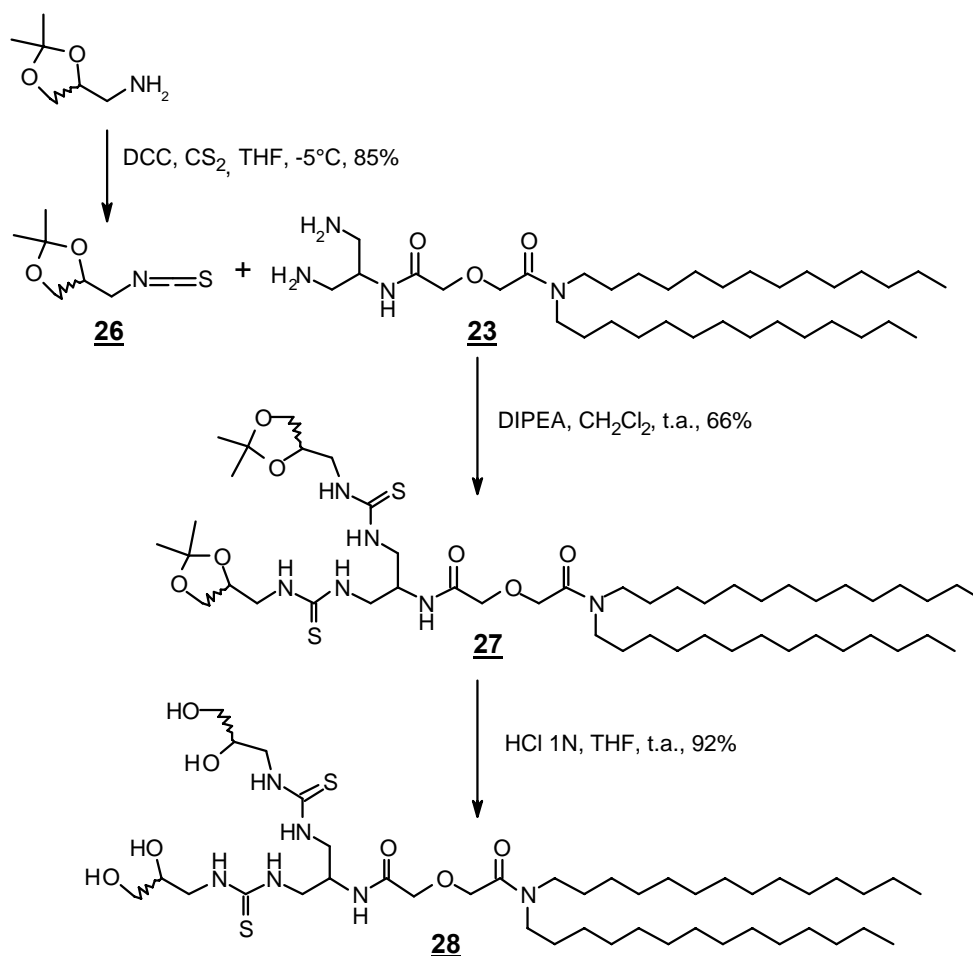


Schéma 16 : Synthèse de la lipopolythiourée à espaceur diglycolique

L'isothiocyanate **26** a été préparé par traitement du 2,2-diméthyl-1,2-dioxolan-4-méthanamine racémique, commercial, par le disulfure de carbone en présence de DCC (85%). Sa formation est attestée par le signal caractéristique en RMN du carbone à 132 ppm. Le couplage sur la diamine **23** est ensuite réalisé en présence de DIPEA et la di-thiourée **27** est obtenue avec un rendement de 66%. Elle est identifiée par l'apparition du signal du carbonyle à 183 ppm et des signaux en RMN  $^1\text{H}$  à 1,32 et 1,42 ppm correspondant aux méthyles de l'isopropylidène. La déprotection des diols s'est révélée difficile. Plusieurs essais ont échoué : l'utilisation de l'acide trifluoroacétique, de l'acide acétique à reflux<sup>208</sup> et de la résine DOWEX-50WX8(H+)<sup>209</sup> ont dégradé le produit. L'hydrolyse a finalement pu être réalisée en présence d'acide chlorhydrique 1N dans le THF et la cinétique a été suivie par LC-MS. La réaction est complète en 3 heures et la lipopolythiourée **28** a été isolée avec un rendement de 51% après lyophilisation du milieu réactionnel. Le lipide **25** ayant été obtenu avec un rendement global de 4%. Cette stratégie alternative de formation de la thiourée est donc préférable.

<sup>208</sup> Lewbart M. L., Schneider J. J. (1969) Preparation and properties of steroidal 17,20- and 20,21-acetonides epimeric at C-20. I. Derivatives of 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol, *J. Org. Chem.*, 34, 3505-3512.

<sup>209</sup> Martin S. F., Zinke P. W. (1991) The furan approach to oxygenated natural products. Total synthesis of (+)-KDO, *J. Org. Chem.*, 56, 6600-6606.





## b) Synthèse

Dans un premier temps, nous avons préparé l'espaceur PEG **33** à partir du triéthylène glycol (Schéma 18).

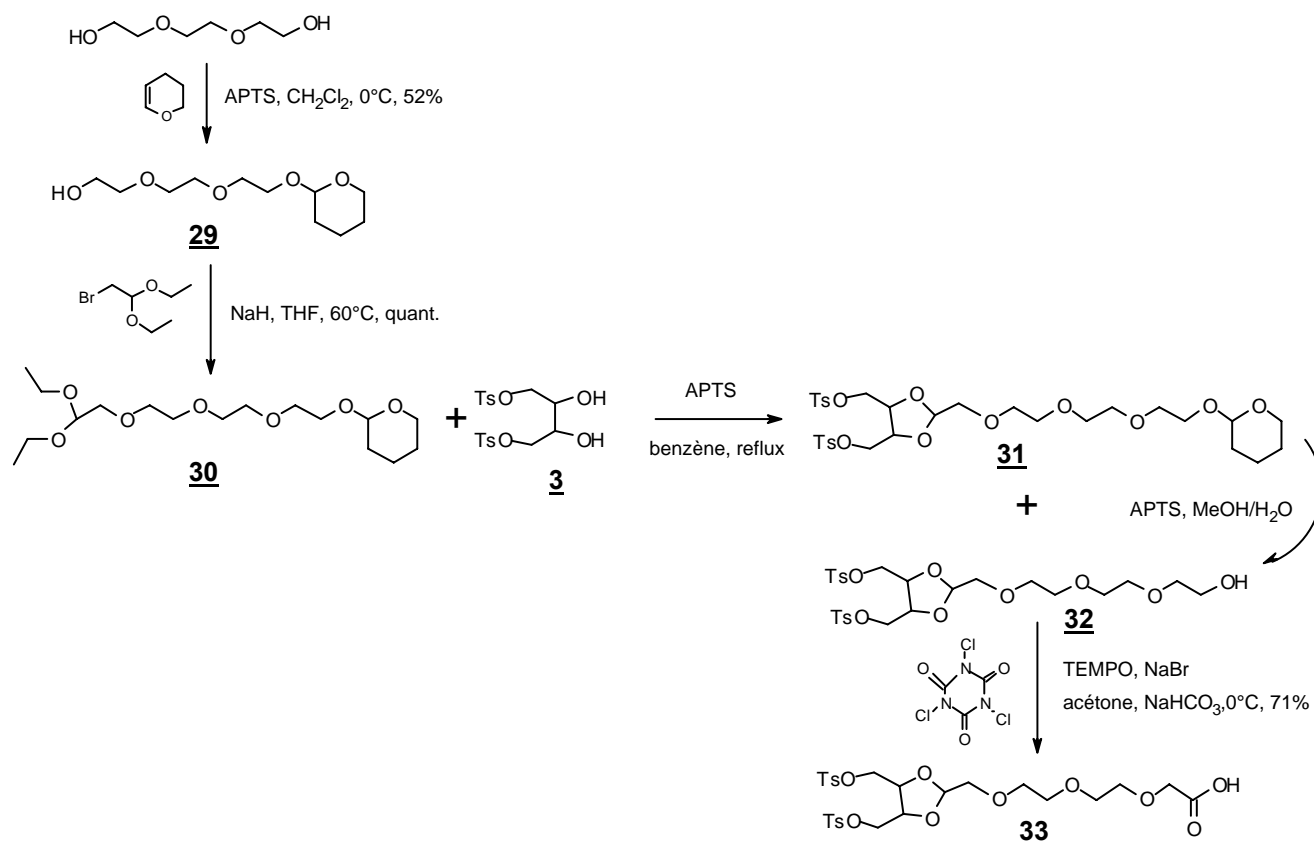


Schéma 18 : Synthèse de l'espaceur à partir du triéthylène glycol

La monoprotection du triéthylène glycol a pu être réalisée par le tétrahydropyrane en milieu acide à 0°C,<sup>210</sup> pour donner le composé **29**. L'analyse RMN montre la présence du cycle par les signaux en <sup>13</sup>C entre 20 et 62 ppm et l'intégration assure la substitution d'un seul groupement alcool. La réaction de **29**, déprotoné par l'hydrure d'aluminium, avec le diéthylacétal de bromoacétaldéhyde<sup>211</sup> conduit, quantitativement, à l'acétal **30** qui est repéré en RMN <sup>13</sup>C par les signaux des groupements méthyle à 15 ppm et du carbone tertiaire de l'acétal à 101 ppm. Le composé **30** peut subir une transacétalation par le diol **3** qui aboutit à un mélange de l'acétal **31** encore protégé par le THP (34%) et de l'acétal **32** comportant un alcool libre (23%). L'hydrolyse par l'APTS dans un mélange eau/méthanol permet de terminer la déprotection et d'obtenir finalement l'alcool **32** avec 52% de rendement sur les deux étapes. Cet alcool est ensuite oxydé pour former l'acide **33**. Nous avons choisi la méthode d'oxydation radicalaire catalysée par le TEMPO, déjà mise au point pour l'oxydation

<sup>210</sup> Loiseau F., Hii K., Hill A. (2004) Multigram synthesis of well-defined extended bifunctional polyethylene glycol (PEG) chains, *J. Org. Chem.*, 69, 639-647.

<sup>211</sup> Keane J. F., Cuomo J., Lex L., Seyedrezaei S. E. (1983) Azoethoxyl nitroxide spin-labeled crown ethers and cryptands with the N-O group positioned near the cavity, *J. Org. Chem.*, 48, 2647-2654.

de PEG,<sup>212</sup> de telles conditions permettant de préserver le cycle acétal. La présence d'un co-oxydant est nécessaire : ce peut être le BAIB,<sup>213</sup> I<sub>2</sub><sup>214</sup> ou l'acide trichloroisocyanurique.<sup>215</sup> Nous avons choisi ce dernier car il est facile à éliminer par un simple lavage basique. Il a été proposé le mécanisme suivant<sup>216</sup> (Schéma 19) :

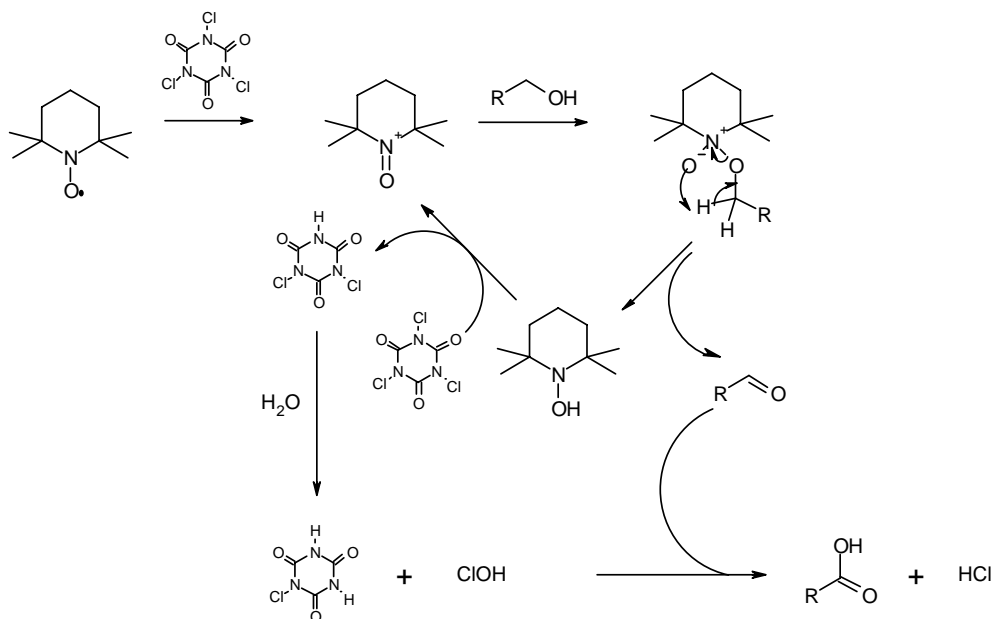


Schéma 19 : Mécanisme d'oxydation par le système TEMPO/acide trichloroisocyanurique

Dans un second temps, nous avons couplé l'espaceur **33** sur la ditétradécylamine **2** et nous avons obtenu la lipopolythiourée en 5 étapes (Schéma 20).

<sup>212</sup> Masson C. (2001) Transfert de gènes ciblé vers les tumeurs : conception, synthèse et propriétés de nouveaux vecteurs chimiques de l'ADN pour le ciblage des cellules cancéreuses, *Thèse de doctorat, Université Paris VI*, 204 p.

<sup>213</sup> De Mico A., Margarita R., Parlanti L., Vescovi A., Piancatelli G. (1997) A versatile and highly selective hypervalent iodine (III)/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy-mediated oxidation of alcohols to carbonyl compounds, *J. Org. Chem.*, **62**, 6974-6977.

<sup>214</sup> Miller R. A., Hoerrner R. S. (2002) Iodine as a chemoselective reoxidant of TEMPO : application to the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones, *Org. Lett.*, **5**, 3, 285-287.

<sup>215</sup> De Luca L., Giacomelli G., Masala S., Porcheddu A. (2001) A very mild and chemoselective oxidation of alcohols to carbonyl compound. *Org. Lett.*, **3**, 19, 3041-3043.

<sup>216</sup> De Luca L., Giacomelli G., Masala S., Porcheddu A. (2003) Trichloroisocyanuric/TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions : a close investigation, *J. Org. Chem.*, **68**, 4999-5001.

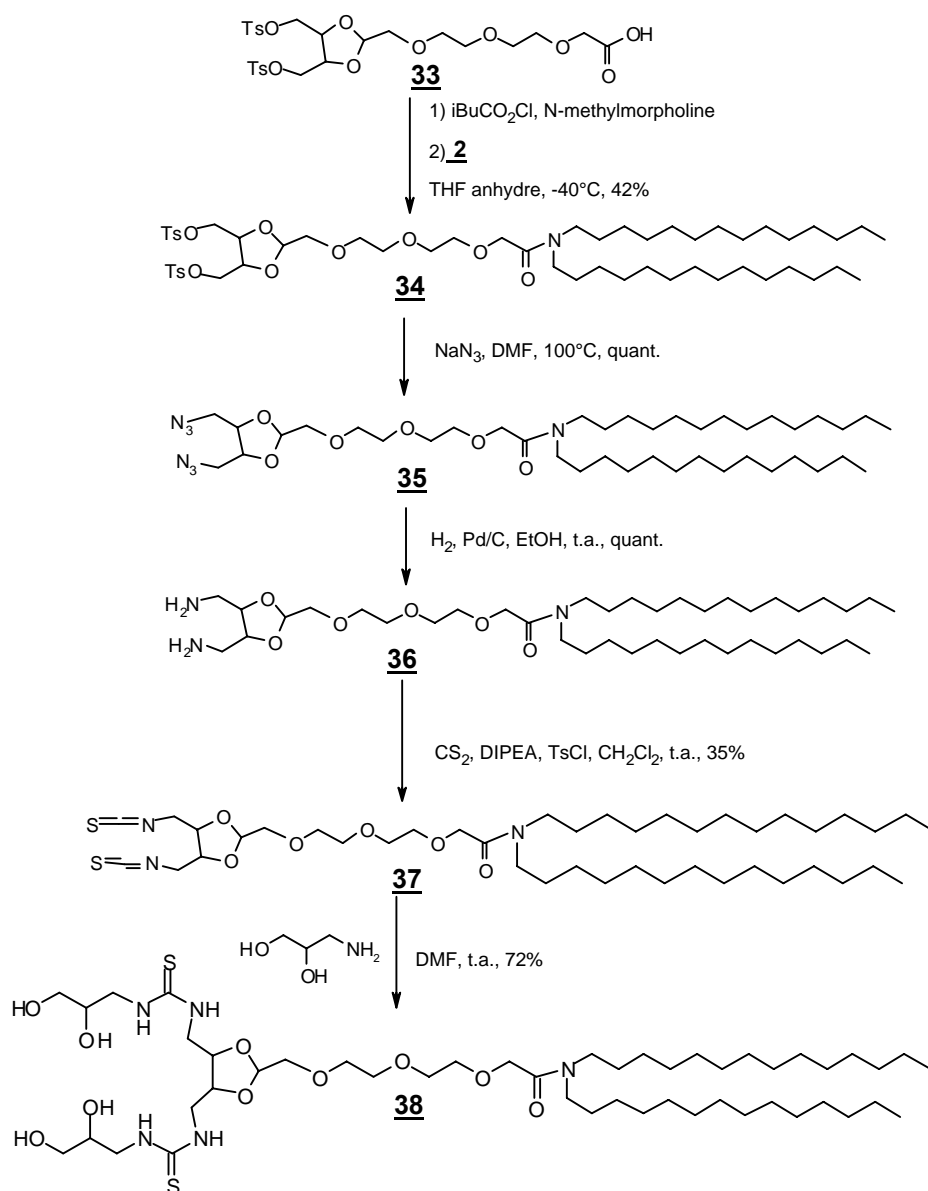


Schéma 20 : Synthèse de la lipopolythiourée à espaceur PEG

La réaction de couplage peptidique a été réalisée à l'aide du chloroformate d'isobutyle, la formation de l'amide **34** est confirmée par le déplacement à 3,26 ppm des signaux des protons en  $\alpha$  de l'azote. De façon similaire aux synthèses précédentes, la substitution par l'azote de sodium mène au di-azide **35**, qui est ensuite réduit par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon.<sup>217</sup> Les réactions sont suivies par le déblindage progressif des signaux en  $\alpha$  du tosylate : à 4,09 ppm pour le composé **34** puis à 3,45 ppm pour le di-azide **35** et, enfin, à 2,80 ppm pour la di-amine **36**. Les rendements sont quantitatifs. Finalement la thiourée **38** a été préparée en deux étapes à partir de la diamine. Nous avons choisi de former l'isothiocyanate sur le lipide **36** car la déprotection de l'isopropylidène, dans la méthode alternative proposée pour **28**, aboutirait à l'hydrolyse du répartiteur acétal. L'isothiocyanate **37** a donc été préparé par réaction du disulfure de carbone sur **36** en présence de chlorure de

<sup>217</sup> Puigjaner C., Vidal-Ferran A., Moyano A., Pericas M. A., Riera A. (1999) A new family of modular chiral ligands for the catalytic enantioselective reduction of prochiral ketones, *J. Org. Chem.*, 64, 7902-7911.

tosyle, puis a été engagé dans la réaction avec le 1-amino-2,3-propanediol. La thiourée **38** est identifiée par le signal du carbonyle à 183 ppm, ainsi que par l'analyse LC-MS qui montre deux pics à 967 et 989 correspondant à  $(M+H)^+$  et  $(M+Na)^+$  respectivement.

La lipopolythiourée **38** a finalement été obtenue avec un rendement global de 2% en 10 étapes. Si ce composé se révèle intéressant lors de l'évaluation biologique, il sera nécessaire de trouver une autre voie de synthèse plus rapide et plus efficace, par exemple en partant de PEG dissymétriques commerciaux.

### 3. Répartiteur dissymétrique

Afin d'avoir plus d'informations sur l'influence de la géométrie de ce répartiteur, nous avons envisagé la synthèse d'une lipopolythiourée possédant un répartiteur de type lysine. Cet acide aminé présente l'avantage d'avoir 3 points d'ancrage :

- un acide, pour greffer la chaîne lipidique comme la ditétradécylamine,
- deux amines, dissymétriques, pour former les motifs thiourée

La synthèse de cette lipopolythiourée s'est faite en 4 étapes à partir de la lysine et de la ditétradécylamine **2** (Schéma 21).

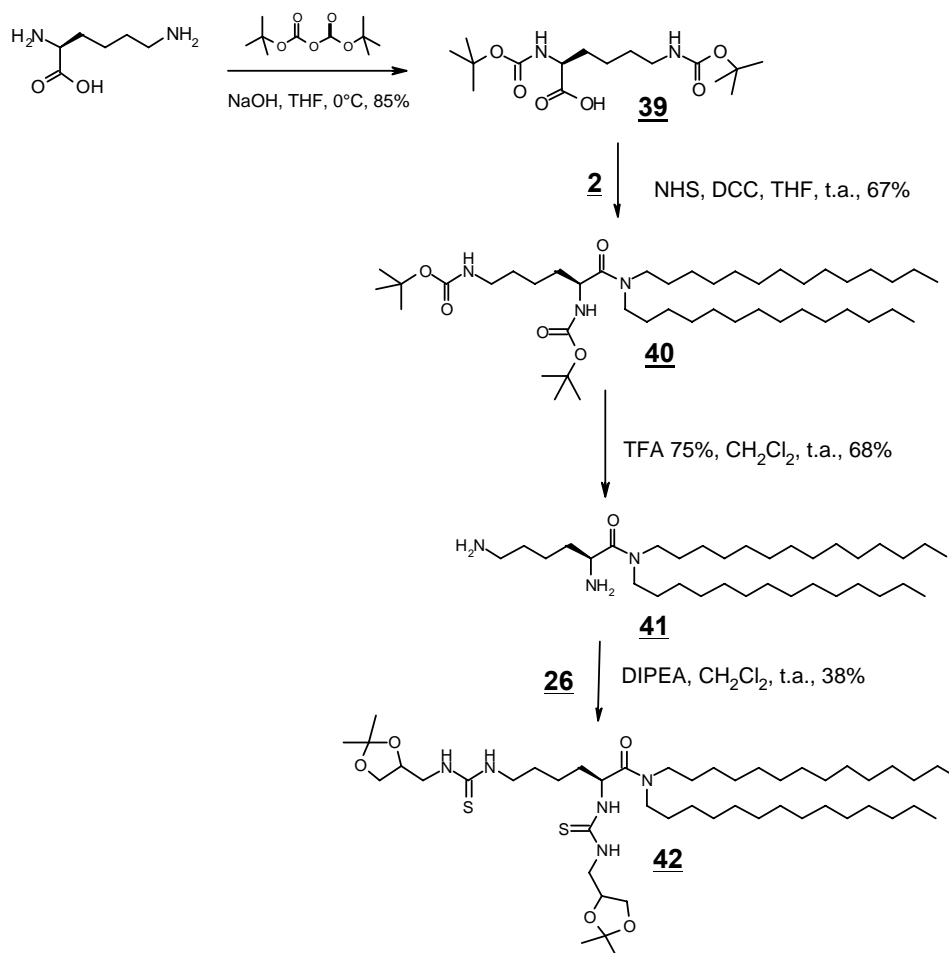


Schéma 21 : Synthèse de la thiourée à répartiteur dissymétrique

Nous avons commencé la synthèse par la protection de la *L*-lysine par l'anhydride de *tert*-butoxyle.<sup>218</sup> L'acide **39** est caractérisé par le singulet correspondant aux protons des méthyles à 1,38 ppm. Le couplage de **39** avec la ditétradécylamine **2** est effectué à l'aide du DCC en présence de *N*-hydroxysuccinimide, selon le mécanisme présenté dans le Schéma 22. Il conduit avec 67% de rendement à l'amide **40**, identifiée par le déplacement du signal des protons en  $\alpha$  de l'azote.

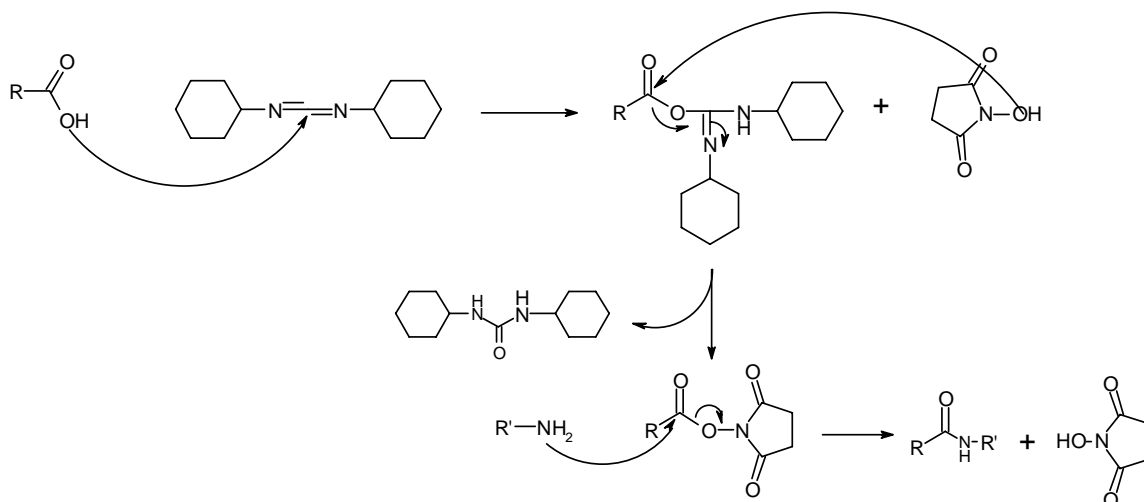


Schéma 22 : Mécanisme du couplage peptidique par NHS et DCC

Le traitement de **40** par le TFA donne l'amine **41** caractérisée par la disparition du signal du *tert*-butyle à 1,38 ppm. La réaction de la di-amine **41** avec l'isothiocyanate **26**, pour conduire à la di-thiourée **42**. Cette dernière est identifiée en RMN par le signal du carbonyle à 183 ppm et en LC-MS par le pic de masse 907 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>. Pour finir nous avons procédé à l'hydrolyse de l'acétal. La réaction a été menée dans HCl 1N/THF mais nous n'avons pas pu isoler la lipopolythiourée déprotégée. En effet, le suivi cinétique par LC-MS a montré que la réaction ne conduisait pas au produit attendu (Figure 29).

<sup>218</sup> Kim H. S., Moon J., Kim K. S., Choi M. M., Lee J. E., Heo Y., Cho D. H., Jang D. O., Park Y. S. (2004) Gene-transferring efficiencies of novel diamino cationic lipids with varies hydrocarbon chains, *Bioconjugate Chem.*, 15, 5, 1095-1101.

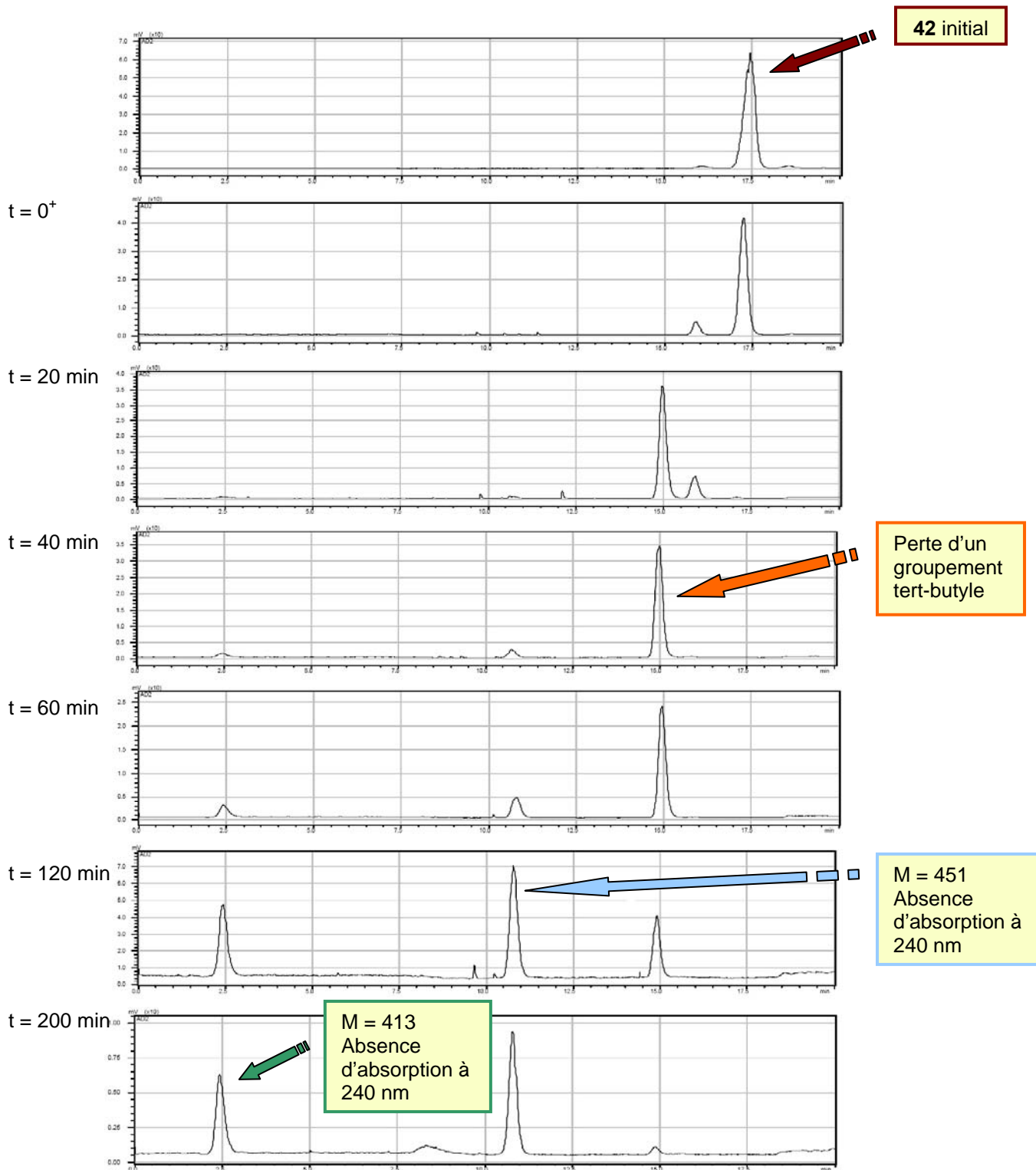


Figure 29 : Suivi cinétique par LC-MS de l'hydrolyse de l'isopropylidène de **42**

Le composé **42** subit d'abord l'hydrolyse de l'un de ses groupements *tert*-butyle. Il est totalement converti en 40 minutes. Cependant, la suite de la réaction donne deux produits distincts qui ne possèdent pas l'absorption maximale à 245 nm caractéristique du groupement thiourée. Le produit a probablement été dégradé à cause du milieu acide. Pourtant, il a été rapporté dans la littérature que l'hydrolyse par HCl 1N est possible en présence de la fonction

thiourée<sup>219</sup>. Nous avons essayé d'arrêter la réaction à 40 minutes par congélation puis lyophilisation du milieu, mais l'analyse du lyophilisât montre que le lipide s'est tout de même dégradé et que la thiourée n'est plus qu'à l'état de traces. Le spectre RMN du résidu montre la prédominance des chaînes aliphatiques. Nous avons émis l'hypothèse qu'en milieu acide la thiourée se réarrangeait pour former un cycle à 5 chaînons. Ce réarrangement provoquerait l'élimination de la chaîne lipidique. Le cycle serait à son tour dégradé en milieu acide. Des dérivés cycliques de ce type ont été décrits dans la littérature ;<sup>220</sup> toutefois, nous ne l'avons pas mis en évidence.

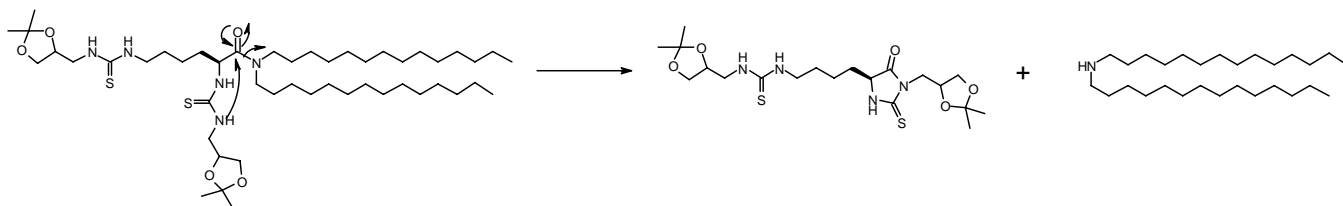


Schéma 23 : Hypothèse de dégradation en milieu acide

Finalement, nous avons renoncé à l'hydrolyse de l'isopropylidène et conservé le composé **42** pour l'évaluation biologique, puisqu'il possède les deux fonctions thiourée requises pour l'interaction avec l'ADN.

## D. Variation des terminaisons

Le choix d'une tête branchée à deux motifs thiourée permet l'introduction de terminaisons aux deux extrémités. Il est possible de les diversifier en utilisant des isothiocyanates variés lors de la réaction sur le lipide di-amine. Dans un premier temps, nous allons rappeler les différents types de terminaisons (alcool, diol) que nous avons obtenus par les synthèses déjà présentées. Ensuite, nous décrivons les nouvelles terminaisons envisagées.

### 1. Terminaison alcool

Nous avons synthétisé un seul composé possédant une terminaison alcool, il s'agit de **11**, qui possède la structure du premier modèle (Figure 30).

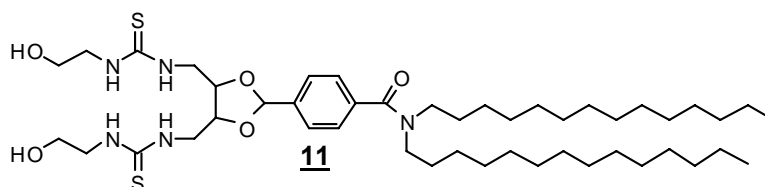


Figure 30 : Structure du lipide thiourée à terminaison alcool

<sup>219</sup> Herges R., Dikmans A., Umasish J., Köhler F., Jones P. G., Dix I., Fricke T., König B. (2002) Design a of new macrocyclic ionophore : synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions, *Eur. J. Org. Chem.*, 3004-3014.

<sup>220</sup> Mac Kay A. F., Tarlton E. J., Petri S. I., Steyermark P. R., Mosley M. A. (1958) Amino Acids. V. 1,3-di-( $\omega$ -carboxyalkyl)-thioureas and their chemistry, *Can. J. Chem.*, 80, 1510-1517.

Les résultats de l'évaluation physico-chimique (cf. IV.B.1, p.94) ont montré que la lipopolythiourée **11** est plus difficilement formulable que son analogue à terminaison diol. C'est pourquoi nous avons poursuivi la synthèse avec ce type de terminaison.

## 2. Terminaison diol

La majorité des lipopolythiourées présentées possèdent une terminaison diol. Leur structure est rappelée sur la Figure 31.

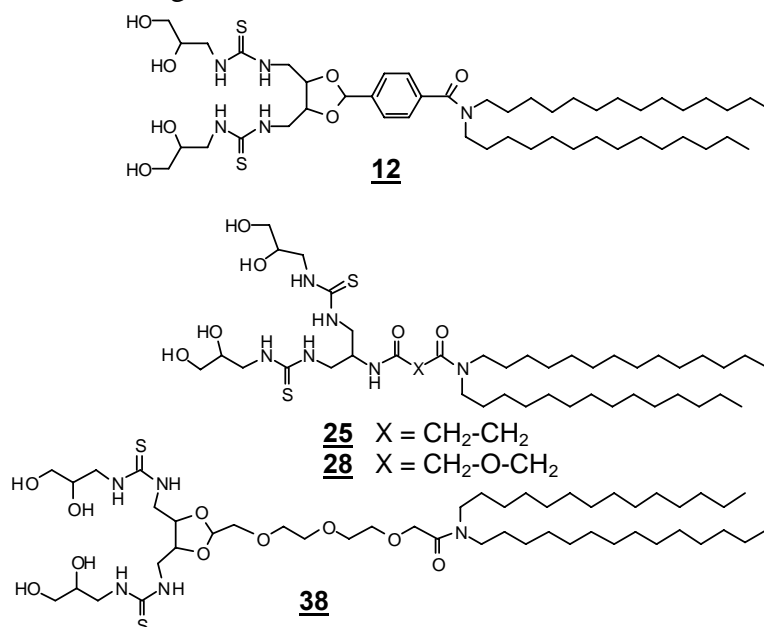


Figure 31 : Structure des lipopolythiourées à terminaison diol

La présence de diols pourrait influencer les propriétés physico-chimiques des lipopolythiourées, en améliorant leur hydrophilie et en augmentant le nombre de liaisons hydrogènes que la tête polaire pourrait former avec l'ADN. Pour vérifier ces hypothèses, il est nécessaire de disposer de lipopolythiourées ne possédant pas ces propriétés. C'est pourquoi nous avons également introduit des terminaisons de type méthyle.

## 3. Terminaison méthyle

Pour préparer une lipopolythiourée méthylée, nous sommes partis de la di-amine **22**, qui a été traitée par l'isothiocyanate de méthyle (rendement 63%). Cette terminaison a été introduite sur un modèle déjà synthétisé, le lipide di-amine **22**. Elle est obtenue en une étape, par l'utilisation du méthyle isothiocyanate avec un rendement de 63%. La lipopolythiourée **43** est identifiée par l'examen du spectre RMN, (signal du carbonyle à 183 ppm) et l'analyse LC-MS, qui confirme la masse de **43** (728, (M+H)<sup>+</sup> et 774 (M+HCOO)<sup>-</sup>) et sa pureté (97%).

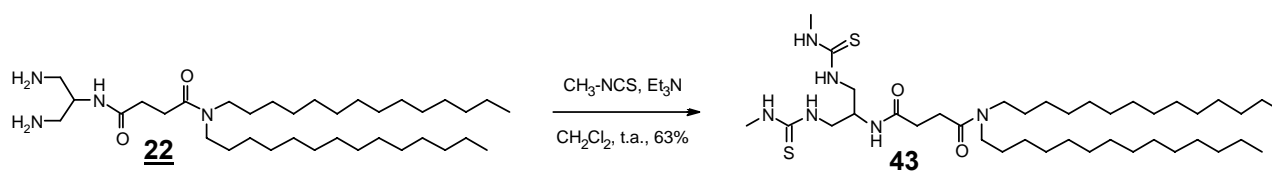


Schéma 24 : Synthèse de la thiourée à espaceur succinique et terminaison méthyle



L'introduction systématique des terminaisons méthyle sur toutes les lipopolythiourées n'a pas été réalisée, parce que nous avons supposé que le diol était plus intéressant, puisqu'il permet *a priori* d'augmenter l'hydrophilie et d'améliorer l'interaction avec l'ADN.

#### 4. Terminaison imidazole

Enfin, nous avons envisagé de diversifier encore la structure par l'introduction de motifs imidazole sur les extrémités de la tête polaire. En effet, ce groupement n'est que partiellement protoné à pH physiologique ( $pK_a = 7,01$ ), et possède donc un pouvoir tampon. Si l'on suppose que les complexes sont endocytés, ils doivent sortir de l'endosome avant que l'acidification du milieu n'active des enzymes de dégradation (*cf.* I.B.3., p.30). Ces groupements pourraient alors jouer le rôle d'« éponge à proton »<sup>99</sup> et améliorer la transfection. De tels résultats ont été rapportés avec les polymères poly-L-lysine substitués par des groupements proches, les histidines<sup>84</sup>.

Dans un premier temps nous avons préparé le 1-(3-isothiocyanato-propyl)-1H-imidazole **44** (Schéma 25). L'isothiocyanate **44** a été obtenu par la réaction de la 3-imidazol-1-yl-propylamine avec le disulfure de carbone en présence de DCC ou par le di-2-pyridylthionocarbonate, avec des rendements comparables. L'isothiocyanate **44** est identifié par les signaux caractéristiques en RMN <sup>13</sup>C à 137 ppm et en IR à 2110 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{N=C=S}$ ).

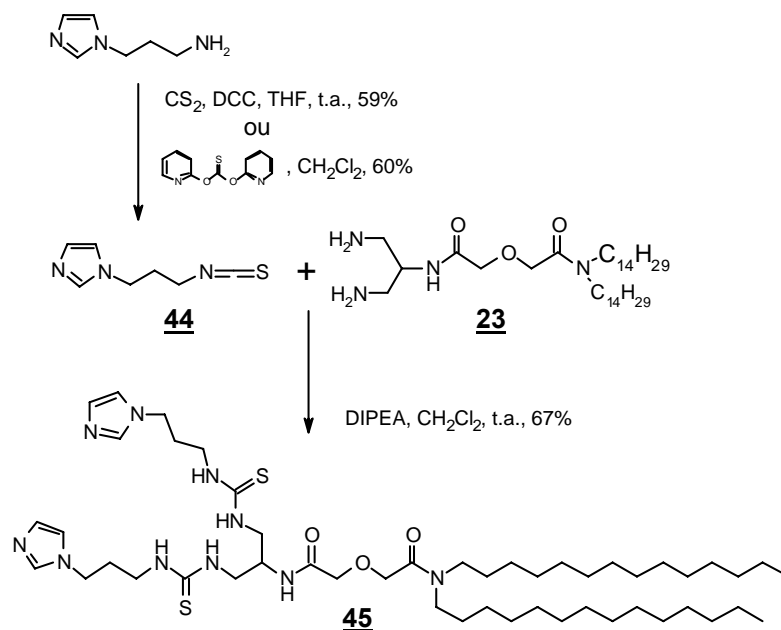


Schéma 25 : Synthèse de la lipopolythiourée à terminaisons imidazole

La réaction de l'isothiocyanate **44** avec le lipide di-amine **23** permet d'accéder à la thiourée **45** avec un rendement de 67%. L'examen du spectre RMN permet d'attribuer les signaux entre 118 et 137 ppm au motif imidazole et le pic à 183 ppm à la fonction thiourée. L'analyse LC-MS montre un pic à 466 qui correspond au dérivé doublement chargé ( $m/z = (931+2)/2$ ).

## E. Variation de l'ancre hydrophobe

Puis, nous avons fait varier l'ancre hydrophobe. Le changement d'ancre hydrophobe entraîne une modification de la balance hydrophile/hydrophobe des lipides. Une diminution de deux carbones des chaînes aliphatiques permet un gain de 1,6 unités sur le calcul du logP ; c'est pourquoi nous avons réduit la longueur de ces chaînes à 12 et 10 carbones. De plus, nous avons modifié la nature même de l'ancre en introduisant un motif cholestérol qui a déjà permis d'obtenir des lipides cationiques efficaces.<sup>64</sup>

Ces synthèses ont été réalisées sur les deux familles de lipopolythiourées qui donnent les meilleurs rendements : les composés qui comportent un espaceur diglycolique (*cf.* III.C.1, p.58), et ceux qui possèdent un répartiteur de type lysine (*cf.* III.C.3, p.68).

### 1. Longueur des chaînes aliphatiques

#### a) Synthèse de la didodécylamine

Si la didécylamine est commerciale, la didodécylamine ne l'est pas et doit être synthétisée. Les essais de formation de la didodécylamide par fusion, pratiqués lors de la synthèse de la ditétradécylamide **1**, ont échoué car le point d'ébullition de la dodécylamine est inférieur à 150°C et la distillation a lieu avant la réaction de couplage. Nous avons alors adopté une autre stratégie qui consiste à former le chlorure d'acyle **46** à l'aide du chlorure de thionyle et de l'A-21<sup>205</sup> (Schéma 26).

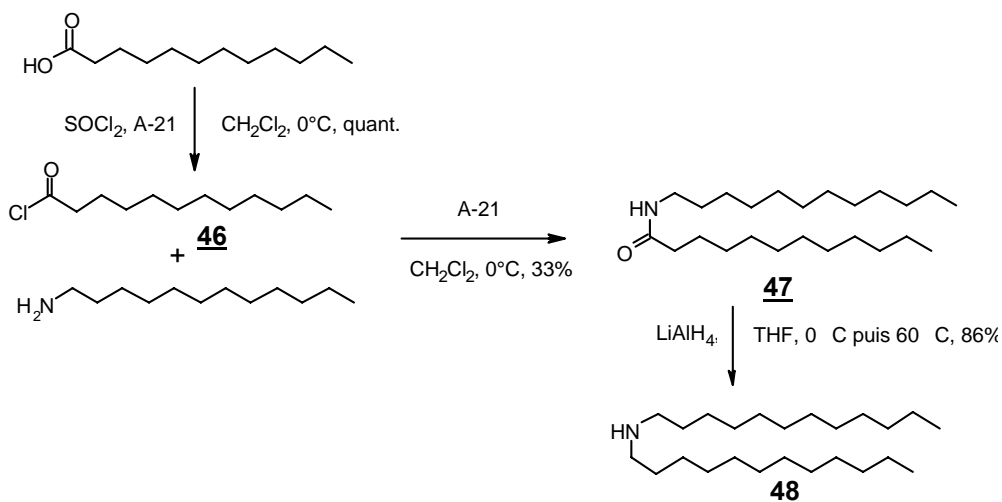


Schéma 26 : Synthèse de la didodécylamine

Le couplage de **46** avec la dodécylamine conduit à l'amide **47**, identifié par le déplacement à 2,15 ppm des protons en  $\alpha$  de l'azote. La chute du rendement (33%) a lieu lors de la purification sur silice de l'amide **47**, difficile à repérer à l'iode sur CCM. Finalement, la réduction de **47** par l'hydruure de lithium et d'aluminium dans le THF a permis d'aboutir à la dodécylamine **48** avec un rendement de 86%.



signal du proton en  $\alpha$  de l'amide à 4,20 ppm. L'hydrogénation catalytique permet de réduire les di-azides **51** et **52** en di-amines **53** et **54**, comme le confirme le déplacement du signal du carbone en  $\alpha$  des azotes, de 51 à 43 ppm. Les dernières étapes concernent la formation de la fonction thiourée. Nous avons synthétisé, d'une part, les lipides à terminaison diol, grâce à l'utilisation de l'isothiocyanate **26** puis, nous avons hydrolysé l'acétal par HCl en contrôlant la réaction par LC-MS. Les thiourées **58** et **59** sont identifiées par le signal caractéristique du carbonyle à 183 ppm, et leur masse à 807 et 751, pour **58** et **59** respectivement. D'autre part, la lipopolythiourée **57** à terminaison méthyle a été obtenue sur le dérivé comportant 10 atomes de carbone en utilisant l'isothiocyanate de méthyle. Le spectre RMN montre le pic du carbonyle de la thiourée à 184 ppm, ainsi qu'un singulet à 3,01 ppm en proton, correspondant aux groupes méthyle terminaux.

Enfin, les étapes mises au point pour la première ancre hydrophobe sont tout à fait adaptées à la synthèse de ces nouveaux composés. Les rendements finaux des lipides à 10 carbones sont de 36% et 37% pour **57** et **59** respectivement. Pour le lipide **58**, à 12 carbones, le rendement plus faible (5%) s'explique par le mauvais rendement obtenu pour la didodécylamine.

### **c) Famille lysine à chaînes courtes**

De même que nous avons obtenu les lipides à 14 atomes de carbones, nous avons réalisé la synthèse des composés possédant 12 et 10 atomes de carbones sur leur chaîne aliphatique.

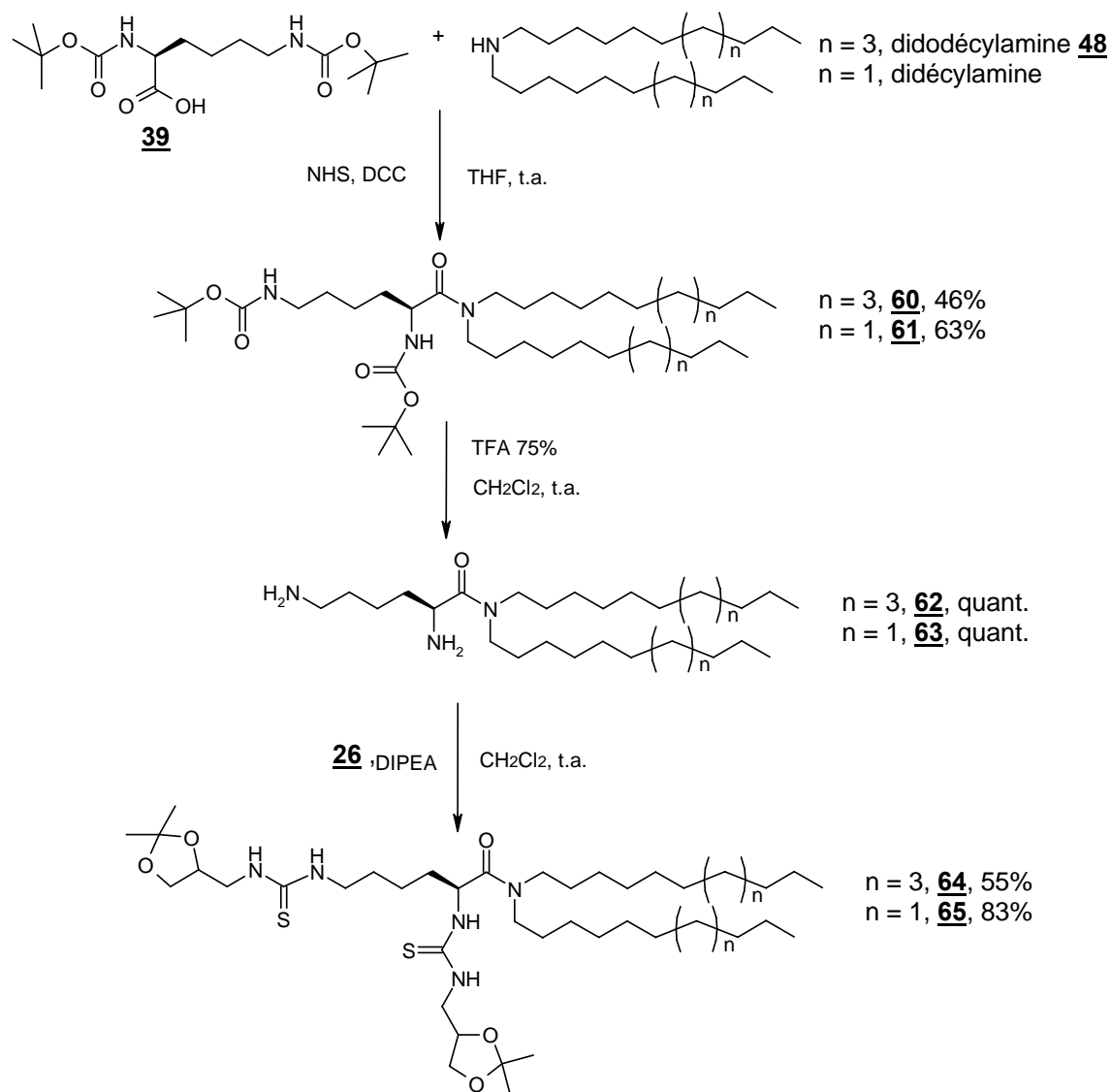


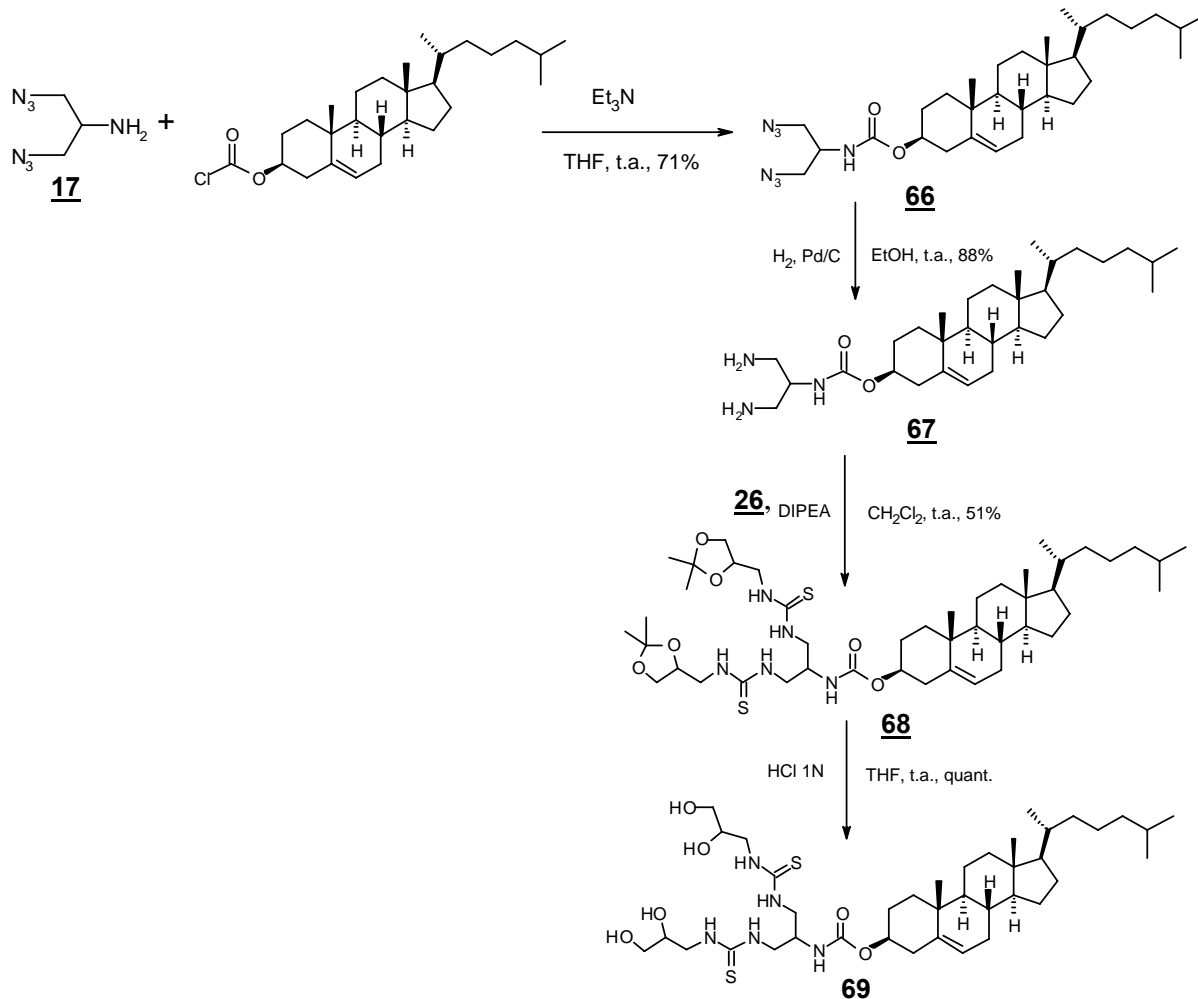
Schéma 28 : Synthèse des lipides à tête lysine et chaîne à 12 et 10 carbones

Le couplage de la lysine protégée **39** sur la didodécylamine ou didécylamine est effectué dans les mêmes conditions que **40**. La déprotection de **60** et **61** par le TFA est quantitative et attestée par la disparition des singulets du groupe *tert*-butyle à 1,43 ppm en <sup>1</sup>H et 28 ppm en <sup>13</sup>C. Les amines primaires **62** et **63** sont alors traitées par l'isothiocyanate **26** pour former les thiourées **64** et **65**, identifiées en RMN par les signaux des groupes isopropylidène entre 25 et 26 ppm, ainsi que le signal de la thiourée à 183 ppm. De plus, les analyses centésimales et LC-MS assurent la pureté des composés obtenus. Les rendements finaux sont de 7% pour **64** et 52% pour **65**. Ils sont meilleurs que pour les têtes symétriques, principalement à cause du nombre réduit d'étapes.

Nous disposons maintenant d'une série de lipopolythiourées à longueur de chaîne variable. Nous nous sommes également intéressés au changement de la nature de la chaîne par l'introduction d'un motif cholestérol.

## 2. Ancre cholestérol

La stratégie que nous avons développée consiste à utiliser le chloroformate de cholestéryle pour l'engager dans la réaction avec l'amine **17**, en présence de triéthylamine dans le THF<sup>203</sup> (Schéma 29). Le di-azide **66** est identifié par le signal RMN du carbamate à 155 ppm.



L'hydrogénation catalytique permet la réduction de l'azide **66** sans dégrader le motif stéroïde : les signaux des carbones vinyliques à 122 et 139 ppm sont intacts et le signal du carbone en  $\alpha$  de l'azote a été déplacé à 45 ppm. Comme précédemment, la thiourée **68** est formée grâce à l'isothiocyanate **26**, ce qui est confirmé par la présence des signaux à 183 ppm et un pic de masse à  $848 (M+H)^+$ . Enfin, l'hydrolyse de l'isopropylidène, contrôlée par LC-MS, permet d'aboutir à la lipopolythiourée **69**, qui est finalement obtenue en 4 étapes avec un rendement global de 32%.

## F. Synthèse d'une thiourée fluorescente

Il peut être intéressant de greffer un fluorophore sur un tel lipide pour pouvoir effectuer des études de trafic intracellulaire, comme la rhodamine, l'un des plus utilisés. Nous avons choisi de la fixer sur un bras au niveau de l'espaceur, puisque de tels modèles ont déjà été synthétisés.<sup>166</sup> Nous avons inséré un espaceur sous forme d'une lysine, qui permet de ramifier la structure (Figure 32).

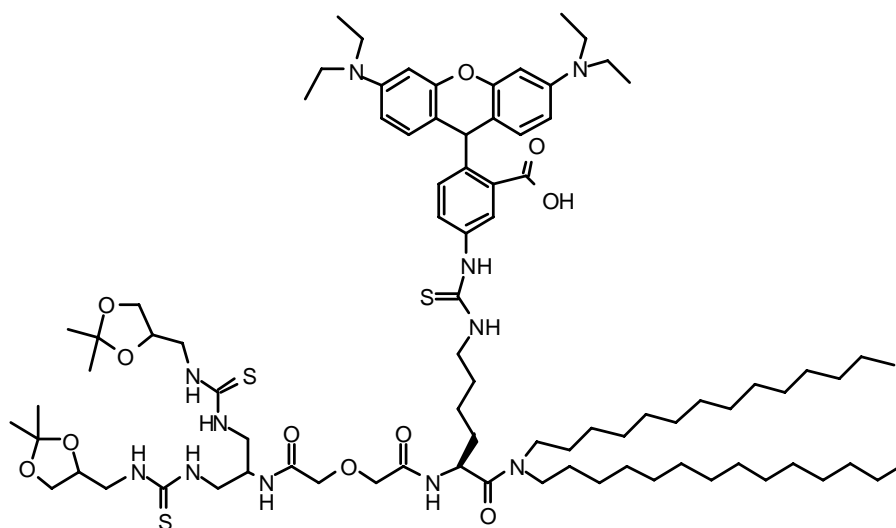


Figure 32 : Structure de la lipopolythiourée fluorescente

### 1. Rétrosynthèse

La rétrosynthèse proposée est la suivante (Schéma 30) :

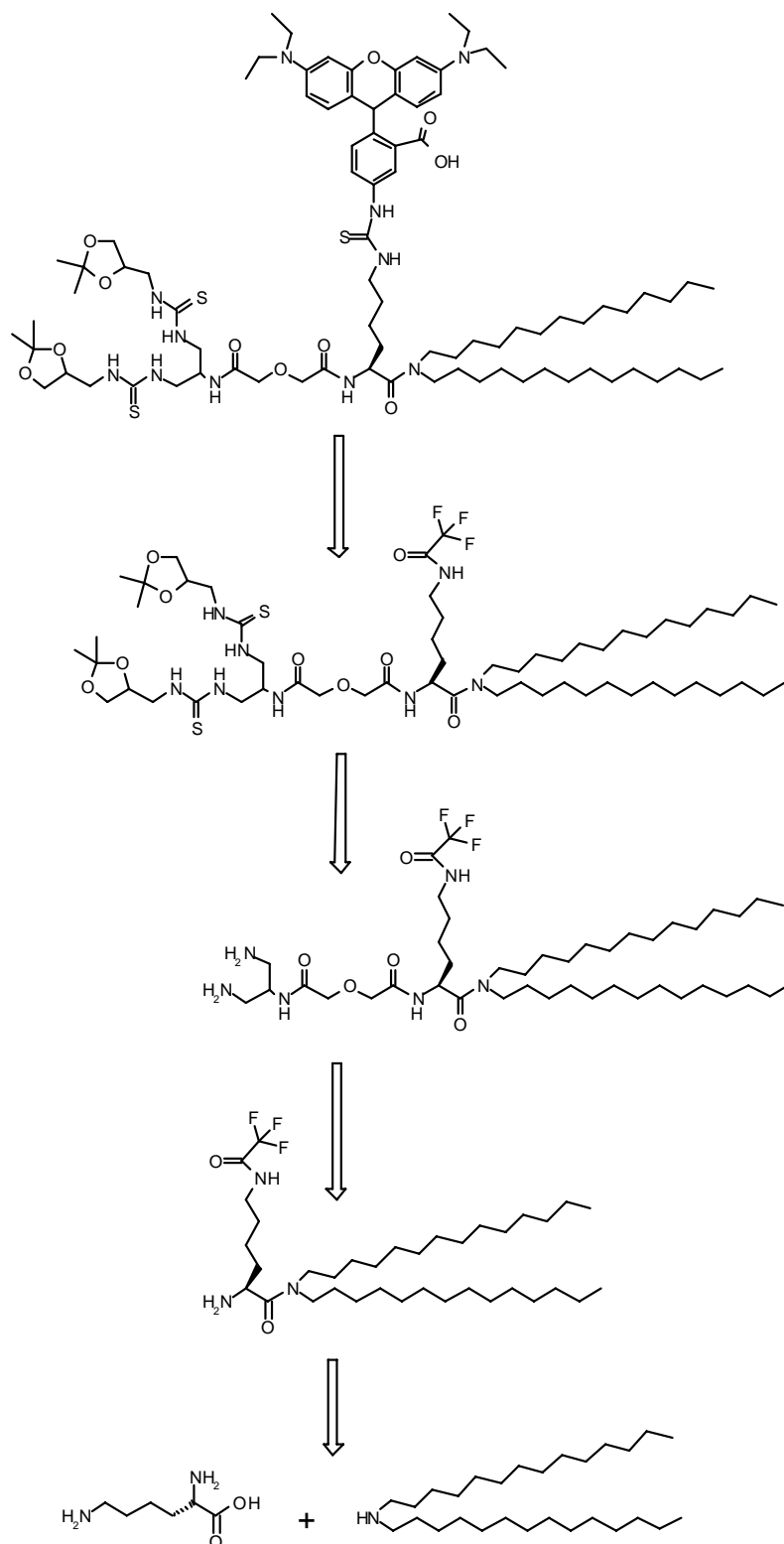


Schéma 30 : Rétrosynthèse de la lipopolythiourée fluorescente

L'isothiocyanate de la rhodamine-B peut être introduite sur l'amine terminale de la lysine, maintenue protégée pendant toute la synthèse par un groupe trifluoroacétamide. La synthèse est similaire aux vecteurs à espaceurs diglycolique, à l'exception d'une étape : la *L*-lysine est couplée sur la ditétradécylamine avant l'anhydride diglycolique.





Dans l'étape suivante, l'amine latérale est déprotégée au reflux du méthanol en présence de carbonate de potassium<sup>221</sup> (Schéma 32). Le couplage de la rhodamine B isothiocyanate avec l'amine **73** est ensuite réalisé en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane, dans des conditions analogues à la formation de la thiourée **74**.

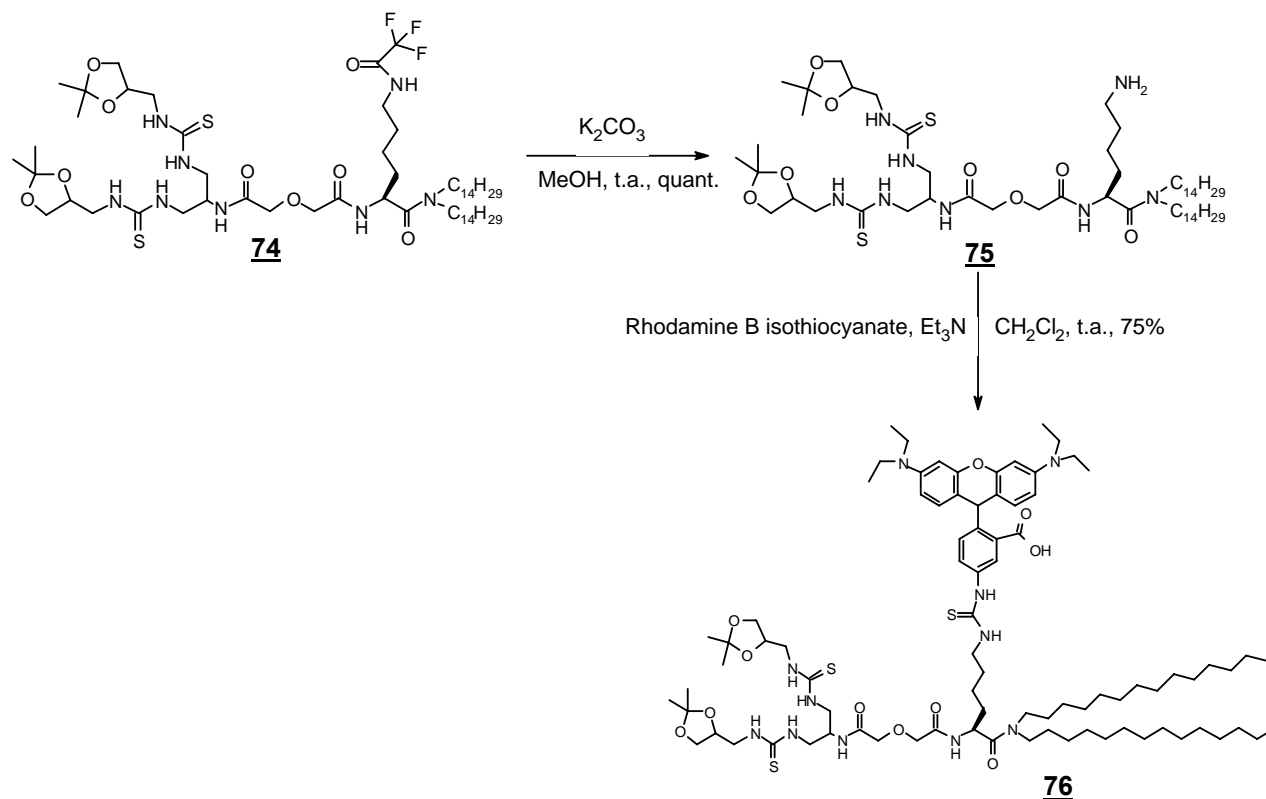


Schéma 32 : Synthèse du lipide thiourée fluorescent

La structure de la thiourée **76** a été établie par l'examen des spectres RMN, qui montre la présence des protons aromatiques du chromophore, et par l'analyse LC-MS qui donne un pic de masse 786 ((M+2H)/2)<sup>+</sup>.

## G. Conclusion

### 1. Bilan des vecteurs synthétisés

Nous avons synthétisé une famille de composés dont l'ancrage hydrophobe, l'espacement, la tête et les terminaisons varient. Le Tableau 7, p.85, récapitule les structures synthétisées, il est également disponible sur une feuille dépliante à la fin de ce manuscrit. Nous pouvons récapituler les structures selon les paramètres que l'on a fait varier (Tableau 6).

<sup>221</sup> Boger D. L., Yohannes D. (1989) Total synthesis of K-13, *J. Org. Chem.*, 54, 2498-2502.

	Aromatique	Succinique	Diglycolique	PEG	Lysine
C14	diol : <u>12</u>	diol : <u>25</u>	diol : <u>28</u>	diol : <u>38</u>	diolIP : <u>42</u>
	alcool : <u>11</u>	Me : <u>43</u>	Imidazole : <u>45</u>		
C12			diol : <u>58</u>		diolIP : <u>64</u>
C10			diol : <u>58</u>		diolIP : <u>65</u>
			diolIP : <u>57</u>		
			Me : <u>56</u>		
Cholestérol	diol : <u>69</u>				

Tableau 6 : Répartition des lipopolythiourées selon leur chaîne, espaceur, et terminaison<sup>222</sup>

Si toutes les possibilités n'ont pas été synthétisées, il est possible, pour chaque paramètre, de trouver une famille de composés comparables entre eux. Ainsi, pour comparer l'influence de la terminaison, nous pouvons comparer les lipopolythiourées 56, 57, 58. Les composés 12, 25, 28, 38 permettent d'étudier la nature de l'espaceur. Enfin, pour l'influence de la chaîne, nous pouvons utiliser la famille diglycolique (28, 58, 59) ou lysine (42, 64, 65).

Par la suite, pour plus de simplicité, nous classerons les lipopolythiourées selon leur famille :

- **Aromatique : 11, 12**
- **Succinique : 25, 43**
- **Diglycolique : 28, 45, 56, 57, 58, 59**
- **PEG : 38**
- **Lysine : 42, 64, 65**
- **Cholestérol : 69**

## 2. Conclusion

Nous avons finalement obtenu 16 lipopolythiourées qui peuvent être évaluées en physico-chimie et biologie. Ces multiples synthèses ont été facilitées par l'utilisation d'intermédiaires réactionnels communs, notamment les synthons 2, 17 ou 26, dont la synthèse en grande quantité est facile et efficace. Nous avons également pu reproduire et mettre au point un certain nombre d'étapes communes à toutes les synthèses, telles que :

<sup>222</sup> diolIP = terminaison diol protégée par un groupe isopropylidène

- **Le couplage peptidique**, qui a été testé selon différentes méthodes. L'association du NHS et du DCC a donné les meilleurs résultats,
- **L'hydrogénation catalytique**, qui est quasiment quantitative et n'a pas nécessité rarement de purification,
- **La condensation de l'isothiocyanate** en présence de base organique (Et<sub>3</sub>N ou DIPEA), qui a atteint des rendements de 90%
- **L'hydrolyse** en milieu acide a été contrôlée par un suivi LC-MS, qui a permis de confirmer à la fois la structure et la pureté du produit.

Ces différentes synthèses nous ont permis de remplir les deux premiers objectifs de notre travail. En effet, nous avons synthétisé 16 composés possédant une large diversité aussi bien au niveau de la terminaison que de l'espaceur, du répartiteur ou de l'ancre hydrophobe (Tableau 6). Par ailleurs, nous avons mis au point des voies de synthèses plus rapides et plus efficaces que la stratégie adoptée pour le lipide D3TU (10 étapes, 13% de rendement). Les rendements de chaque lipopolythiourée sont présentés dans le Tableau 7. En particulier, les meilleurs rendements sont observés pour les lipides comportant une terminaison méthyle (**43**, rdt = 51%, **57**, rdt = 37%), des chaînes aliphatiques de 10 carbones (**56**, rdt = 36%, **65**, rdt = 52%), car la disponibilité des produits commerciaux (méthyle isothiocyanate et didécylamine) permet de réduire le nombre d'étapes. En revanche, les synthèses les plus délicates concernent les lipides comportant une chaîne à 12 carbones, un espaceur de type PEG ou aromatique. Enfin, certaines synthèses pourraient être optimisées, par exemple le rendement du composé **25** pourrait être amélioré dans les dernières étapes par l'utilisation du synthon **26**. Toutefois, nous avons préféré privilégier, dans un premier temps, l'obtention des produits. Dans un deuxième temps, au vu des résultats biologiques, nous optimiserons, si nécessaire, la synthèse des composés les plus intéressants.

Le chapitre suivant sera consacré à l'évaluation de cette famille de lipopolythiourées, afin de confirmer les résultats de la DT3TU et de dégager les structures les plus performantes. La diversité des structures permettra, dans un second temps, d'établir des relations structure/propriétés.

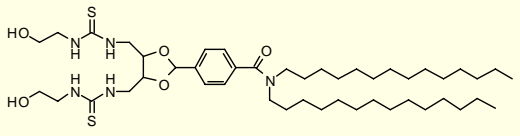
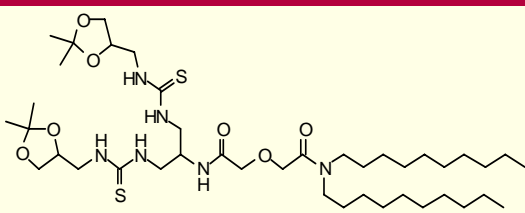
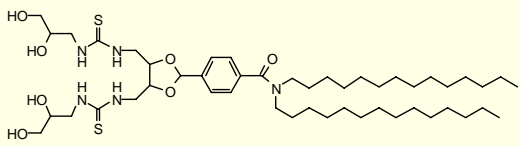
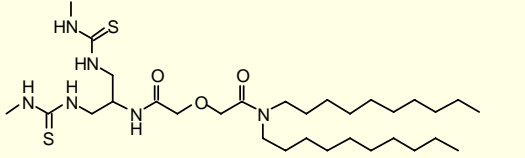
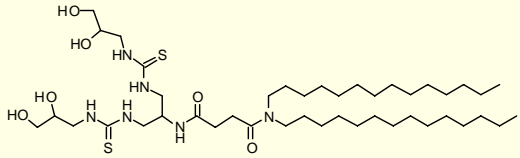
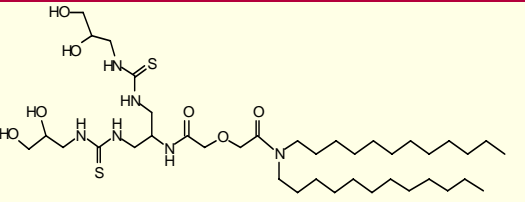
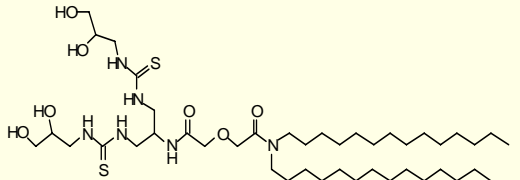
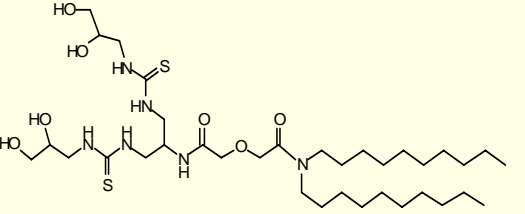
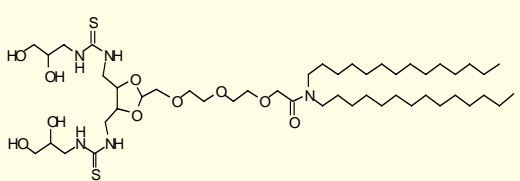
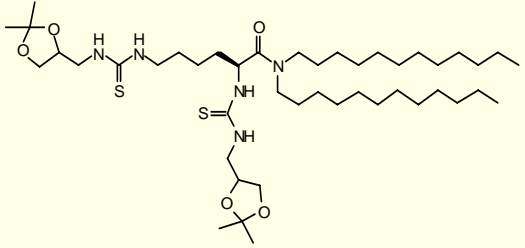
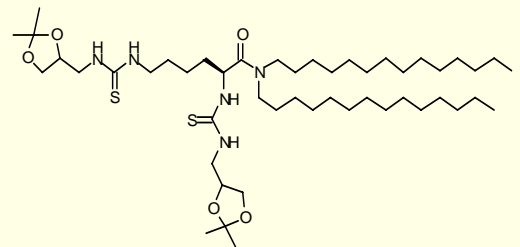
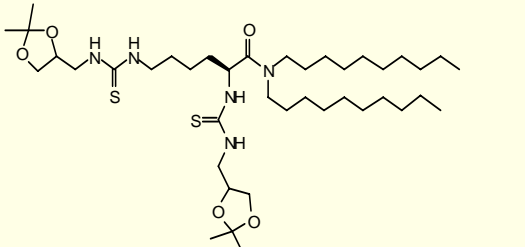
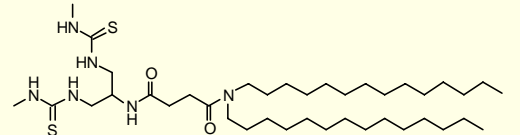
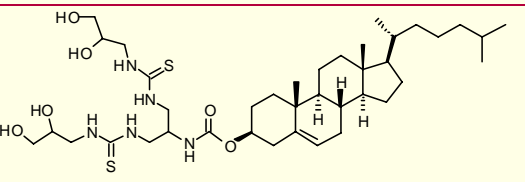
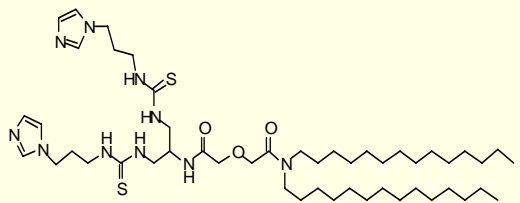
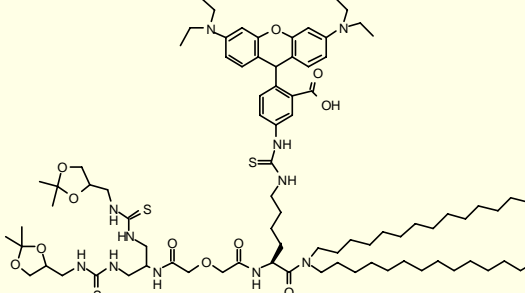
N°	Structure	Rdt	N°	Structure	Rdt
<b>11</b>		4%	<b>56</b>		37%
<b>12</b>		4%	<b>57</b>		37%
<b>25</b>		4%	<b>58</b>		5%
<b>28</b>		51%	<b>59</b>		36%
<b>38</b>		2%	<b>64</b>		7%
<b>42</b>		15%	<b>65</b>		52%
<b>43</b>		51%	<b>69</b>		32%
<b>45</b>		39%	<b>76</b>		2%

Tableau 7 : Bilan des lipopolythiourées testées



# IV. Etude des propriétés physico-chimiques et biologiques des lipopolythiourées synthétisées

## A. Stratégie et méthodes

Seize lipopolythiourées ont été évaluées en tant que vecteurs de gènes. Cette étude a été réalisée en plusieurs étapes : nous avons d'abord testé leurs propriétés physico-chimiques et plus particulièrement leur aptitude à former des vésicules dans l'eau, puis leur capacité d'interaction avec l'ADN. Ensuite, nous avons étudié leur activité de transfection *in vitro*, puis leur comportement *in vivo*.

### 1. Méthodes physico-chimiques

#### a) Lipides en milieux aqueux

Lorsque des amphiphiles sont placés en solution aqueuse, ils forment spontanément des structures appelées micelles ou liposomes.<sup>223</sup> Ces organisations résultent de l'équilibre entre deux types de forces : une force d'attraction entre les domaines hydrophobes des lipides et une force de répulsion électrostatique entre les parties polaires, souvent chargées. Les structures adoptées dépendent de la nature du lipide, plus précisément du volume occupé par l'ancre hydrophobe et la tête polaire (Figure 33).

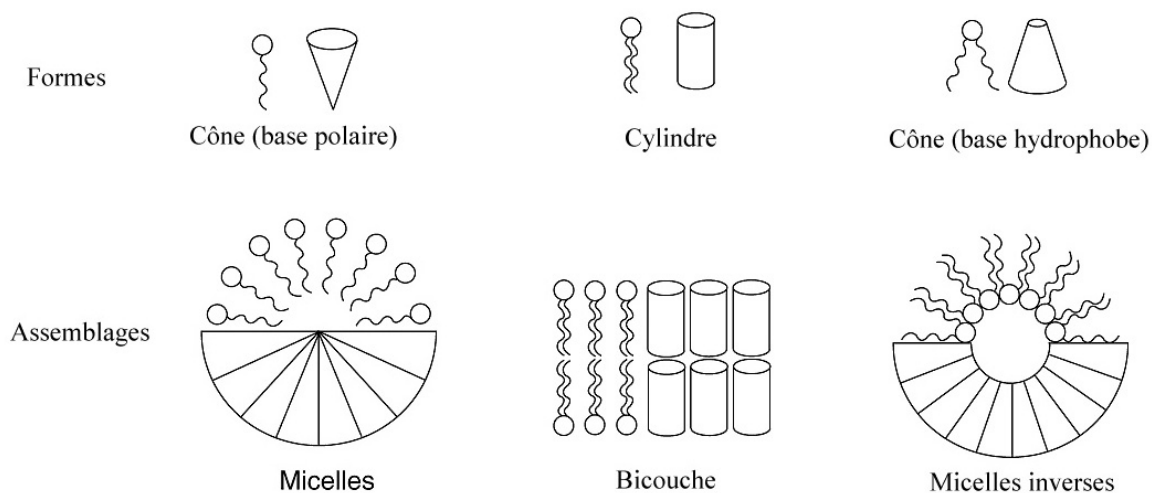


Figure 33 : Différentes phases lipidiques<sup>224</sup>

Décrits pour la première fois par Bangham<sup>225</sup> en 1965, les liposomes furent d'abord appelés « Banghosomes » et utilisés comme modèle de membrane, puis comme vésicules de transport de médicaments ou d'ADN. Ils sont constitués de phospholipides, naturels ou synthétiques, qui s'assemblent sous forme de bicouches lipidiques et délimitent un

<sup>223</sup> Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J-R., Schuber F. (1993) Les liposomes. Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques, Ed. Inserm, 265p.

<sup>224</sup> Source : [http://biochimie.univ-monpt2.fr/licence/bioenergetique/membranes/mic\\_bic\\_phases1.gif](http://biochimie.univ-monpt2.fr/licence/bioenergetique/membranes/mic_bic_phases1.gif)

<sup>225</sup> Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipides, *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252.

compartiment aqueux (Figure 34). Ils peuvent être unilamellaires ou multilamellaires selon le nombre de couches lipidiques dont ils sont constitués (Figure 35). Utilisés comme agents de vectorisation, les liposomes présentent l'intérêt d'être biocompatibles, d'augmenter la stabilité du principe actif et de réduire sa toxicité, ce qui améliore ses effets pharmacocinétiques.<sup>226</sup> C'est pourquoi ces systèmes sont particulièrement intéressants pour le transfert de gènes.

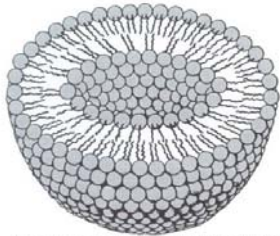


Figure 34 : Représentation d'un liposome<sup>227</sup>

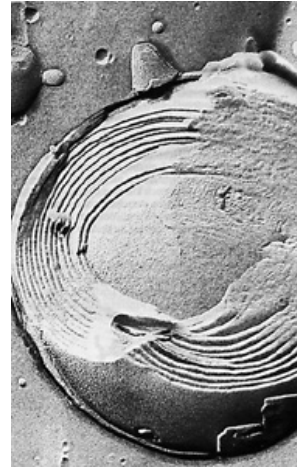


Figure 35 : Liposome multilamellaire observé par cryofracture et microscopie électronique<sup>228</sup>

Les lipides cationiques, candidats au transfert de gènes, sont conçus pour former des liposomes et encapsuler l'ADN. Leur tête cationique et leur ancre hydrophobe leur permettent de s'organiser sous forme de micelles<sup>229,230</sup> ou de liposomes,<sup>231</sup> et leur charge cationique assure l'association avec l'ADN polyanionique. Les lipopolythiourées synthétisées possèdent une structure similaire, à la différence que leur tête polaire n'est pas chargée. Nous nous sommes donc inspirés des techniques de formulation des lipides cationiques pour les études physico-chimiques des lipopolythiourées.

### b) Méthodes de préparation des liposomes

Tout d'abord, la formulation des lipides cationiques peut faire intervenir d'autres lipides. Les co-lipides neutres peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et influencer l'efficacité de transfection.<sup>232</sup> Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé, d'une part, la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) pour faciliter la formation de liposomes et, d'autre

<sup>226</sup> Smith J. G., Walzem R. L., German J. B. (1993) Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1154, 327-340.

<sup>227</sup> Source : [http://dadairs.com/image/liposome\\_structure.jpg](http://dadairs.com/image/liposome_structure.jpg)

<sup>228</sup> Source : <http://www.igr.fr/html/img/lipo2.jpg>

<sup>229</sup> Wang Y., Dubin P. L., Zhang H. (2001) Interaction of DNA with anionic micelles : effects of micelle surface charge density, micelle shape, and ionic strength on complexation and DNA collapse, *Langmuir*, 17, 1670-1673.

<sup>230</sup> Pitard B., Aguerre O., Airiau M., Lachagès A-M., Boukhnikachvili T., Byk G., Dubertret C., Herviou C., Scherman D., Mayaux J-F., Crouzet J. (1997) Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14412-14417.

<sup>231</sup> Miller A. D. (1998) Cationic liposomes for gene therapy, *Angew. Chem. Interaction. Ed.*, 37, 1768-1785.

<sup>232</sup> Pedroso de Lima M. C., Simoes S., Pires P., Faneca H., Duzgunes N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery : from biophysics to biological application, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 47, 277-294.



part, le cholestérol car sa structure stéroïdienne permet de stabiliser les particules<sup>233</sup> et d'augmenter la fluidité des membranes<sup>234</sup> (Figure 36).

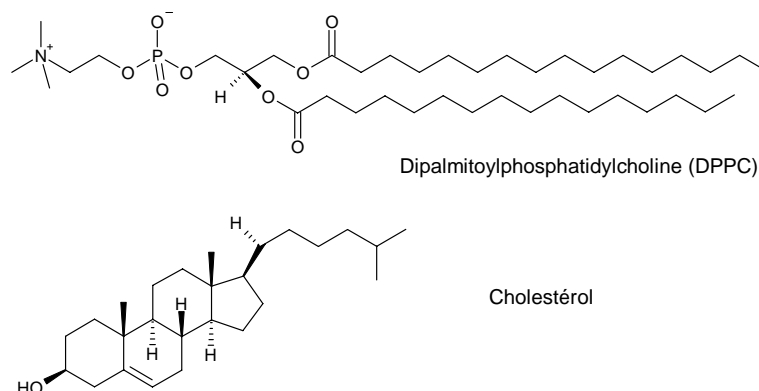


Figure 36 : Lipides neutres utilisés pour la formulation des lipopolythiourées

Ensuite, plusieurs techniques peuvent être utilisées pour préparer des liposomes :

#### ➤ L'hydratation d'un film lipidique

Décrit par Bangham,<sup>225</sup> ce procédé consiste à dissoudre les lipides dans un solvant organique puis à les évaporer jusqu'à obtention d'un film homogène. Une solution aqueuse est alors ajoutée et l'hydratation progressive de ce film forme des liposomes multilamellaires (*Multilamellar Vesicles*, ou MLV) (Figure 37).



Figure 37 : Mécanisme de formation des liposomes MLV<sup>223</sup>

Pour réduire la taille des liposomes formés par cette méthode, il est possible de les soumettre à l'action des ultrasons ou d'un vortex, de les filtrer sous pression par extrusion ou microfluidisation, entre autres techniques.<sup>223</sup>

#### ➤ L'injection éthanolique<sup>235</sup>

Dans ce procédé, les lipides sont dissous dans une solution éthanolique et injectés à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse soumise à une forte agitation. Cette technique aboutit à la formation de liposomes unilamellaires de petite taille (*Small Unilamellar Vesicles*, ou SUV).

<sup>233</sup> Hirsch-Lerner D., Zhang M., Eliyahu H., Ferrari M. E., Wheeler C. J., Barenholz Y. (2005) Effect of « helper lipids » on lipoplex electrostatics, *Biochim. Biophys. Acta*, 1714, 71-84.

<sup>234</sup> Regelin A. E., Frankhaenel S., Gürtesch L., Prinz C., von Kiedrowski G., Massing U. (2000) Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs, *Biochim. Biophys. Acta*, 1464, 151-164.

<sup>235</sup> Campbell M.J. (1995) Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection method, *Biotechniques*, 18, 1027-1032.

### ➤ L'évaporation en phase inverse

La méthode de Szoka et Papahadjopoulos<sup>236</sup> permet d'améliorer le taux d'encapsulation des liposomes. Il s'agit de dissoudre les lipides dans un solvant organique et d'y ajouter une solution aqueuse. L'ensemble est alors soumis aux ultrasons puis le solvant organique est évaporé. Les vésicules obtenues sont de grand diamètre et unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicle* ou LUV)

Dans le cadre de ce travail, nous avons principalement utilisé l'injection éthanolique car c'est une technique simple à mettre en œuvre sur de nombreux échantillons. Toutefois, il est reconnu que la méthode de formulation détermine les paramètres physico-chimiques et peut moduler les propriétés biologiques.<sup>232</sup> Par conséquent, nous avons occasionnellement utilisé la méthode d'hydratation de film lipidique pour comparer les deux techniques de formulation.

Enfin, la formation de lipoplexes se fait spontanément par l'addition d'une solution aqueuse d'ADN plasmidique sur la formulation de lipides préalablement obtenue. L'ordre des constituants et la concentration saline peuvent influencer la taille et la charge des particules formées, ainsi que l'efficacité d'interaction avec l'ADN.<sup>237</sup>

### c) Méthodes de caractérisation

Les méthodes biophysiques qui nous ont intéressés concernent, d'abord, la caractérisation des liposomes formés (principalement leur distribution de taille), puis la capacité d'interaction avec l'ADN.

#### ➤ Taille des particules

Le diamètre hydrodynamique des particules peut être mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière. Les particules en suspension sont soumises à une agitation thermique qui leur confère un mouvement aléatoire appelée mouvement Brownien. Lorsque ces particules sont éclairées par un laser, par exemple, elles diffusent de la lumière dans toutes les directions. Les variations de l'intensité de lumière en un point nous renseignent sur la vitesse des particules, qui peut être reliée à leur diamètre par l'équation de Stokes-Einstein :

#### Equation de Stokes-Einstein

$$D = kT/6\pi R\eta$$

**D** coefficient de diffusion de la particule

**T** température

**K** constante de Boltzmann

**R** rayon de la particule

**n** viscosité du milieu

<sup>236</sup> Szoka F., Papahadjopoulos D. (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 9, 4194-4198.

<sup>237</sup> Nicolazzi C., Garinot M., Mignet N., Scherman D., Bessodes M. (2003) Cationic lipids for transfection, *Curr. Med. Chem.*, 10, 1263-1277.

Il est également possible d'avoir accès à la taille des particules par microscopie électronique à transmission. Cependant, le diamètre mesuré peut être légèrement inférieur à celui obtenu par la méthode précédente. En effet, la mesure de diffusion de la lumière permet d'accéder au diamètre hydrodynamique des particules : lors de leur déplacement dans l'environnement aqueux, une ou plusieurs couches de molécules d'eau ou de sel sont entraînées par ce mouvement, augmentant ainsi le diamètre apparent des particules.

#### ➤ Evaluation de l'interaction avec l'ADN

L'association des complexes avec l'ADN a été évaluée essentiellement par deux techniques :

- **La migration électrophorétique sur gel d'agarose** de l'ADN complexé avec une quantité croissante de liposomes : elle permet de déterminer la quantité de lipide nécessaire pour associer totalement l'ADN, dont la migration n'est alors plus possible.
- **L'utilisation d'une sonde comme le Picogreen**<sup>238</sup> qui fluoresce lorsqu'elle est intercalée entre les bases de l'ADN. L'intensité de fluorescence nous renseigne alors sur l'accessibilité de l'ADN dans les complexes.

Ces deux techniques ont été utilisées pour l'évaluation des lipopolythiourées avec l'ADN car elles sont faciles à mettre en œuvre avec les moyens du laboratoire. Enfin, une étude de dichroïsme circulaire a également été réalisée dans le but d'analyser l'effet des lipopolythiourées sur la conformation de l'ADN. Nous reviendrons plus en détails sur cette technique lors de la présentation des résultats.

#### d) Exemple : les lipoplexes

Ces méthodes ont été utilisées pour la caractérisation des lipoplexes cationiques. En général, les études de physico-chimie mettent en évidence trois zones différentes,<sup>239</sup> en fonction de la quantité de lipides par rapport à l'ADN (ratio N/P ou +/-) (Figure 38) :

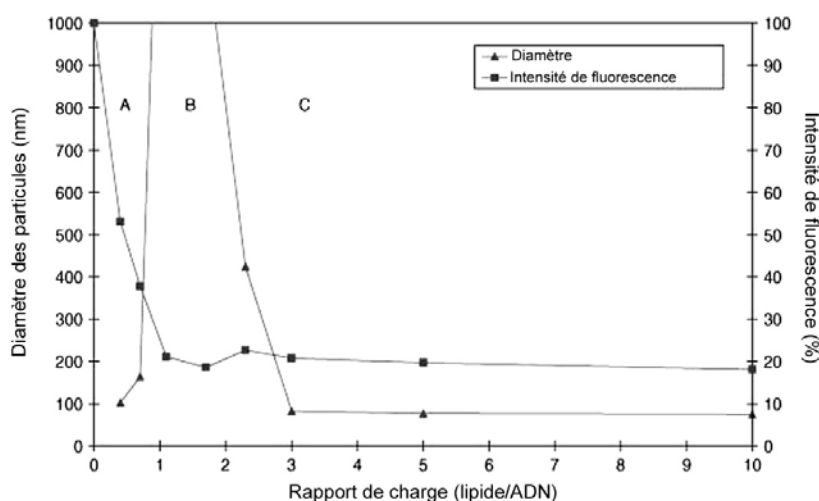


Figure 38 : Diamètre des particules et accessibilité de l'ADN dans les lipoplexes cationiques de RPR209120/DOPE<sup>240</sup>

<sup>238</sup> Ferrari M.E., Nguyen C. M., Zelphati O., Tsai Y., Felgner P. L. (1998) Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes, *Hum. Gene Ther.*, 10, 9, 341-351.

<sup>239</sup> Byk G., Wetzter B., Frederic M., Dubertret C., Pitard B., Jaslin G., Scherman D. (2000) Reduction-sensitive lipopolyamines as a novel nonviral gene delivery system for modulated release of DNA with improved transgene expression, *J. Med. Chem.*, 43, 4377-4387.

➤ **Zone A : excès d'ADN**

Lorsque le rapport de charges est inférieur à 1, les charges négatives sont majoritaires et la suspension est stable colloïdalement en raison des interactions électrostatiques. Le diamètre moyen des lipoplexes est de l'ordre de 100 à 200 nm et l'ADN est accessible au bromure d'éthidium (agent qui fluoresce lorsqu'il est intercalé entre les bases de l'ADN, comme le Picogreen). Dans cette zone, l'ADN n'est pas complètement compacté, ce qui a été confirmé par des études de microscopie à force atomique.<sup>241</sup> Ceci rend les particules inutilisables *in vivo*, car l'ADN serait rapidement dégradé par les enzymes.

➤ **Zone B : neutralité**

Lorsque le rapport de charges est voisin de 1, les charges positives neutralisent l'ADN et l'on constate alors une agrégation des complexes en clusters, de taille micrométrique, dans lesquels l'ADN n'est plus accessible au bromure d'éthidium. Ces particules ne sont pas utilisables en injection systémique à cause de leur taille trop importante.

➤ **Zone C : excès de lipides cationiques**

Lorsque le rapport de charges est supérieur à 3, les charges cationiques sont en excès, ce qui permet de retrouver une stabilité colloïdale. Les particules sont de l'ordre de 50 à 150 nm, taille requise pour l'administration systémique et l'ADN est inaccessible au bromure d'éthidium, donc protégé des DNases. La purification de ces complexes a mis en évidence une structure multilamellaire compacte.<sup>242</sup> Ces complexes sont généralement ceux utilisés *in vivo*.

De nombreuses études biophysiques ont été réalisées pour accéder à la structure des lipoplexes. Il peut s'agir : soit de méthodes théoriques, comme la thermodynamique théorique<sup>243</sup> ou la dynamique moléculaire,<sup>244</sup> soit de techniques spectroscopiques infrarouge,<sup>245</sup> Raman,<sup>246</sup> de dichroïsme circulaire,<sup>247</sup> ou, encore, de diffraction des rayons X,<sup>248</sup> entre autres méthodes. Cette dernière technique a permis la publication de la structure des lipoplexes cationiques à base de DOTAP où une seule hélice d'ADN est intercalée entre les bicouches de lipides (*cf.* Figure 11, p.25).

---

<sup>240</sup> Tranchet I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., Scherman D. (2004) Physico-chemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids, *J. Gene Med.*, 6, S34-S35.

<sup>241</sup> Alfmoti M. R., Harashima H., Shinohara Y., Alfmoti A., Baba Y., Kiwada H. (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery : biophysical study and mechanism of internalization, *Arch. Biochem. Biophys.*, 410, 246-253.

<sup>242</sup> Xu Y., hui S-W., Frederik P., Szoka F. (1999) Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes, *Biophys. J.*, 77, 341-353.

<sup>243</sup> Harries D., May S., Gelbart W., Ben-Shaul A. (1998) Structure, stability, and thermodynamics of lamellar DNA-lipid complexes, *Biophys. J.*, 75, 159-173.

<sup>244</sup> Bandyopadhyay S., Tarek M., Klein M. (1999) Molecular dynamics study of a lipid-DNA complex, *J. Phys. Chem.*, 103, 46, 10075-10080.

<sup>245</sup> Choosakoonkriang S., Wiethoff C., Anchordoquy T., Koe G., Smith J., Middaugh R. (2001) Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA, *J. Biol. Chem.*, 276, 11, 8037-8043.

<sup>246</sup> Matsui H., Pan S. (2001) Distribution of DNA in cationic liposome complexes probed by Raman microscopy, *Langmuir*, 17, 571-573.

<sup>247</sup> Braun C. S., Jas G. S., Choosakoonkriang S., Koe G. S., Smith J. G. (2003) The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes, *Biophys. J.*, 84, 1114-1123.

<sup>248</sup> Koltover I., Salditt T., Rädler J., Safinya C. (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science*, 281, 78-81.

## 2. Critères d'évaluation biologique

### a) Tests cellulaires *in vitro*

#### ➤ **Transfection**

Le critère essentiel de sélection d'un vecteur de gène est sa capacité à entraîner l'expression d'un gène après la mise en contact des cellules avec les complexes ADN/vecteur. Ces essais de transfection ont été réalisés sur différents types cellulaires : principalement des cellules B16 dérivées de mélanome de souris et des cellules Eahy dérivées des primocultures de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Le gène utilisé est celui de la luciférase (*cf.* carte du plasmide pVax2luc p.17) car il permet un dosage simple de son expression, à travers l'activité luciférase du lysat cellulaire.

#### ➤ **Etudes mécanistiques**

Il s'agit de visualiser l'interaction entre les membranes cellulaires et les complexes lipopolythiourée/ADN. Pour cela, nous avons introduit des lipides fluorescents dans la formulation des liposomes, tels que la DOPE<sup>249</sup> couplée à la rhodamine ou encore la lipopolythiourée **76** qui comporte un motif rhodamine. Cependant, la structure de la DOPE peut entraîner des modifications structurales des liposomes, c'est pourquoi nous avons préféré utiliser **76** qui induit *a priori* peu de modifications de structure du fait de sa nature lipopolythiourée. En observant les cellules transfectées en microscopie de fluorescence, il est possible d'avoir une idée de la quantité de complexes qui a pénétré la cellule. Cette étude a également été effectuée dans une optique de ciblage. Des lipides comportant un motif peptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) ont été utilisés pour cibler les cellules endothéliales tumorales qui surexpriment les intégrines  $\alpha_V\beta_3$ .

### b) Comportement *in vivo*

Les études *in vivo* sont nettement plus lourdes à mettre en œuvre et n'ont donc été réalisées que sur les lipopolythiourées les plus actives *in vitro*. Nous nous sommes particulièrement intéressés à trois critères :

- **La toxicité**, évaluée par le suivi des souris après injection systémique d'une solution de lipopolythiourée,
- **L'efficacité de transfection** après injection intra-tumorale des complexes lipopolythiourée/ADN, à l'aide du gène rapporteur de la luciférase,
- **La biodistribution** des complexes lipopolythiourée/ADN deux heures après injection intraveineuse. L'utilisation de complexes fluorescents permet de doser la proportion des complexes présents dans différents organes et dans la circulation sanguine.

Ces études nous ont permis d'engager une discussion sur le comportement des lipopolythiourées en tant que vecteur de gènes, qui sera proposée dans le cinquième chapitre.

---

<sup>249</sup> La diolelphosphatidyléthanolamine (DOPE) est un lipide neutre couramment utilisé dans la formulation des lipides cationiques.

## B. Evaluation des formulations des lipopolythiourées

Avant toute chose, nous devons préciser les notations utilisées à partir de ce chapitre. Pour les lipides cationiques, les études physico-chimiques utilisent le rapport de charges lipide/ADN, noté N/P ou +/- . Les lipopolythiourées ne possédant pas de charge *a priori*, nous avons choisi d'appeler ce ratio LPT/P, c'est-à-dire le ratio mol de lipopolythiourée/mol de nucléotide. Le Tableau 8 permet de convertir ce ratio en +/- .

10	LPT/P
20	fonctions thiourée / fonctions phosphate
10	mol LPT / mol P
15	nmol LPT / $\mu\text{g}$ ADN
9,5	$\mu\text{g}$ LPT / $\mu\text{g}$ ADN (en moyenne pour toutes les LPT)
74 000	molécules LPT / plasmide
40	Liaisons hydrogène potentielles / phosphate
20	+/- ou N/P pour les lipides cationiques

Tableau 8 : Grille de conversion

### 1. Validité du modèle

Les lipopolythiourées synthétisées diffèrent de la DT3TU par la structure de la tête, branchée et le nombre de motifs thiourée (2 au lieu de 3). L'évaluation des premiers lipides **11** et **12** a permis de valider ce nouveau modèle, *i.e.* de vérifier que la formulation de ces composés est possible et que leur tête leur confère une capacité d'interaction avec l'ADN.

#### a) Formulation

Au niveau de la solubilité, les lipides **11** et **12** présentent une hydrophobie importante, analogue au lipide DT3TU : ils ne se solubilisent ni dans l'éthanol ni dans l'acétone mais seulement dans le chloroforme. Pour former des liposomes, l'ajout d'un co-lipide s'avère nécessaire et nous avons choisi, par analogie avec la DT3TU, la DPPC et le Cholestérol couplé à un PEG de poids moléculaire 2000 (*ci-après* CholPEG<sub>2000</sub> par la suite). Différents essais de formulation ont été réalisés (Tableau 9). Une population homogène est obtenue après sonication pour les formulations **12**/DPPC 1/1, **11**/DPPC 1/2, **12**/DPPC 1/2, **11**/CholPEG<sub>2000</sub> 1/0,1 et **12**/CholPEG<sub>2000</sub> 1/0,1. Le lipide **12** semble présenter une plus grande facilité de formulation que le lipide **11** car il permet de former des liposomes avec une plus faible quantité de DPPC.

Formulation	Méthode	<u>11</u>	<u>12</u>
LPT/DPPC 1/1	Injection éthanolique ou film	échec	79 nm
LPT/DPPC 1/2	Injection éthanolique	107 nm	122 nm
LPT/CholPEG 1/0.1	Injection éthanolique	250 nm	150 nm

Tableau 9 : Formulations du premier modèle

### b) Complexes avec l'ADN

Ces formulations ont été incubées en présence d'ADN à différents ratio LPT/P. Nous avons étudié la formation de lipoplexes par la mesure de la taille des particules (Figure 39) et par un test de retard de migration électrophorétique (Figure 40).

Taille des complexes 11/CholPEG<sub>2000</sub>/ADN

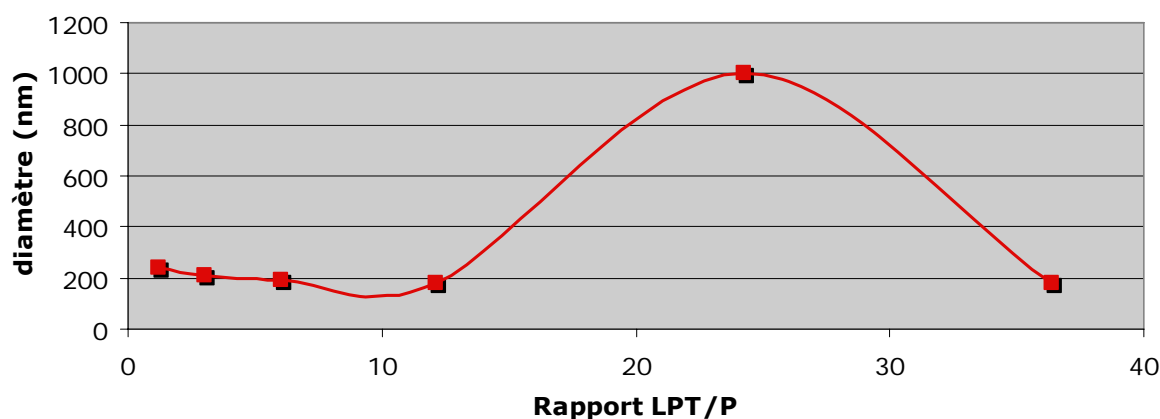


Figure 39 : Taille des complexes 11/CholPEG<sub>2000</sub>/ADN

Le diamètre des particules 11/CholPEG<sub>2000</sub> varie en présence d'ADN et cette fluctuation dépend de la quantité de lipopolythiourée. Cet type de diagramme a également été observé pour les autres formulations. Nous retrouvons une allure comparable à celui des lipides cationiques, avec deux zones de stabilité colloïdale, avant 15 LPT/P et après 30 LPT/P, où les particules ont un diamètre voisin de 200 nm. Entre ces deux valeurs, les complexes forment des agrégats de taille micrométrique.

Le test de retard électrophorétique nous permet de confirmer cette interaction pour les lipides 11/DPPC 1/2 et 12/DPPC 1/2 (Figure 40). À 3 LPT/P, les complexes formés ne retiennent que partiellement l'ADN, qui peut encore migrer dans le gel d'agarose. Il est totalement retardé à 7 LPT/P pour le lipide 12 et à 10 LPT/P pour le lipide 11. Ces deux lipides ont ainsi démontré leur capacité d'associer l'ADN assez fortement pour le retenir sur gel.

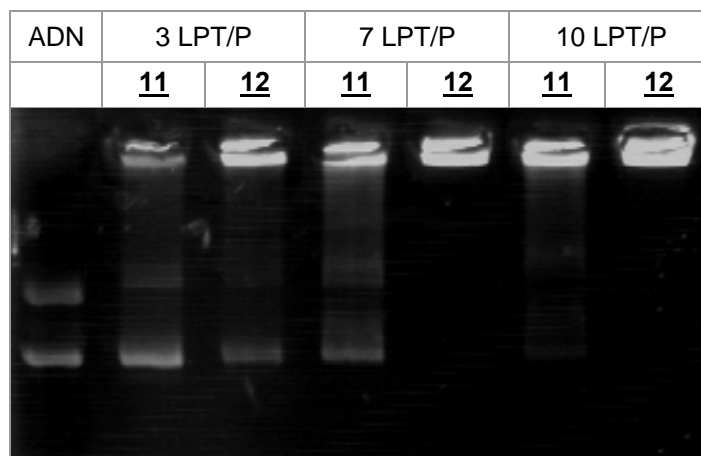


Figure 40 : Migration sur gel d'agarose de 11/DPPC 1/2 et 12/DPPC 1/2

Enfin, le Picogreen a été utilisé pour évaluer l'accessibilité de l'ADN dans ces complexes. Dans tous les cas, l'intensité de fluorescence représente 90% de la fluorescence du Picogreen en présence d'ADN libre. Ceci traduit que l'ADN reste accessible à l'intercalant, même s'il est associé aux lipopolythiourées, puisqu'il est retardé sur gel.

### c) Conclusion

Ces résultats prouvent que les lipides 11 et 12 présentent une hydrophobie persistante mais sont formulables avec l'aide d'un co-lipide, qui peut être la DPPC ou le CholPEG<sub>2000</sub>. Les liposomes alors formés sont capables d'induire une interaction avec l'ADN qui modifie le diamètre des particules et retient l'ADN sur gel. Ceci permet de confirmer que notre modèle de lipopolythiourées possédant une tête branchée à deux motifs thiourée est valide.

Par ailleurs, le lipide 12 qui comporte des terminaisons diol a montré une plus grande facilité de formulation, puisqu'il permet de réduire la quantité de DPPC nécessaire à la formation de particules homogènes. De plus, le test de retard électrophorétique révèle sa meilleure capacité à associer l'ADN, qui est retenu dès 7 LPT/P. Cette terminaison diol semble donc particulièrement intéressante, c'est pourquoi nous l'avons conservée pour la synthèse des vecteurs suivants (*cf.* III.C., p. 57).

## 2. Evaluation systématique des lipopolythiourées

Compte tenu des résultats précédents, une famille de lipopolythiourées a été synthétisée, comportant toutes une tête branchée à deux motifs thiourée, mais avec un espaceur, une terminaison et une ancre hydrophobe variables (*cf.* III.G, p.82). L'évaluation de ces lipides a d'abord eu pour but de dégager des structures plus actives que les autres. Pour cela, une étude systématique a été effectuée. Ce criblage s'est basé sur plusieurs critères :

- **La solubilité** des composés,
- **La facilité de formulation**, constatée par la nécessité d'un co-lipide et sa proportion,
- **La taille et l'homogénéité** des particules formées, caractérisées par le diamètre des particules et l'indice de polydispersité (PDI),
- **L'association avec l'ADN**, déterminée par test de retard électrophorétique,



- **La stabilité colloïdale** des complexes lipopolythiourée/ADN, identifiée par le diamètre des particules,
- **L'activité de transfection**, établie par les résultats de transfection *in vitro* après 48h d'incubation.

Les résultats sont présentés, par famille, dans le Tableau 10.

Famille	N°	Solubilité	Formulation	Diamètre des liposomes (nm)	PDI	LPT/P nécessaire à la rétention sur gel	Diamètre des complexes ADN/LPT	Activité de Transfection
Succinique	<u>25</u>	CHCl <sub>3</sub>	<u>25</u> /DPPC 1/1	97	0,222	10	332	non
	<u>43</u>	CHCl <sub>3</sub>	<u>43</u> /DPPC 1/2 <u>43</u> /DPPC 1/1	175 72	0,203 0,449	17 20	Précipité Précipité	non non
Diglycolique	<u>45</u>	CHCl <sub>3</sub>	<u>45</u> /DPPC/DODA /DOPErhod <sup>250</sup>	167	0,248	-	-	-
	<u>28</u>	EtOH	<u>28</u> /DPPC 1/1 <u>28</u> seul	177 88	0,248 0,161	5	84	oui
	<u>58</u>	EtOH	<u>58</u> seul	108	0,172	10	84	oui
	<u>56</u>	Acétone	<u>56</u> seul	97	0,100	30	115	non
	<u>57</u>	EtOH	<u>57</u> seul	68	0,163	10	174	oui
	<u>59</u>	EtOH	<u>59</u> seul	62	0,206	10	125	oui
PEG	<u>38</u>	CHCl <sub>3</sub>	<u>38</u> /DPPC 1/2	156	0,149	10	142	non
Lysine	<u>42</u>	EtOH	<u>42</u> /DPPC 1/1	91	0,264	5	164	oui
	<u>64</u>	EtOH	<u>64</u> /DPPC 1/1	109	0,236	10	122	oui
	<u>65</u>	EtOH	<u>65</u> /DPPC 1/1	95	0,193	20	96	oui
Cholestérol	<u>69</u>	EtOH	<u>69</u> seul	68	0,116	5	154	non
			<u>69/57</u> : 35/65	147	0,228	5	117	oui

Tableau 10 : Formulations des lipopolythiourées

<sup>250</sup> Cette formulation est une formulation fluorescente qui contient la DOPE-rhodamine et la DODAPEG<sub>2000</sub>, un lipide bicaténaire à 18 chaînons substitué par un PEG de poids moléculaire 2000. Peu de résultats sont disponibles sur cette lipopolythiourée, à cause du manque de reproductibilité constaté.

Nous pouvons sélectionner les lipopolythiourées à plusieurs niveaux :

### ➤ La formulation

Avec les différentes structures, nous avons réussi à améliorer la solubilité des lipides, à réduire la quantité de DPPC nécessaire à la formulation, voire à la supprimer. Nous pouvons mettre ces propriétés en relation avec le calcul du  $\log P^{251}$  qui reflète la balance hydrophile/hydrophobe des lipides (Figure 41) :

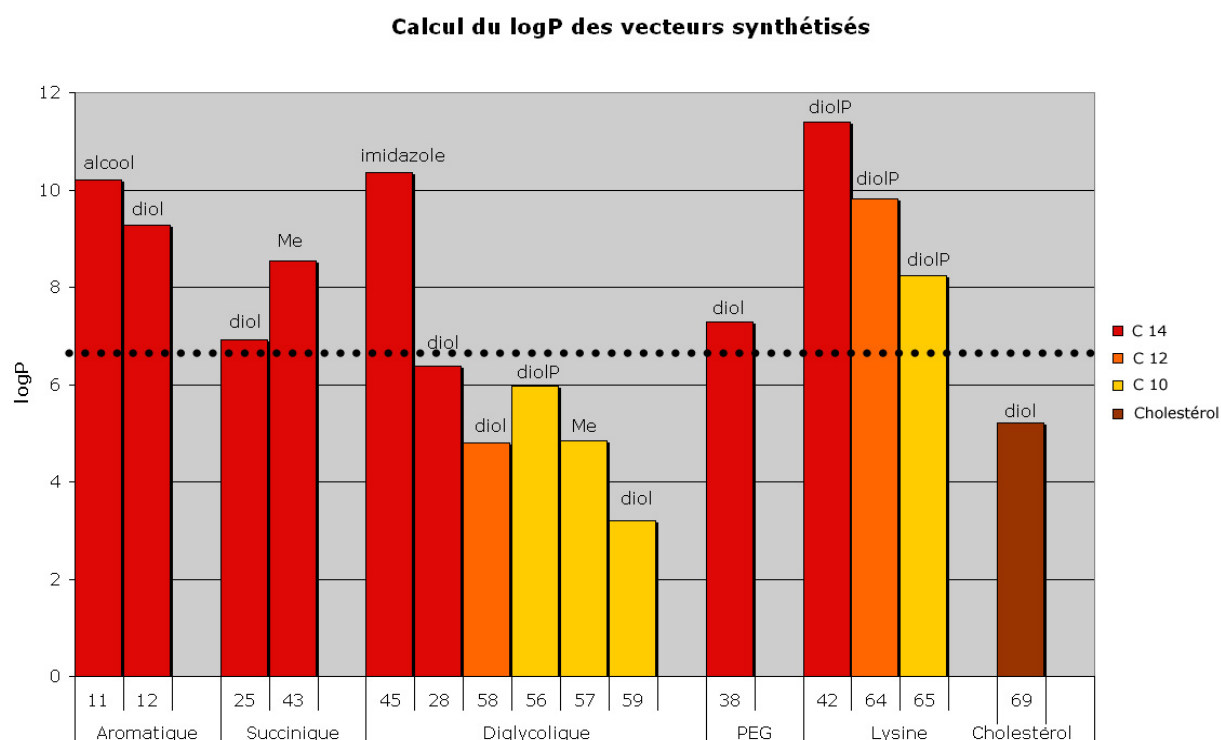


Figure 41 : Balance hydrophile/hydrophobe des lipopolythiourées

La facilité de formulation est manifestement reliée à la balance hydrophile/hydrophobe des composés puisqu'il se dégage un seuil, symbolisé par les pointillés noirs, qui différencie les lipides formulables seuls et ceux qui nécessitent l'adjonction d'un co-lipide comme la DPPC. Les lipopolythiourées de la famille diglycolique semblent particulièrement intéressants de ce point de vue.

### ➤ L'interaction avec l'ADN

Un exemple de gel est présenté sur la Figure 42.

<sup>251</sup> Effectué à l'aide du logiciel MarvinSketch®.

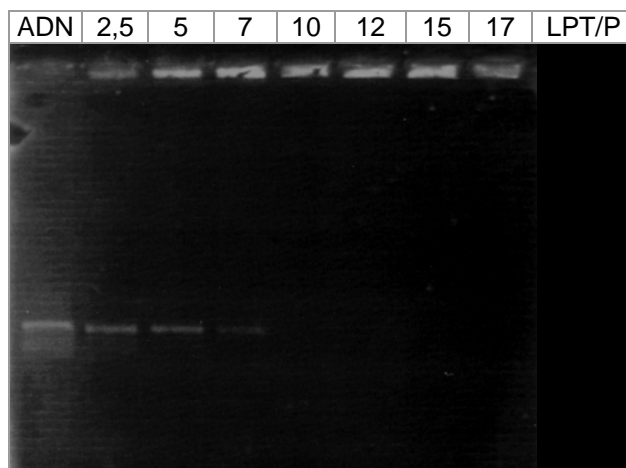


Figure 42 : Gel d'agarose de migration de l'ADN en fonction de la quantité de **38**/DPPC 1/2

Dans cet exemple, l'ADN est retardé dès 2,5 LPT/P, mais sa rétention n'est totale qu'à 10 LPT/P. Pour toutes les formulations testées, nous avons observé une rétention totale de l'ADN sur gel, mais à un rapport LPT/P variable. En outre, nous nous sommes intéressés aux complexes stables colloïdalement car une telle qualité est nécessaire à une injection systémique. C'est pourquoi nous avons écarté les lipopolythiourées **43** et **56**.

### ➤ L'activité de transfection

L'activité de transfection représente le principal critère d'efficacité d'un vecteur de gène. Certains lipides ne donnent aucune efficacité de transfection, quelle que soit la quantité utilisée. C'est le cas des lipopolythiourées **11**, **12** (famille aromatique), **25**, **39** (famille succinique), **41**, **56** (diglycolique à tête imidazole ou isopropylidène), **38** (famille PEG), **69** (famille cholestérol). Nous pouvions envisager que ces systèmes non cationiques aient une transfection plus faible, voire négligeable, à cause de l'absence d'interaction avec la membrane cellulaire anionique. Toutefois, deux familles se dégagent, la famille diglycolique, qui présente des avantages de formulation, et la famille lysine, formulée avec la DPPC. La facilité de formulation et la charge des complexes ne semblent donc pas être les seuls paramètres à prendre en compte pour expliquer l'activité biologique. Les relations structure/propriétés seront discutées dans le cinquième chapitre.

### 3. Automatisation de la formulation

Au vu du grand nombre de lipides à tester, nous avons voulu mettre au point un processus semi-automatisé. Des essais de ce type ont été rapportés par l'équipe de Massing, qui a développé une méthode de synthèse parallèle sur phase solide<sup>252</sup> couplée à un robot de pipetage capable de réaliser la formulation et la transfection sur plaque 96 puits.<sup>253</sup> Nous avons, pour notre part, utilisé un robot de synthèse parallèle. Cet appareil est en effet capable d'injecter, d'agiter, de chauffer et d'évaporer 64 réacteurs en même temps. Ceci peut être utile pour des essais d'optimisation des formulations (ajout de lipides fluorescents, variation des

<sup>252</sup> Lenssen K., Jantschkeff P., von Kiedrowski G., Massing U. (2002) Combinatorial synthesis of new cationic lipids and high-throughput screening of their transfection properties, *ChemBioChem*, 3, 852-858.

<sup>253</sup> Regelin A., Fernholz E., Krug H., Massing U. (2001) High Throughput screening method for identification of new lipofection reagents, *J. Biomol. Screening*, 6, 4, 245-254.

co-lipides et de leur proportion). Pour cela, nous avons réalisé un programme qui retrace les étapes d'une injection éthanolique (Tableau 11), et nous avons comparé les tailles des liposomes à des injections réalisées « à la main ».

Etape	Description
<b>Rinçage</b>	Rinçage préalable de toutes les seringues utilisées lors du programme
<b>Ajout d'eau</b>	Le robot dispose 5 mL d'eau dans chacun des réacteurs
<b>Vortex</b>	L'agitation est mise en route pour créer un vortex
<b>Injection du lipide</b>	Chaque lipide, solubilisé dans 500 $\mu$ L d'éthanol, est additionné goutte à goutte
<b>Agitation</b>	L'agitation forte est maintenue toute la nuit, la température est réglée à 20°C
<b>Evaporation</b>	Le milieu est concentré doucement (vide progressif sans chauffage)
<b>Vidange</b>	Le milieu concentré est remplacé dans un flacon de réception

Tableau 11 : Etapes du programme de formulation automatisée

Un essai a été réalisé avec **59**/DPPC 1/1. Le protocole d'évaporation du robot ne fut pas assez efficace. Il aurait été nécessaire de chauffer pour concentrer le mélange, ce qui aurait pu perturber l'association des lipides. Nous avons donc évaporé les formulations sur un évaporateur rotatif, de façon classique. La comparaison des tailles des particules **59**/DPPC 1/1, formulées automatiquement ou classiquement, montre que les liposomes formés par le robot sans sonication ni filtration sont de taille inférieure à ceux que l'on obtient par une méthode classique (74 nm vs. 101 nm). Ceci peut être dû à la meilleure agitation créée par le vortex du robot. Après complexation de l'ADN à 20 LPT/P, les complexes retiennent de façon identique l'ADN sur gel d'agarose.

En bref, nous pouvons dire que la formulation automatisée est tout à fait réalisable sur un robot du type Chemspeed. Une mise au point des conditions d'évaporation est nécessaire pour permettre un gain de temps réel sur une formulation classique car c'est l'étape qui demande le plus d'attention de la part de l'expérimentateur. Néanmoins, nous obtenons des particules de petite taille, sans sonication ni filtration, et qui possèdent les mêmes propriétés d'interaction avec l'ADN que leur analogues formulés classiquement.

Après cette première évaluation générale des lipopolythiourées, nous avons envisagé des études biophysiques, puis biologiques sur les familles diglycolique et lysine (composés **28**, **57**, **58**, **59**, **45**, **64**, **65**) qui présentent les meilleures activités de transfection.

## C. Etudes biophysiques

Les études biophysiques ont eu pour but d'apporter des éléments de compréhension sur les complexes lipopolythiourée/ADN. Nous avons étudié l'accessibilité de l'ADN, la morphologie des complexes et le dichroïsme circulaire de l'ADN sur les lipopolythiourées des familles diglycolique et lysine.

### 1. Accessibilité de l'ADN

L'accessibilité de l'ADN est évaluée par l'utilisation du Picogreen, qui fluoresce lorsqu'il est intercalé entre les bases de l'ADN. Si le plasmide est associé assez intimement au lipide, le picogreen n'a pas accès à l'ADN et l'intensité de fluorescence mesurée est faible. Ces mesures ont été réalisées sur l'ensemble des famille diglycolique et lysine, avec des quantités croissantes de lipide (Figure 43).

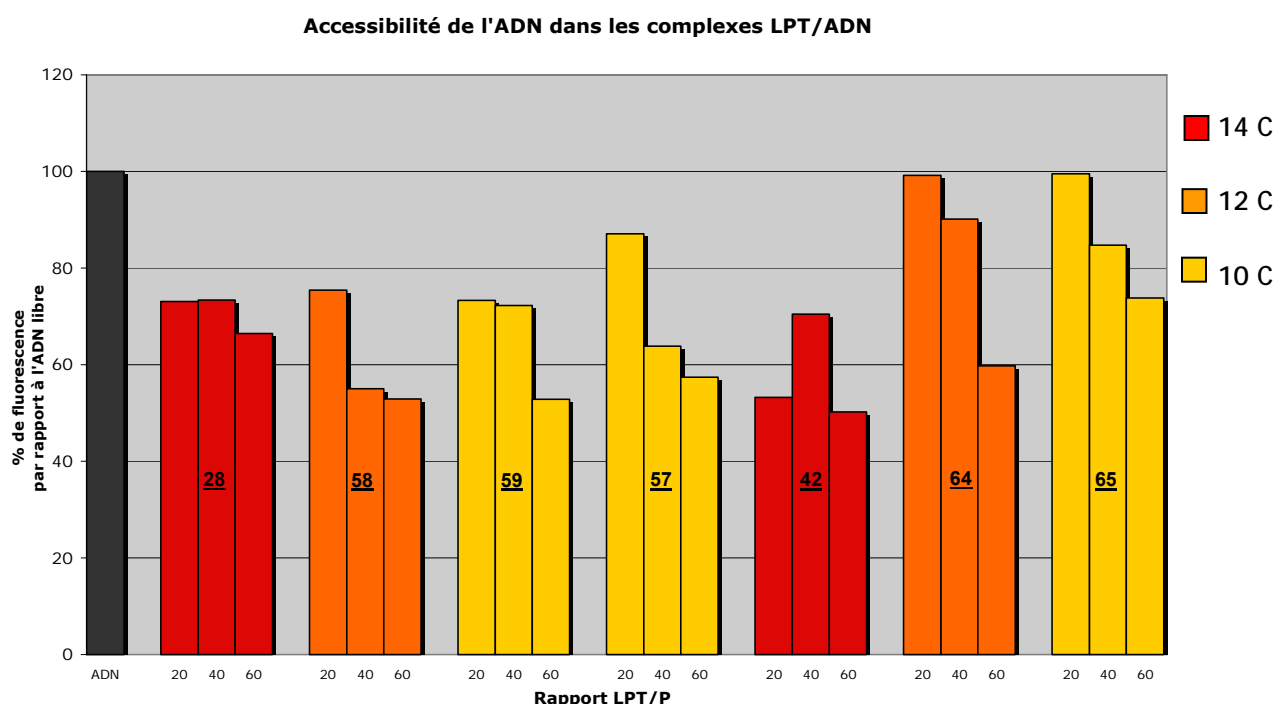


Figure 43 : Accessibilité de l'ADN dans les complexes LPT/ADN de la famille diglycolique et lysine

Ces résultats montrent, d'une part, l'effet de la quantité de lipide sur l'accessibilité de l'ADN. L'intensité de fluorescence faiblit lorsque le rapport LPT/P augmente, pour toutes les lipopolythiourées, mis à part **57** mais ce dernier a montré des problèmes de reproductibilité. Cette observation signifie que l'excès de lipide réduit l'accessibilité de l'ADN et confirme donc l'association des lipopolythiourées aux plasmides. D'autre part, l'intensité de fluorescence est toujours supérieure à 50% (pour le lipide **42**, à 60 LPT/P), bien que les complexes soient, à ces rapports LPT/P, retenus sur gel. Deux hypothèses sont envisageables :

- L'interaction entre le picogreen et l'ADN permet de déplacer les thiourées et de dissocier les complexes,
- L'ADN reste accessible au sein des complexes lipopolythiourée/ADN : il peut par exemple être localisé en surface des particules. Cette hypothèse peut être rapprochée

de la fluorescence, observée dans les puits de gel d'agarose, qui signale aussi l'accessibilité de l'ADN (Figure 42).

## 2. Morphologie des complexes lipopolythiourée/ADN

Afin d'étudier la morphologie des complexes lipopolythiourée/ADN et de confirmer leur taille, nous avons observé les particules à base de lipopolythiourées par microscopie électronique à transmission. L'ensemble des complexes formés par les lipopolythiourées des familles lysine et diglycolique ont été observés mais les particules sont généralement peu contrastées par l'acétate d'uranyle. Nous avons choisi de montrer un exemple d'image pour les complexes constitués du lipide **58**.

Les liposomes de **58** sont difficiles à observer car ils sont peu contrastés par l'acétate d'uranyle. Le lipide **58** apparaît comme un lipide amorphe, ce qui pourrait être un effet du dépôt et de la déshydratation sur la grille de carbone/formvar, puisque les mesures de diffusion de lumière donnent une taille homogène ( $PDI < 0,2$ ). En revanche, en présence d'ADN, les complexes sont homogènes et semblent avoir une organisation multilamellaire en pelote (Figure 44). A l'observation, cette organisation paraît tridimensionnelle mais nous avons eu des difficultés à obtenir des clichés nets.

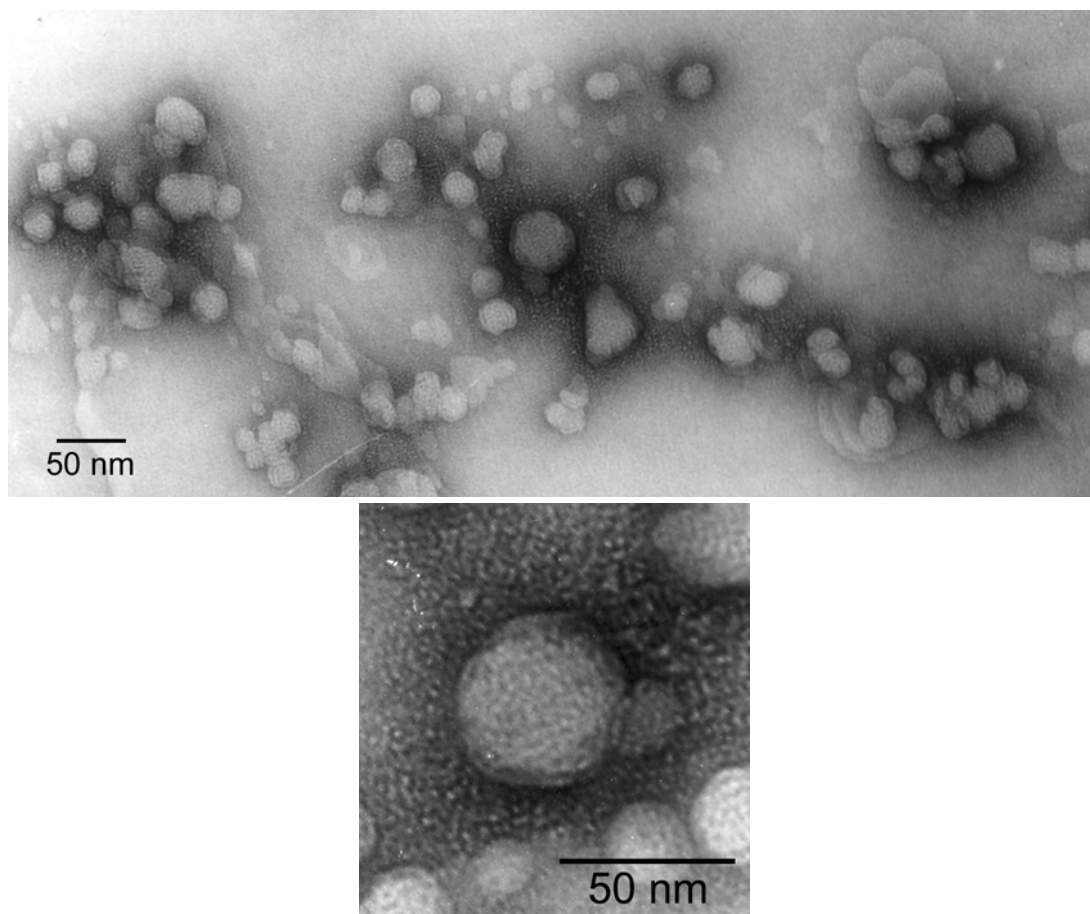


Figure 44 : Photographies des complexes **58**/ADN au rapport 20 LPT/P au microscope électronique à transmission (contrastant : acétate d'uranyle)

Ces photos permettent, par ailleurs, d'évaluer le diamètre des particules, compris entre 15 nm pour les plus petits et 50 nm pour les plus gros objets. Cette valeur est plus faible que celle obtenue par diffusion de lumière car nous n'observons pas le diamètre hydrodynamique mais le diamètre réel des particules.

### 3. Conformation de l'ADN

Le dichroïsme circulaire a été utilisé pour caractériser l'interaction entre les lipides et l'ADN. Cette technique consiste à mesurer la différence d'absorption d'un milieu entre les polarisations gauche et droite de la lumière. Il se traduit par un coefficient moyen d'ellipticité molaire, exprimé en  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . Ce phénomène est particulièrement sensible à la position des atomes dans les molécules et permet de connaître la conformation de macromolécules comme les protéines<sup>254</sup> ou l'ADN.<sup>255</sup>

L'ADN peut adopter plusieurs structures secondaires (formes B et C, entre autres) qui correspondent à des spectres différents (Figure 45). Lorsque le plasmide est sous forme superenroulée, l'ADN est dans une conformation appelée B, caractérisée par une bande négative à 245 nm et une bande positive à 270 nm.<sup>256</sup> Les modifications de ces bandes traduisent une différence d'ellipticité de l'ADN et, par conséquent, une modification de sa structure hélicoïdale.

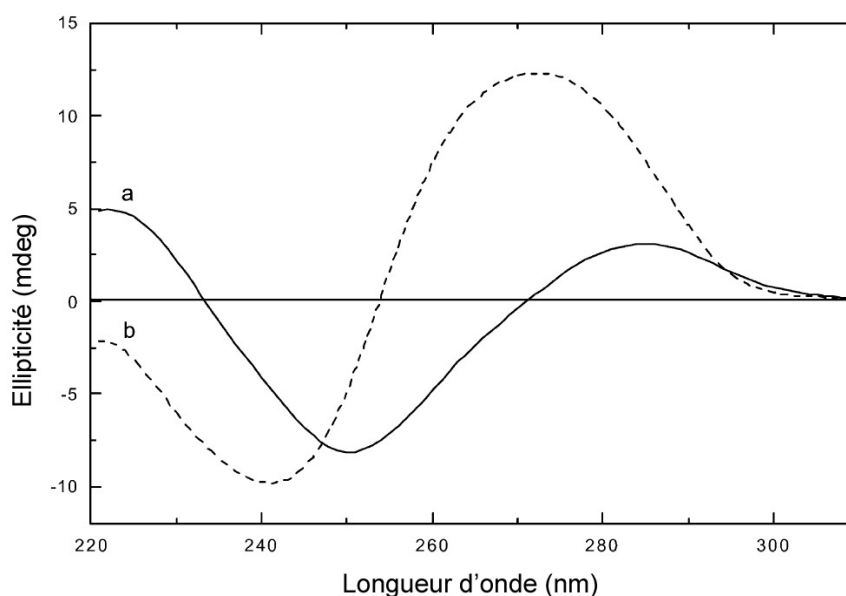


Figure 45 : Dichroïsme circulaire d'un plasmide superenroulé dans l'eau :<sup>257</sup> forme C (a) et forme B (b)

<sup>254</sup> Greenfield N. J. (2004) Circular dichroism analysis for protein-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, 261, 55-78.

<sup>255</sup> Hanlon S. Brudno S., Wu T. T., Wolf B. (1975) Structural transition of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solution. I. Reference spectra of conformational limits, *Biochemistry*, 14, 8, 1648-1660.

<sup>256</sup> Serban D., Benevides J. M., Thomas G. J. (2002) DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in *Escherichia coli* plasmid pUC19, *Biochemistry*, 41, 847-853.

<sup>257</sup> Zhang Z., Huang W., Tang J., Wang E., Dong S. (2002) Conformational transition of DNA induced by cationic lipid vesicle in acidic solution : spectroscopy investigation, *Biophys. Chem.*, 97, 7-16.



### a) Interaction de l'ADN avec les lipides cationiques

Prenons par exemple le cas d'un lipide cationique comme le DOTAP. L'addition du lipide (Figure 46) entraîne, d'une part, une diminution de la hauteur de la bande positive à 270 nm ainsi qu'un décalage vers les longueurs d'ondes plus grandes,<sup>258</sup> d'autre part, une plus faible variation de l'ellipticité de la bande à 245 nm et un léger décalage vers le rouge.<sup>259</sup> Ces résultats peuvent varier légèrement en fonction du ratio +/-, du lipide cationique utilisé ou de la présence de co-lipide.<sup>260</sup> Ces modifications sont attribuées à une structure plus condensée de l'ADN, toujours sous forme B, due à l'interaction électrostatique avec le lipide cationique.<sup>247</sup>

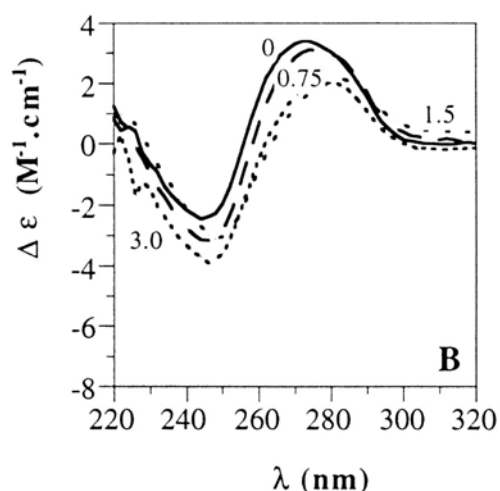


Figure 46 : Dichroïsme circulaire de l'ADN en présence d'une quantité croissante de DOTAP<sup>260</sup> (les nombres représentent le ratio +/-)

Cette méthode traduit donc l'interaction qui existe entre l'ADN et les lipides cationiques. Puisque les lipopolythiourées s'associent à l'ADN, *a priori* par des liaisons hydrogène, il nous a semblé intéressant d'étudier comment se manifeste cette interaction sur le dichroïsme de l'ADN.

### b) Interaction de l'ADN avec les lipopolythiourées

Nous avons donc réalisé les mesures du dichroïsme circulaire de l'ADN plasmidique dans l'eau, puis en présence d'une quantité croissante de lipopolythiourée **59** (Figure 47).

<sup>258</sup> Zuidam N. J., Barenholz Y., Minsky A. (1999) Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposomes assemblies, *FEBS Letters*, 457, 419-422.

<sup>259</sup> Prasad T. K., Gopal V., Rao N. M. (2003) Structural changes in DNA mediated by cationic lipids alter in vitro transcriptional activity at low charge ratios, *Biochim. Biophys. Acta*, 1619, 59-69.

<sup>260</sup> Zuidam N. J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y. (1999) Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation lipoplexes affect transfection efficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, 1419, 207-220.

### Dichroïsme circulaire des complexes 59/ADN

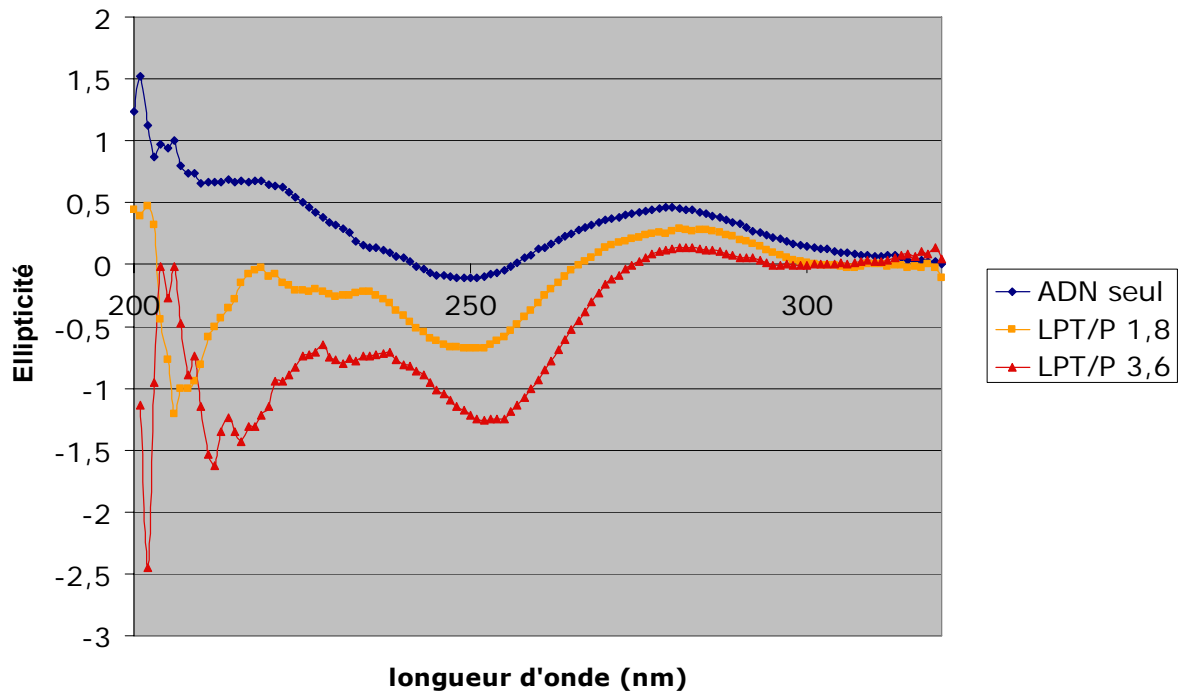


Figure 47 : Dichroïsme circulaire des complexes **59**/ADN

Le spectre du plasmide seul comporte les bandes négatives à 250 nm et positives à 270 nm, caractéristiques de la forme B de l'ADN.<sup>261</sup> L'ajout de **59** provoque une augmentation de l'ellipticité négative à 245 nm et une diminution de l'intensité de la bande à 270 nm. De plus, ces deux bandes sont légèrement décalées vers le rouge. Ceci nous permet de confirmer qu'il existe une réelle interaction entre les lipopolythiourées et le plasmide, ceci pour des rapports assez faibles de LPT/P. Ce type de modifications a déjà été observé pour d'autres systèmes cationiques tels que le PEI,<sup>262</sup> des surfactants de type gemini,<sup>263</sup> des lipitoïdes<sup>264</sup> ou le dendrimère PAMAM.<sup>265</sup> Cette interaction ne modifie pas l'allure du spectre : l'ADN reste probablement majoritairement sous forme B, mais il faudrait pour le confirmer une autre analyse structurale, telle que l'infra-rouge.<sup>247</sup>

#### 4. Protection de l'ADN par les complexes

Nous avons montré que les lipopolythiourées sont capables de former des complexes homogènes, de petite taille, avec l'ADN. Mais les vecteurs doivent aussi protéger l'ADN lors de son trajet extracellulaire, en particulier contre sa dégradation par les composants du sérum.

<sup>261</sup> Les intensités observées sont légèrement plus faibles que celles de la référence, cela pourrait être dû à un mélange de formes B et C du plasmide, mais la technique utilisée n'a pas permis de le déterminer.

<sup>262</sup> Choosakoonkriang S., Lobo B. A., Koe G. S., Middaugh R. (2002) Biophysical characterization of PEI/DNA complexes, *J. Pharm. Sci.*, 92, 8, 1710-1722.

<sup>263</sup> Bombelli C., Faggioli F., Luciani P., Mancini G., Sacco M-G. (2005) Efficient transfection of DNA by liposomes formulated with cationic gemini amphiphiles, *J. Med. Chem.*, 48, 16, 5378-5382.

<sup>264</sup> Lobo B. A., Vetro J., Suichi D. M., Zuckermann R. N., Middaugh C. R. (2002) Structure/function analysis of peptoid/lipitoid :DNA complexes, *J. Pharm. Sci.*, 92, 9, 1905-1918.

<sup>265</sup> Braun C. S., Vetro J. A., Tomalia D. A., Koe G. S., Koe J. G., Middaugh C. R. (2005) Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles, *J. Pharm. Sci.*, 94, 2, 423-436.

Pour évaluer cette capacité, les complexes ont été incubés à 37°C dans un milieu de culture contenant 10% de sérum. Les complexes ont ensuite été traités par un détergent et déposés sur gel.<sup>266</sup> Les résultats des familles diglycolique et lysine sont présentés sur la Figure 48 et la Figure 49.

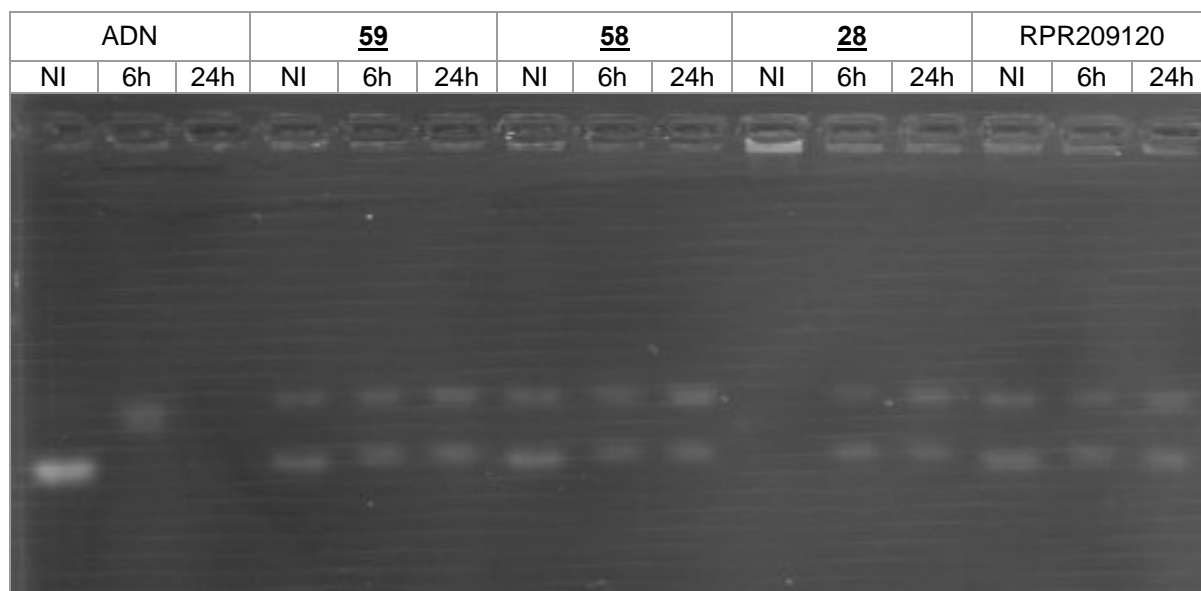


Figure 48 : Stabilité des complexes de la famille diglycolique dans 10% de sérum<sup>267</sup> (NI = non incubé)

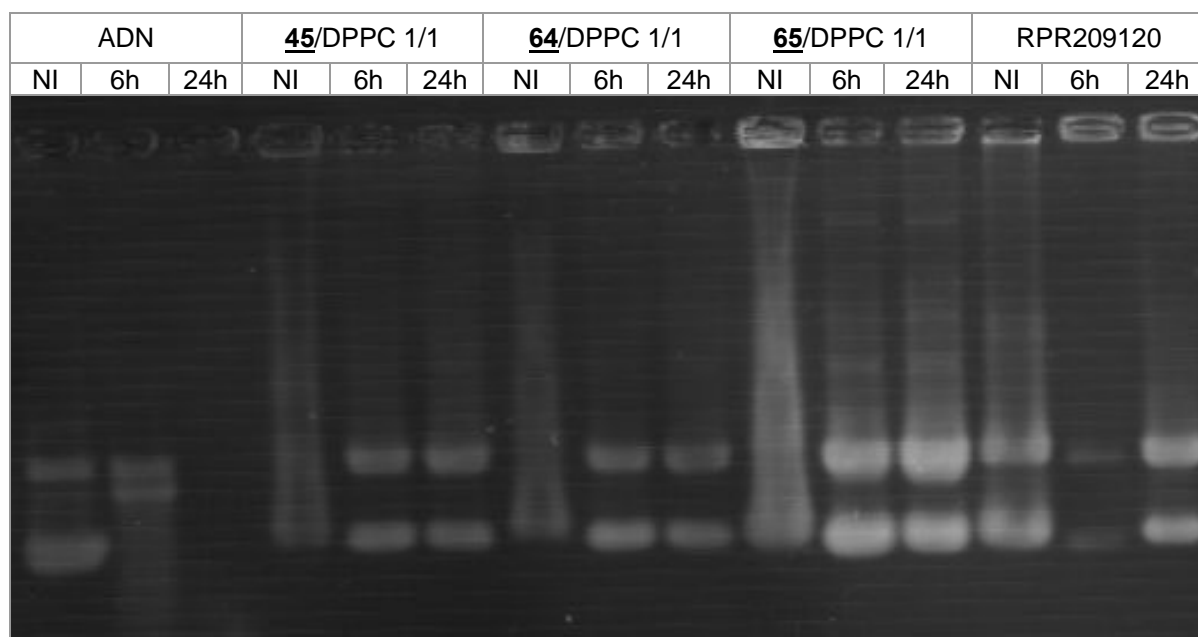


Figure 49 : Stabilité des complexes de la famille lysine dans 10% de sérum<sup>267</sup> (NI = non incubé)

L'ADN, en présence de 10% de sérum, est partiellement dégradé en 6h et totalement en 24h, probablement à cause de la présence de DNases dans le milieu de culture. En revanche, deux bandes sont observées au niveau de l'ADN dans tous les complexes

<sup>266</sup> Adami R., C., Collard W. T., Gupta S. A., Kwok K. Y., Bonadio J., Rice K. G. (1998) Stability of peptid-condensed DNA formulations, *J. Pharm. Sci.*, 87, 6, 678-683.

<sup>267</sup> Tous les complexes TU/ADN ont un rapport de 20 TU/P, NI = non incubé

lipopolythiourée/ADN, au même titre que les complexes non incubés (NI). Cela signifie que le plasmide est toujours présent dans les complexes, sous forme superenroulée et circulaire (bande au-dessus). Les complexes montrent la même capacité à protéger le plasmide que la lipopolyamine RPR 209120,<sup>268</sup> prise comme contrôle positif.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la libération de l'ADN par les complexes **59**/ADN, en fonction du temps et de la température (Figure 50).

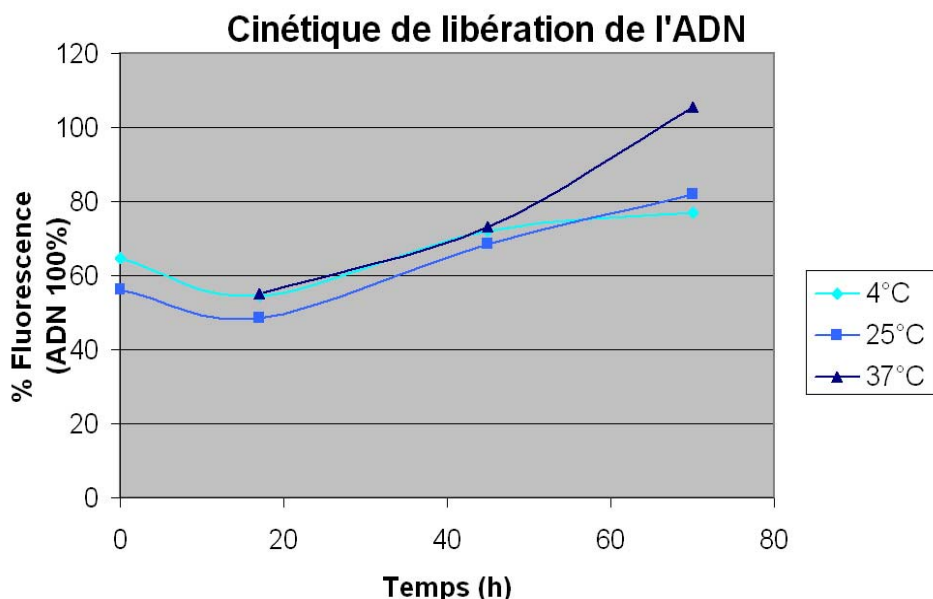


Figure 50 : Libération de l'ADN des complexes **59**/ADN

Nous avons considéré l'ADN libéré lorsque l'intensité de fluorescence est égale à 100%, ce qui correspond au signal du picogreen lorsqu'il est en présence d'ADN libre. Sur la Figure 50, l'intensité de fluorescence ne dépasse 100% qu'après 72h à 37°C, ce qui montre que l'ADN reste associé aux complexes de lipopolythiourée **59** pendant cette période et davantage à des températures plus basses. Les complexes semblent donc relativement stables pendant 48h à 37°C.

## D. Evaluation in vitro

### 1. Efficacité de transfection

#### a) Influence de la quantité de lipopolythiourées

Les lipopolythiourées des familles lysine et diglycolique ont permis d'obtenir une activité de transfection sur des cellules B16 après 48h d'incubation (Figure 51, Figure 52 et Figure 53). Ces essais ont été répétés trois fois et donnent des résultats comparables. Nous présentons ici une expérience représentative, chaque mesure est la moyenne de trois puits.

<sup>268</sup> Sur la figure 40, la faible intensité du puits de RPR 209120 après 6h d'incubation est due à la perforation du puits du gel.

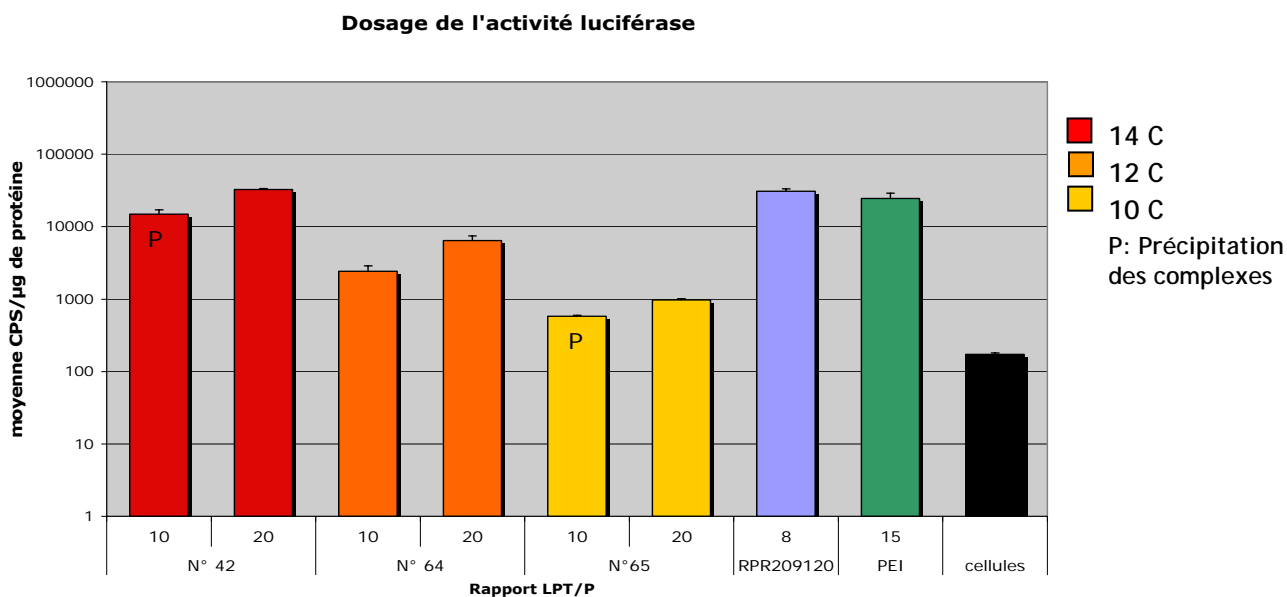


Figure 51 : Efficacité de transfection de la famille lysine en fonction de la quantité de lipopolythiourée (LPT/P) par rapport au RPR209120 (RC=8) et au PEI (RC=15)

Les composés **42**, **64** et **65** montrent une activité luciférase, supérieure aux cellules non traitées, qui augmente avec la quantité de lipide utilisée (LPT/P). Cette transfection n'est pas reliée à la précipitation des complexes, puisque les particules colloïdalement stables sont plus actives que celles précipitées. Par ailleurs, la lipopolythiourée **42** semble particulièrement intéressante puisqu'elle a une efficacité du même ordre que le lipide cationique RPR209120 ou que le PEI linéaire dans les mêmes conditions.<sup>269</sup>

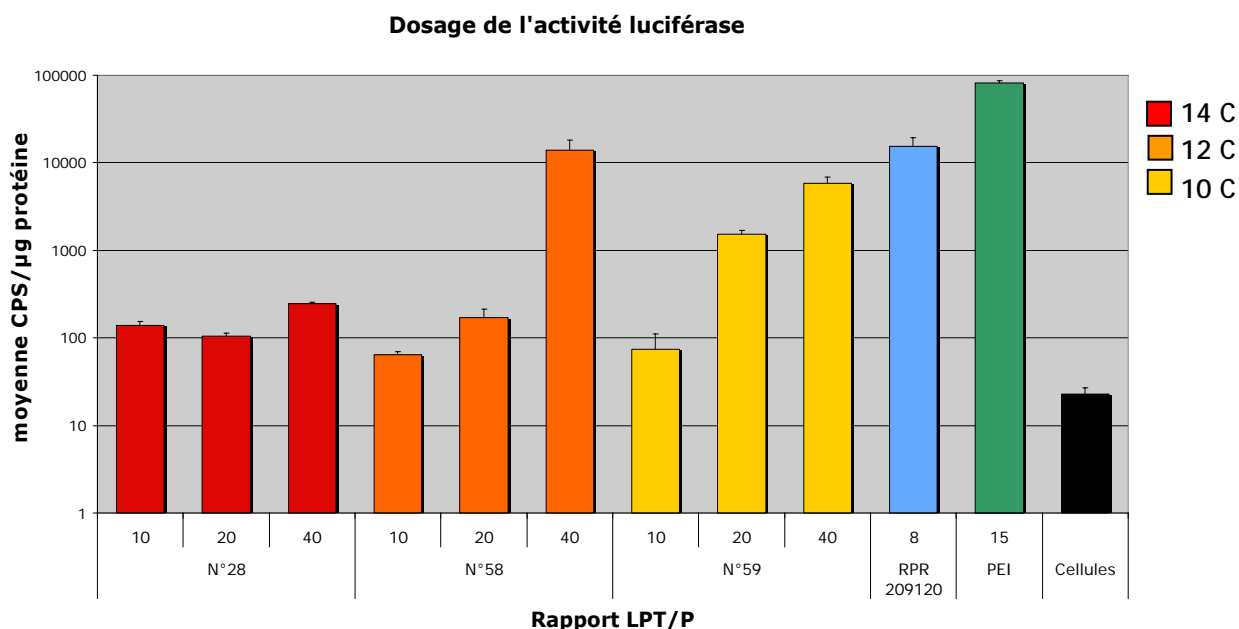


Figure 52 : Efficacité de transfection des lipopolythiourées **28**, **58** et **59** en fonction de la quantité de lipopolythiourée (LPT/P) par rapport au RPR209120 (RC=8) et au PEI (RC=15)

<sup>269</sup> Pour une meilleure comparaison, nous avons choisi des conditions où RPR 209120 (ratio +/- 8) et le PEI (25k, linéaire, dans 5% de glucose) ne sont pas précipités. Précipités ou en absence de sérum, ils ont généralement une meilleure efficacité de transfection.

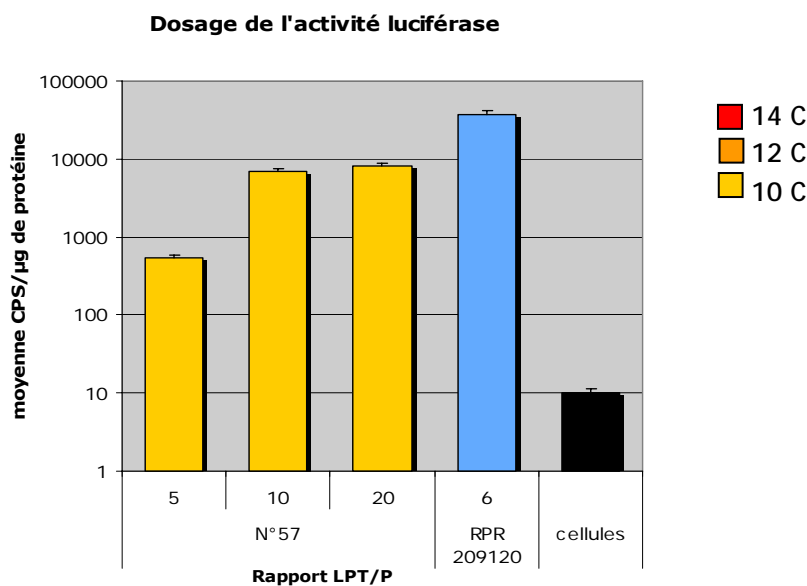


Figure 53 : Efficacité de transfection de la lipopolythiourée 57 par rapport au RPR209120 (RC=6)

Les lipopolythiourées 28, 57, 58, 59 possèdent également une capacité de transfection *in vitro*. Cette activité est améliorée lorsque la quantité de lipide augmente et elle est particulièrement intéressante dans le cas des lipopolythiourées 57, 58 et 59 puisque la transfection est 10 à 100 fois supérieure au lipide 28.

### b) Influence du temps d'incubation

Afin d'optimiser les conditions de transfection, nous avons étudié l'influence du temps d'incubation sur les cellules B16 (Figure 54).

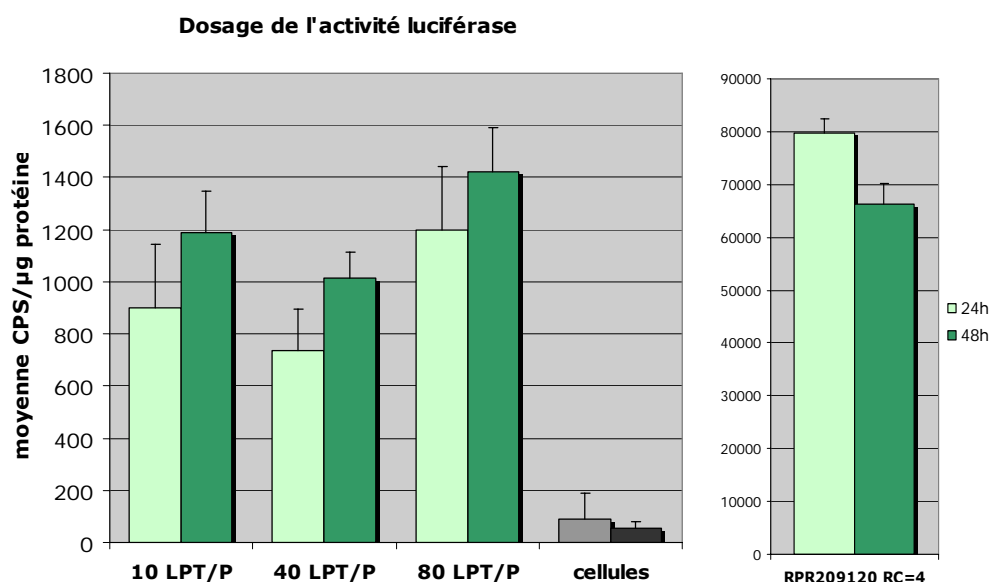


Figure 54 : Transfection des complexes 59/ADN en 24h et 48h<sup>270</sup>

<sup>270</sup> Le rapport 20 TU/P n'a pas été représenté car il correspond à une zone de précipitation du complexe.

Il apparaît clairement qu'une incubation de 48h permet d'améliorer l'activité de transfection de **59** en moyenne de 30%. Ce phénomène n'est pas observé pour la lipopolyamine RPR 209120, qui atteint en 24h son maximum d'efficacité. La charge cationique de cette dernière entraîne probablement l'internalisation rapide des complexes.

Finalement, ces résultats montrent que les lipopolythiourées, en particulier les composés **42**, **57**, **58** et **59**, sont capables de transférer des cellules *in vitro*, malgré leur absence de charges positives, à partir d'un rapport 10 LPT/P. Nous avons, par ailleurs, étudié la capacité de transfection des lipopolythiourées sur d'autres types cellulaires, notamment les cellules humaines Eahy. Une activité de transfection a été observée lors d'expériences préliminaires, qui doit encore être confirmée. Néanmoins, ceci nous a encouragés à poursuivre en ce sens, notamment en réalisant des expériences de ciblage.

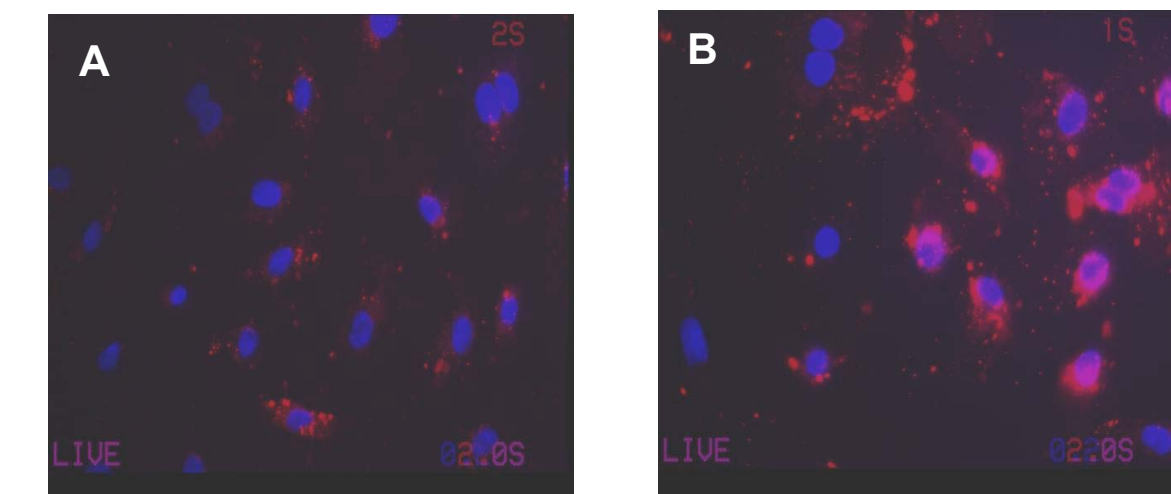
## 2. Etudes de ciblage

Les lipopolythiourées, de par leur absence de charge, n'ont pas une forte interaction avec les membranes cellulaires *a priori*. Il est possible d'améliorer cette interaction par l'utilisation d'éléments de ciblage. Nous avons choisi le modèle de l'endothélium tumoral, dans lequel les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont surexprimées et peuvent être ciblées par l'utilisation de peptides, de séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD),<sup>271</sup> qui possèdent une forte affinité pour ce récepteur.

### a) Internalisation spécifique

L'absence d'activité de transfection observée sur les lipopolythiourées des familles aromatique, succinique et PEG pourrait provenir du manque d'interaction des complexes avec les membranes biologiques. L'ajout d'un motif RGD pourrait améliorer cette interaction. Pour vérifier cela, nous avons comparé l'internalisation des complexes à base des lipopolythiourées **11**, **12** et **38**, sur des cellules HUVEC naturellement riches en intégrines  $\alpha_v\beta_3$  (

Figure 55). Les complexes sont marqués à la rhodamine (en rouge) et les noyaux au DAPI (en bleu).



<sup>271</sup> Chen X., Plasencia C., Hou Y., Neamati N. (2004) Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD-peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery, *J. Med. Chem.*, 48, 4, 1098-1106.

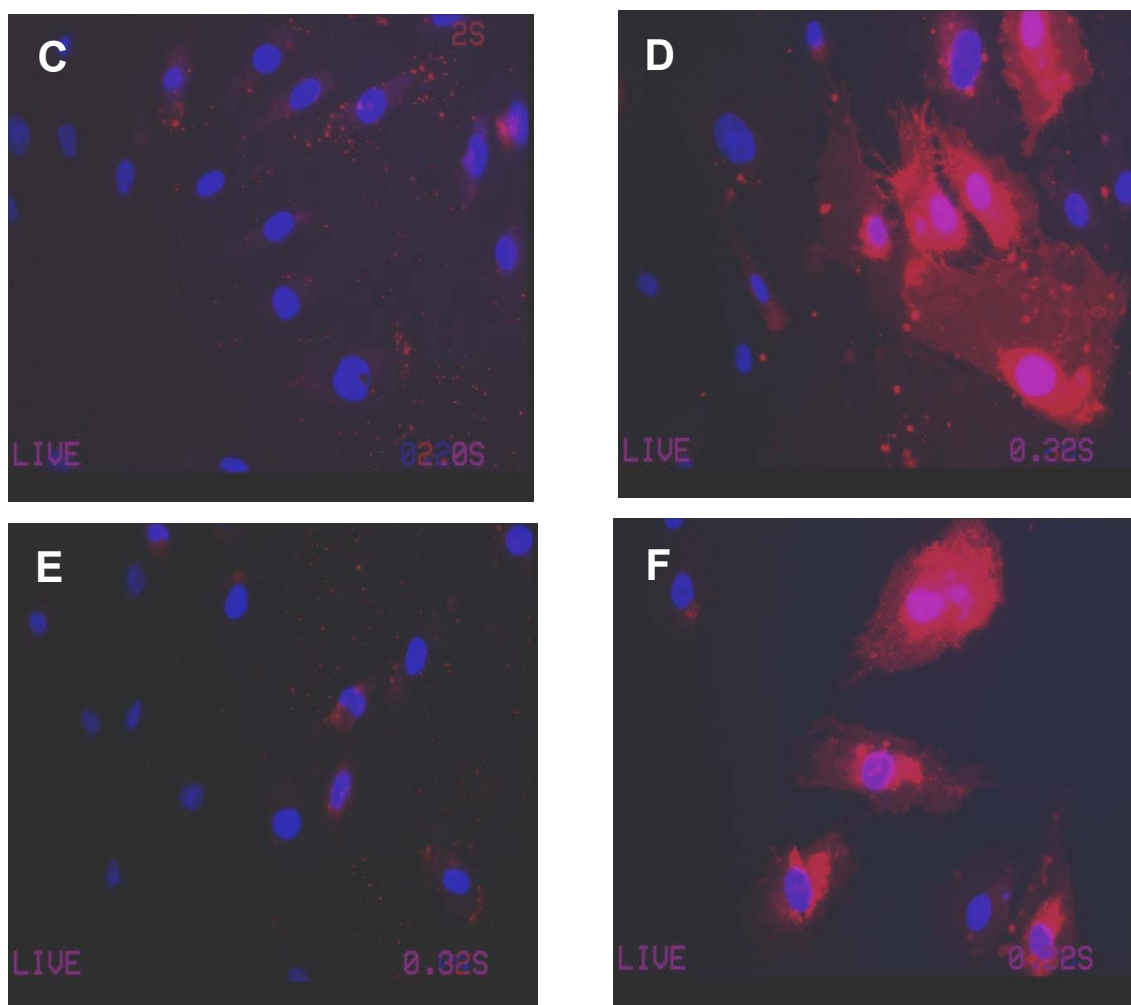


Figure 55 : Internalisation des complexes LPT/ADN avec ou sans élément de ciblage

- A** : **11**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN<sup>272</sup>  
**B** : **11**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub>RGD<sub>4C</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN  
**C** : **12**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN  
**D** : **12**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub> RGD<sub>4C</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN  
**E** : **38**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN  
**F** : **38**/DPPC/DODAPEG<sub>2000</sub>/DOPE<sub>Rhod</sub>/CholPEG<sub>5000</sub>RGD<sub>4C</sub> 1/1/0,1/0,05/0,1 + ADN

En absence d'élément de ciblage, très peu de complexes ont adhéré ou pénétré les cellules (photos de gauche, A, C, E). En revanche, les complexes comportant un élément de ciblage sont observés, sous la forme de vésicules rouges, en grande quantité à la surface des cellules et à proximité du noyau (photos de droite, B, D, F). La présence du CholPEG<sub>5000</sub>RGD<sub>4C</sub> dans la formulation semble responsable de cette internalisation spécifique. Cependant, ce phénomène n'est pas suffisant puisqu'aucune activité de transfection n'a été détectée. Ces résultats confirment que les lipopolythiourées **11**, **12** et **38** n'ont qu'une faible interaction avec

<sup>272</sup> DODA-PEG<sub>2000</sub> est un lipide bicaténaire à 18 carbones sur lequel est couplé un PEG de poids moléculaire 2000.



les membranes des cellules, mais que cette interaction peut être améliorée avec un élément de ciblage adapté au tissu cible.

### b) Transfection ciblée

Nous avons ensuite considéré des lipopolythiourées actives biologiquement et étudié l'influence de l'ajout d'un élément de ciblage sur leur activité de transfection. Pour cela, la lipopolythiourée **57** a été formulée avec un Cholestérol-PEG<sub>2000</sub>-RGD<sub>2C</sub> ou un Cholestérol-PEG<sub>2000</sub>-RAD<sub>2C</sub> (témoin négatif) en quantité égale à 1% ou 5% des lipopolythiourées. La transfection a été réalisée sur les cellules Eahy<sup>273</sup> (Figure 56).

#### Dosage de l'activité luciférase

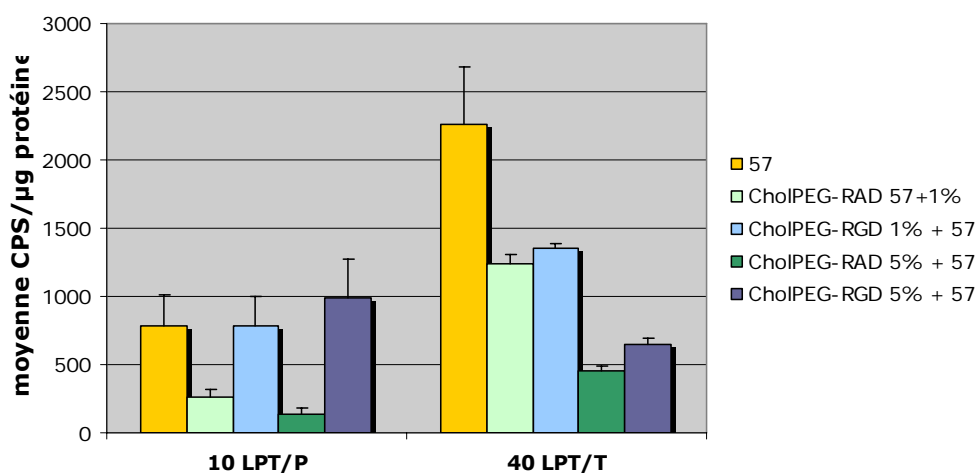


Figure 56 : Transfection spécifique des complexes **57**/ADN ciblés

L'efficacité transfection est diminuée de plus de 10 fois en présence du Cholestérol-PEG<sub>2000</sub>-RAD<sub>2C</sub>, aussi bien à 1% qu'à 5%. Ceci peut s'expliquer par la présence du motif PEG<sub>2000</sub>, connu pour inhiber l'interaction des complexes avec les cellules, et du motif RAD, qui n'a pas d'affinité pour les intégrines. En revanche, cette activité est restaurée en présence de 1% de Cholestérol-PEG<sub>2000</sub>-RGD<sub>2C</sub>, ce qui montre que le ciblage est efficace et spécifique. Cette efficacité semble augmenter avec la quantité d'élément de ciblage (de 1% à 5%) mais le ciblage paraît moins actif lorsque la quantité de lipide est importante (à 40 LPT/P notamment). Si ces paramètres restent à optimiser, ces résultats montrent que cette stratégie de ciblage est adaptée au type cellulaire et permet d'améliorer la transfection des lipopolythiourées.

### 3. Toxicité in vitro

#### a) Toxicité sur les cellules B16

Les mesures de toxicité ont été réalisées par un test colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5)-diméthylthiazol-2-yl-2,5-diphényl tétrazolium), sur des cellules B16. En présence des lipopolythiourées sous forme de liposomes, les résultats ont manqué de reproductibilité et

<sup>273</sup> Les cellules Eahy sont des cellules dérivées de HUVEC et expriment donc naturellement les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ .

nous n'avons pas pu dégagé de valeur d'IC<sub>50</sub> correcte. Nous avons alors essayé d'utiliser les lipides sans les formuler mais ici encore l'écart entre les résultats était trop grand pour mener à une valeur juste. Nous avons déjà constaté cette toxicité et son manque de reproductibilité dans les expériences de transfection *in vitro*. En recensant ces résultats, nous pouvons dire que les thiourées suivantes ont une toxicité importante :

- **57** pour LPT/P > 60,
- **42** à partir de 20 LPT/P,
- **65** à 40 LPT/P,
- **64** à 40 LPT/P.

Cette toxicité semble particulièrement prononcée pour la famille diglycolique, et pour les lipopolythiourées à forte activité de transfection (**42** et **57**). Nous avons cherché à la réduire en modifiant la méthode de formulation, d'une part, et la composition des liposomes, d'autre part.

### b) Influence de la méthode de formulation

Nous avons vu que le type de particules diffère selon les méthodes utilisées (*cf.* IV.A.1, p.88) : l'injection éthanolique entraîne la formation de particules unilamellaires (SUV) alors que l'hydratation d'un film lipidique forme des vésicules multilamellaires (MLV). Il est possible que ces structures différentes n'aient pas les mêmes propriétés, en particulier du point de vue de leur toxicité. Pour tester cette hypothèse la lipopolythiourée apparemment la plus toxique, **42**, a été formulée de ces deux façons et les propriétés de toxicité (Figure 57) et de transfection ont été comparées (Figure 58). Le taux de protéines dans les puits reflète la viabilité des cellules présentes.

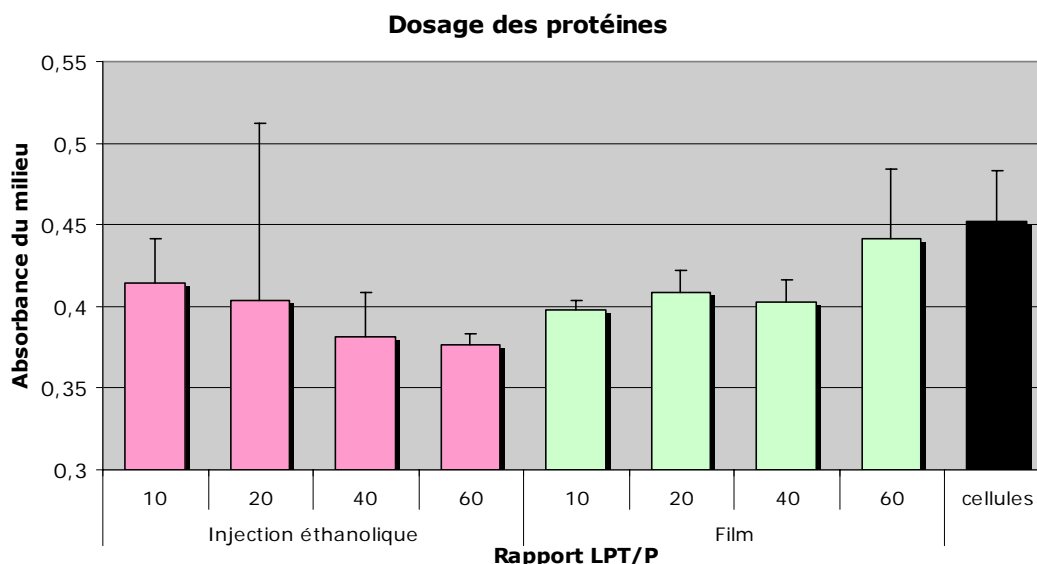


Figure 57 : Influence de la méthode de formulation sur la toxicité des complexes **42**/DPPC 1/1

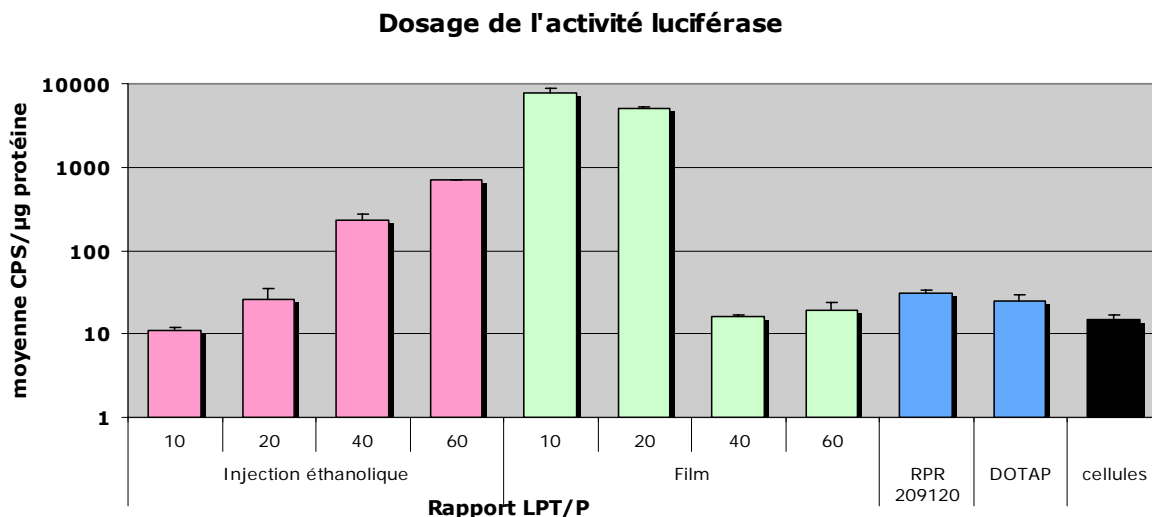


Figure 58 : Influence de la méthode de formulation sur la transfection des complexes **42**/DPPC 1/1

La toxicité des complexes résultant de l'injection éthanolique se traduit par la diminution de la quantité de protéines dans le milieu cellulaire lorsque la quantité de lipopolythiourée **42** augmente. La formulation par hydratation d'un film lipidique permet de maintenir constante la quantité de protéines et, par conséquent, de réduire la toxicité des complexes. De plus, cette formulation présente l'avantage d'augmenter l'activité de transfection d'un facteur 1000 pour les rapports 10 et 20 LPT/P, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature.<sup>240</sup> Cette formulation est donc particulièrement intéressante car elle permet d'augmenter l'efficacité de transfection tout en réduisant la quantité de lipide nécessaire.

### c) Influence des co-lipides dans la formulation

La toxicité des complexes peut également être modulée par la composition des lipides dans la formulation. Le cholestérol est une substance présente dans les membranes cellulaires et, lorsqu'il entre dans la composition des formulations, il permet d'améliorer la biocompatibilité et la stabilité des particules formées.<sup>232</sup> Nous avons donc utilisé le cholestérol ou la lipopolythiourée **69** – car elle possède une ancre hydrophobe cholestérol – en mélange avec les lipides **57** et **59**, dans les proportions 35/65. Les liposomes formés ont un diamètre moyen de 150 nm, avec ou sans ADN et montrent la même capacité d'association avec l'ADN que les lipides **57** et **59** seuls. La transfection de ces complexes a été réalisée sur des cellules B16 (Figure 59). Ces complexes présentent une activité de transfection, même si leur efficacité est réduite par rapport au lipide **57** seul. Ceci semble lié à la présence du cholestérol, qui pourrait stabiliser les complexes lipopolythiourée/ADN et réduire la libération intracellulaire de l'ADN.

### Dosage de l'activité luciférase

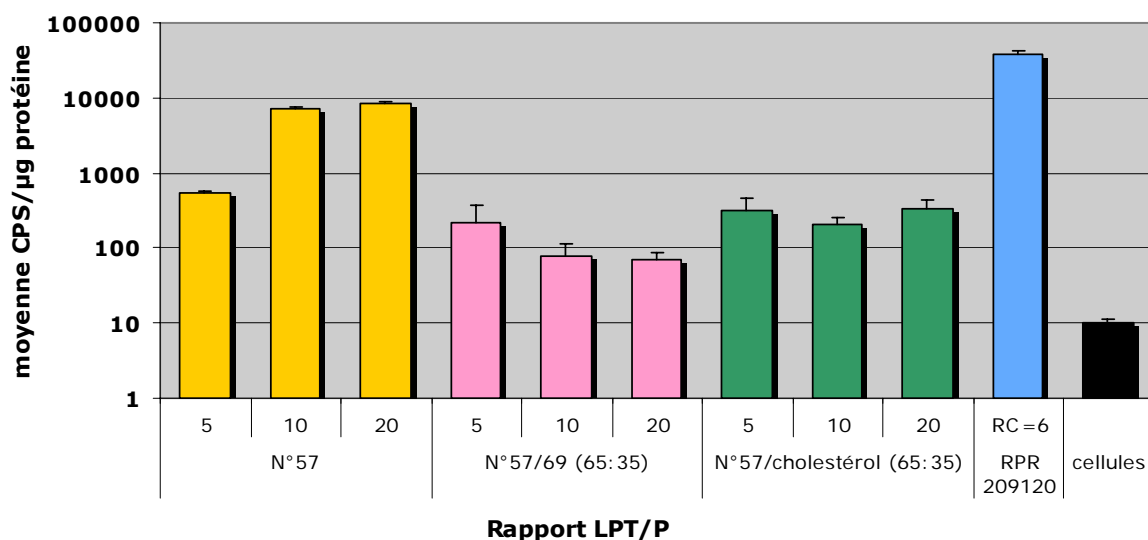


Figure 59 : Efficacité de transfection des complexes stabilisés

Afin d'étudier l'influence du cholestérol sur la stabilité des complexes, nous avons incubé les complexes dans le sérum de la même façon que précédemment (Figure 60).

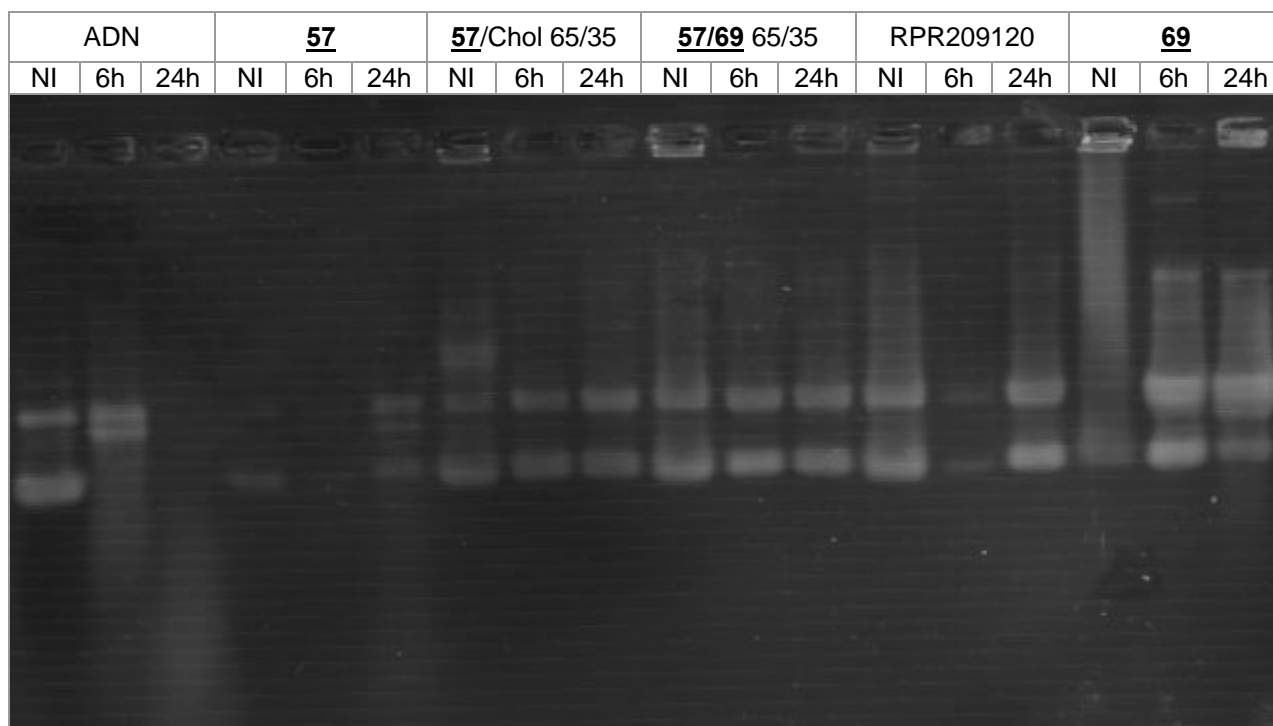


Figure 60 : Stabilité des complexes dans 10% de sérum (NI = non incubé)

L'ADN libre est complètement dégradé en 24h en présence de 10% de sérum. Les formulations de **57/cholestérol** ou **57/69** permettent de retrouver le plasmide intact après 24h d'incubation à 37°C, alors que sa présence semble s'affaiblir dans la formulation du lipide **57** seul. Ainsi, la présence du cholestérol améliore la stabilité de l'ADN dans les complexes.

Ces nouvelles formulations à l'aide de cholestérol apportent un gain de stabilité par rapport aux formulations de **57** et **59** seuls. Puisque les résultats de toxicité *in vitro* sont peu reproductibles, nous avons préféré évaluer leur toxicité directement *in vivo*.

## E. Evaluation in vivo

### 1. Toxicité in vivo

Le protocole utilisé correspond à la méthode aiguë de toxicité. La dose supposée toxique est injectée sur 3 souris saines, dont nous suivons la courbe de poids et le comportement. Si l'un des animaux meurt, la dose est considérée comme toxique. Les résultats de la toxicité des lipopolythiourées **42**, **57**, **58**, **59**, **64**, après injection intraveineuse, sont présentés dans la Figure 61.

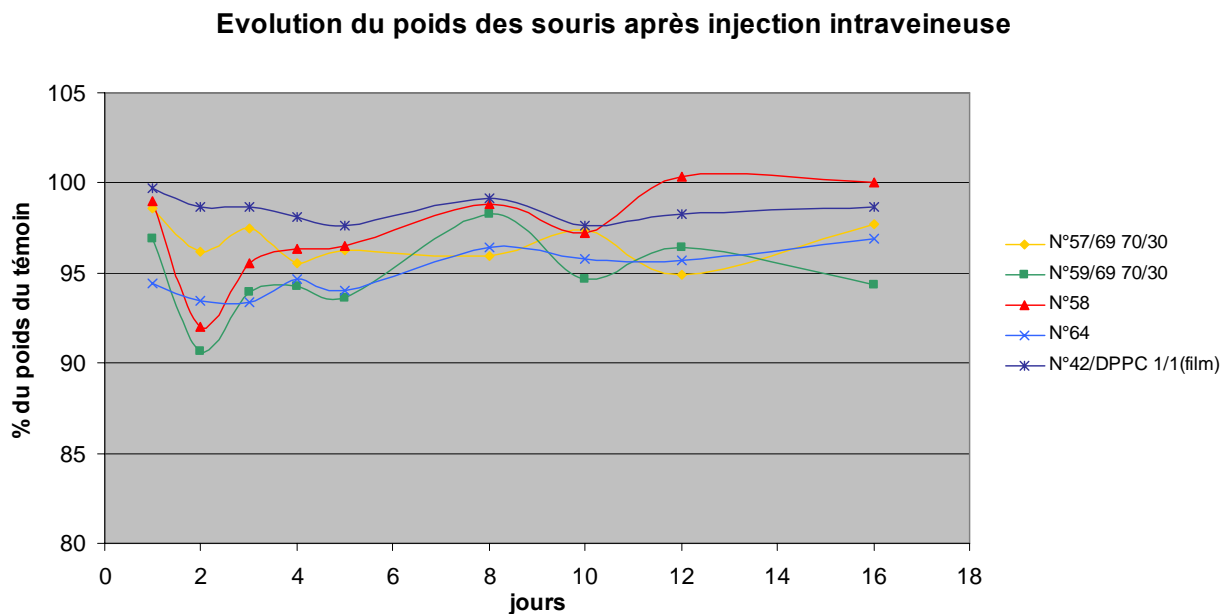


Figure 61 : Toxicité des complexes LPT/ADN *in vivo*

Si une chute de poids a été observée le premier jour, particulièrement importante pour les lipopolythiourées **58** et **59/69**, elle a rapidement été rattrapée les jours suivants. Dans aucun cas les souris n'ont perdu plus de 10% de leur poids, ce qui a permis de considérer les lipides comme non toxiques. En revanche, les lipides **57** et **59**, formulés seuls, ont été testés et considérés comme toxiques car la majorité des souris du lot n'ont pas survécu. Toutefois, la biocompatibilité de ces lipides a pu être améliorée par l'insertion de cholestérol dans la formulation, puisque les formulations **57/69** et **59/69** n'ont pas entraîné de mortalité, ainsi que par l'augmentation de la longueur de la chaîne, le composé **58** n'étant pas toxique. Enfin, nous pouvons confirmer l'intérêt d'avoir changé de technique de formulation pour la lipopolythiourée **42** : alors que la formulation qui résultait de l'injection éthanolique était très toxique *in vitro*, celle sous forme de film apparaît ici bien tolérée. Finalement, il est possible

de poursuivre l'évaluation *in vivo* des formulations 57/69, 59/69, 58, 64, et 42/DPPC 1/1 sous forme de film.

## 2. Efficacité de transfection intratumorale

Il a été largement rapporté que l'efficacité de transfection *in vitro* ne permet pas de prévoir l'activité des systèmes de vectorisation après une administration *in vivo*, du fait de la différence d'environnement biologique et de l'éventuelle modification des propriétés colloïdales des complexes lors de l'interaction avec les tissus biologiques.<sup>232</sup> C'est pourquoi nous avons évalué la capacité de transfection des complexes lipopolythiourée/ADN après une injection intratumorale (Figure 62).

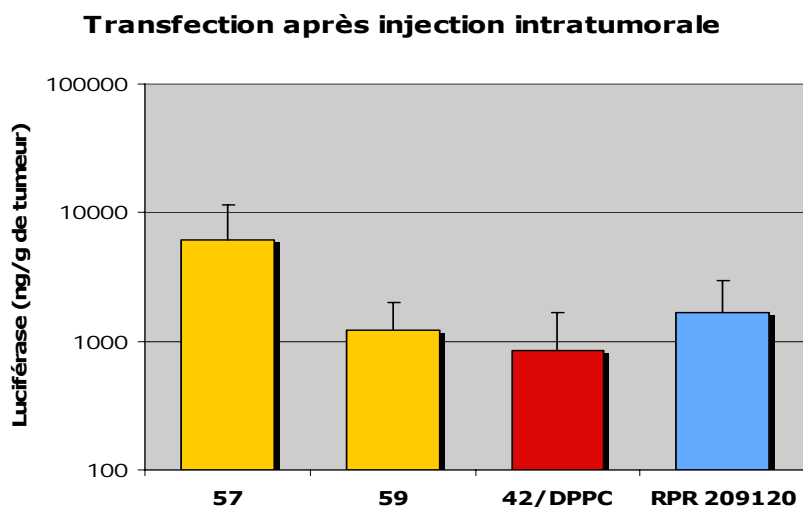


Figure 62 : Efficacité de transfection après injection intratumorale des complexes 57/69, 59/69, 42/DPPC à 20 LPT/P

Ces résultats montrent que les lipopolythiourées maintiennent une activité de transfection dans des conditions *in vivo*, à un niveau comparable au lipide cationique RPR 209120. La lipopolythiourée 57 apparaît comme la plus efficace dans les conditions utilisées.

## 3. Biodistribution

Il est important pour un vecteur de gènes administré par injection intraveineuse de circuler longtemps dans le sang afin d'avoir le maximum de contact avec le tissu cible. L'utilisation de la lipopolythiourée DT3TU a permis de réduire l'élimination puisque l'on retrouve deux fois plus de complexes dans le sang qu'avec un système cationique<sup>165</sup> (cf. I.D.2, p.43). Cet effet est probablement dû à l'absence de charges cationiques de ce système. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la biodistribution de nos systèmes après une injection intraveineuse de 57/69 et 42/DPPC marqués par la lipopolythiourée fluorescente 76 sur des souris porteuses de tumeurs. Après 2h, les souris sont sacrifiées et la fluorescence des différents organes est quantifiée (Figure 63). Les résultats sont comparés à la biodistribution d'un liposome neutre conventionnel à base de DSPC et Cholestérol.

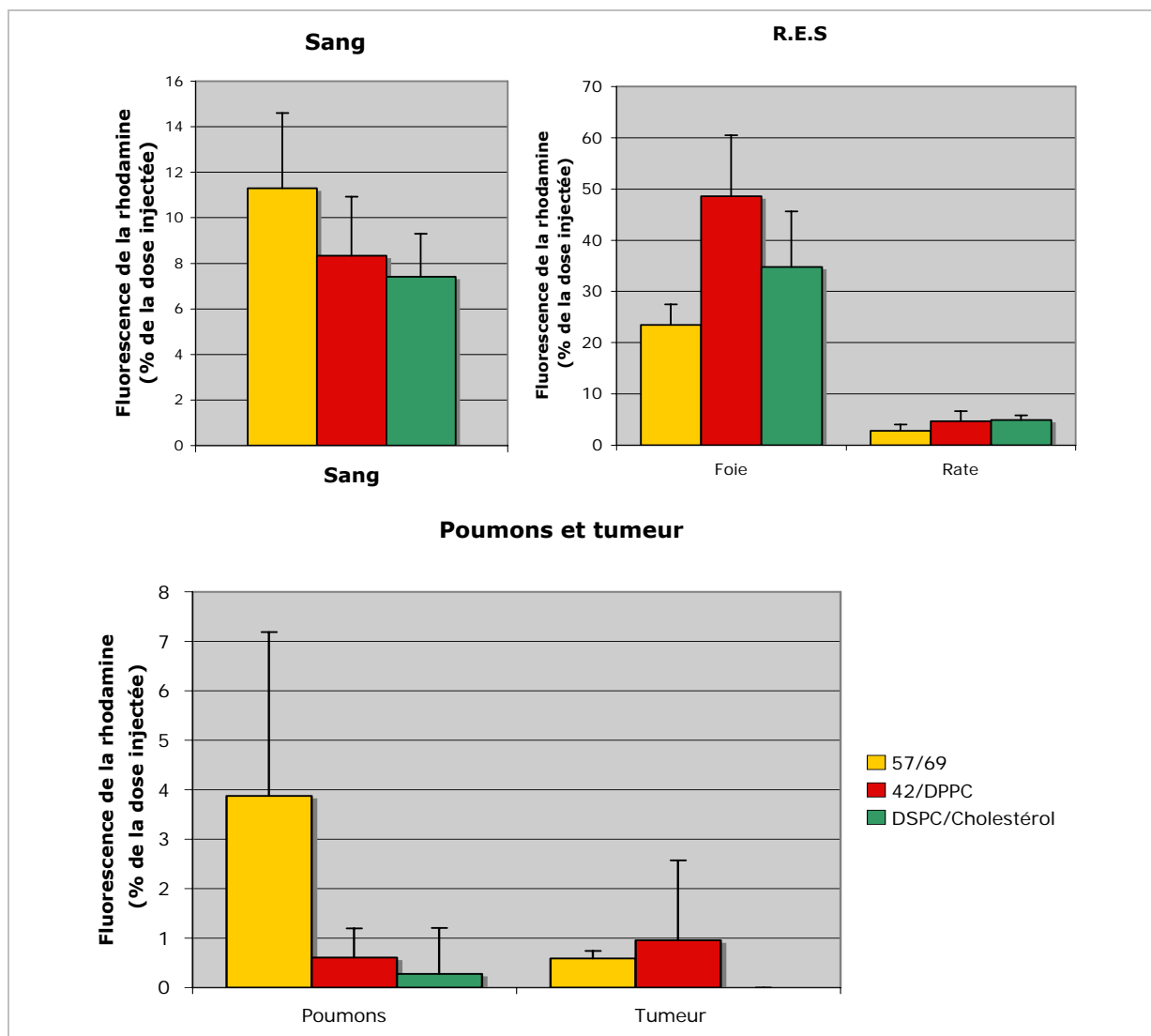


Figure 63 : Biodistribution 2h après l'injection intraveineuse de **57/69** et **42/DPPC** en comparaison avec un liposome neutre conventionnel (DSPC/Cholestérol)

Dans un premier temps, nous pouvons constater qu'il reste, deux heures après l'injection, entre 8 et 11 % de la dose injectée dans le sang pour **42/DPPC** et **57/69** respectivement, ce qui est comparable à un liposome neutre conventionnel. Ces résultats constituent une nette amélioration vis-à-vis des systèmes cationiques (moins de 3% des lipoplexes à base de RPR209120 sont retrouvés dans le sang dans les mêmes temps).<sup>165</sup> Ce phénomène est donc probablement dû au caractère non cationique des lipopolythiourées, puisqu'il est commun aux lipopolythiourées DT3TU, **42** et **57**. Par ailleurs, la forte quantité retrouvée dans le système réticulo-endothélial (foie et rate) est due à l'élimination non spécifique et naturelle des complexes. L'accumulation dans les poumons est plus importante qu'un lipide conventionnel, particulièrement pour **57**. Enfin, nous notons malheureusement peu d'accumulation dans les tumeurs mais nous n'avons pas introduit d'élément de ciblage qui pourrait entraîner un tropisme particulier.

## **F. Conclusion**

L'évaluation des lipopolythiourées synthétisées a montré que les lipides comportant une tête branchée à deux motifs thiourée sont capables d'associer l'ADN et de former des complexes de taille homogène. Nous avons mis au point une méthode d'évaluation systématique, applicable à l'ensemble de nos échantillons, et nous avons montré la faisabilité d'une formulation automatisée. Cette méthode nous a permis de dégager les structures les plus actives, les lipopolythiourées **42**, **57**, **58** et **59**.

Les résultats de l'évaluation biologique nous permettent de considérer les lipopolythiourées comme des vecteurs de gènes. En effet, les lipides **42**, **57**, **58** et **59**, non cationiques présentent une efficacité de transfection *in vitro* comparable au lipide cationique RPR 209120. Si cette activité s'accompagne d'une toxicité non négligeable, elle peut être réduite par la modification des paramètres de formulation (technique de formulation ou composition lipidique). De plus, leur activité de transfection a été vérifiée *in vivo* après injection intratumorale, et les résultats de biodistribution montrent une nette amélioration du temps de circulation dans le sang après une injection intraveineuse, par rapport à un lipoplexe cationique à base de RPR209120.

Enfin, les études biophysiques apportent quelques éléments structuraux sur les complexes lipopolythiourée/ADN : les complexes sont homogènes et organisés, l'ADN y est associé et protégé des DNases pendant 24h dans 10% de sérum, et sa conformation B est légèrement modifiée. Paradoxalement, il reste majoritairement accessible à un agent intercalant tel que le picogreen. Au vu de la structure en cône du lipide et l'observation microscopique qui semble indiquer une organisation tridimensionnelle, on pourrait imaginer, par exemple, une structure en cylindre autour de laquelle l'ADN pourrait s'enrouler mais il faudrait réaliser une étude de diffraction des rayons X pour pouvoir le confirmer.



## V. Discussion

### A. Les lipopolythiourées

#### 1. Stabilité des lipopolythiourées

Au cours de ce travail nous avons rencontré des problèmes de stabilité des lipopolythiourées, inégaux selon les structures. En particulier, l'analyse du lipide **59**, après deux mois de stockage sous argon à 4°C, a montré une dégradation de 20% (identifiée par sa pureté ELSD). Un suivi LC-MS a alors été réalisé sur les lipides **57** et **59**. La pureté des échantillons, formulés ou non, a été mesurée régulièrement par ELSD. Il a permis de montrer que le lipide **57** a maintenu une pureté de 100% pendant au moins un mois. Quant au lipide **59**, il n'a pas montré d'évolution sur cette période et sa pureté est restée autour de 80%. Il semble donc qu'une dégradation partielle ait eu lieu au début du stockage.

La synthèse de la lipopolythiourée **59** se termine par une étape de déprotection du groupement diol en milieu acide (cf.III.C.1, p.60), qui n'a pas lieu dans la synthèse du lipide **57**, à terminaison méthyle. Des difficultés ont été rencontrées lors de cette hydrolyse, qui doit donc être suivie par LC-MS pour éviter la dégradation de la thiourée. Il est possible que, malgré la congélation puis la lyophilisation du milieu réactionnel, des traces résiduelles d'acide entraînent la dégradation de la lipopolythiourée en début de stockage, puisque l'analyse ELSD après lyophilisation était convenable. Par conséquent, nous avons stocké les lipopolythiourées sous vide et en présence de potasse.

#### 2. Etude de la charge des complexes

##### a) Potentiel zêta

La mesure la plus répandue est celle du potentiel zêta, qui permet d'accéder à la charge de surface des particules. Une particule chargée attire les ions de charge opposée à leur surface, qui forment alors une couche ionique dense autour de la particule, appelée couche de Stern. La présence de ces ions va, à son tour, entraîner la formation d'une couche plus diffuse d'ions de charge opposée. C'est le potentiel de cette surface qui est appelé potentiel zêta. Le potentiel zêta est mesuré par la mobilité de cet ensemble dans un champ électrique car ces deux entités sont reliées par la loi de Henry.<sup>274</sup>

---

<sup>274</sup> Abramson H. A. (1932) Electrokinetic phenomena.VI. Relationship between electric mobility, charge and titration of proteins, *J. General Physiology*, 15, 575-603.

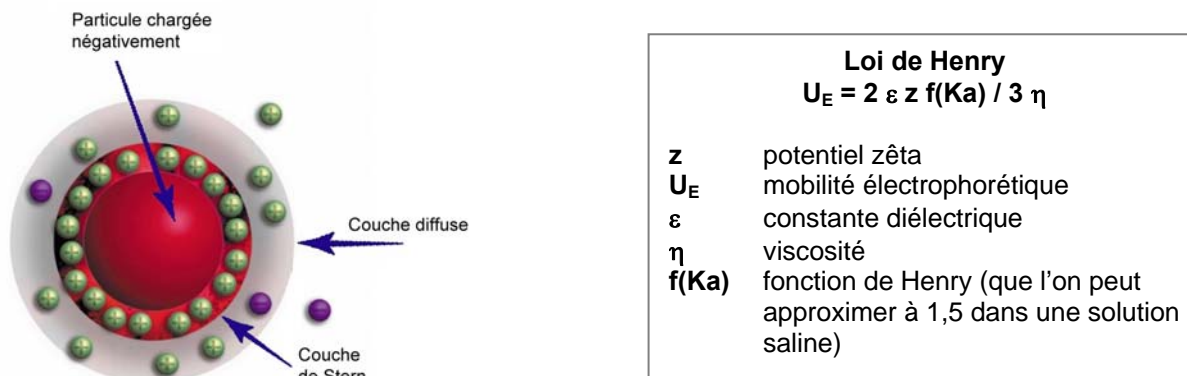


Figure 64 : Représentation du potentiel zêta d'une particule

D'importants problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lors de la mesure du potentiel zêta des lipopolythiourées. Si certaines valeurs proches de la neutralité ont été obtenues, dans la plupart des cas, néanmoins, plusieurs pics de potentiel sont observés, et la valeur de ce potentiel est généralement positive. Ce problème a été rencontré pour la majorité des lipopolythiourées, en particulier pour la famille diglycolique (28, 57, 58, 59). Il faut noter que le fournisseur de l'appareil utilisé considère la bande de neutralité (entre -20 mV et + 20 mV) comme une zone d'instabilité colloïdale, et ne garantit pas les valeurs obtenues dans cette plage.<sup>275</sup> En effet, la couche de Stern d'une particule neutre peut être constituée d'ions recrutés aléatoirement, puisqu'il n'y a pas *a priori* de force d'attraction électrostatique. Dans le cas des lipopolythiourées, les particules pourraient recruter des ions à cause de la fonction thiourée qui peut se lier aux anions par des liaisons hydrogène aussi bien qu'aux cations grâce à l'électronégativité du soufre. Pour mieux appréhender le recrutement des ions par les lipopolythiourées, nous avons étudié le potentiel zêta des particules en fonction du pH de la solution (Figure 65).

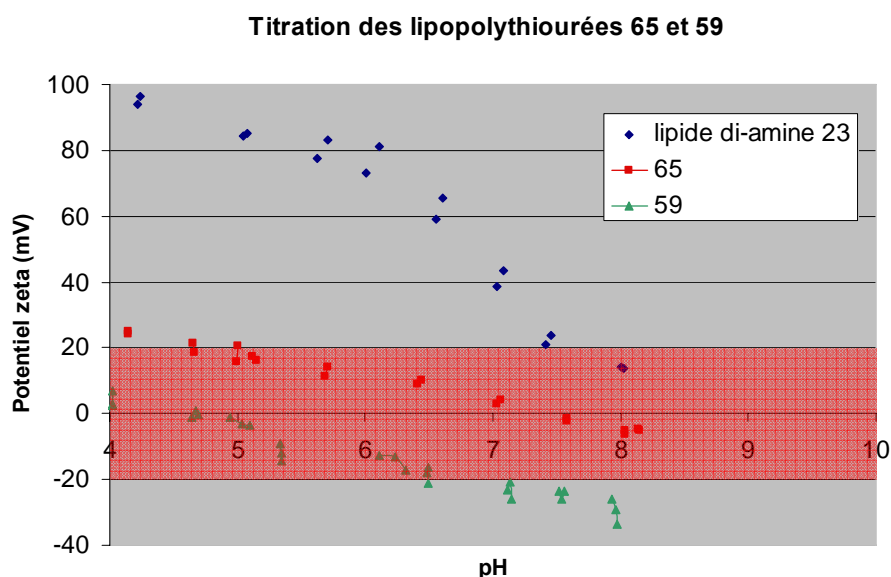


Figure 65 : Evolution du potentiel zêta des particules de lipopolythiourées en fonction du pH

<sup>275</sup> Information dispensée sur le site [www.malvern.com](http://www.malvern.com).

Ces résultats permettent de comparer le comportement des particules de lipopolythiourées à celui d'une particule formée par le lipide di-amine **23** (cf. III.C.1, p.60), intermédiaire réactionnel de **59**. Les particules de lipopolythiourée **59** ou **65** recrutent des ions différents selon le pH de la solution ; toutefois cette variation de potentiel zêta reste dans la zone de neutralité (-20mV/+20mV) et n'est pas comparable à la variation d'une particule chargée positivement.

Cependant, l'obtention de valeurs positives de potentiel zêta nous a incités à vérifier, d'une part, la charge intrinsèque de la lipopolythiourée, en particulier son état de protonation et, d'autre part, la contamination éventuelle par des fonctions amines.

### b) Titration acido-basique des lipopolythiourées

Le pKa de la thiourée est égal à 21 dans le DMSO,<sup>152</sup> elle est donc, *a priori*, sous forme non protonée dans l'eau à pH physiologique. Pour vérifier qu'il n'y a pas d'échange de proton mis en jeu par la fonction thiourée présente sur les lipides synthétisés, nous avons réalisé une titration acido-basique de **57** et **59** à une concentration utilisée en physico-chimie, *i.e.* 10  $\mu$ M (Figure 66).

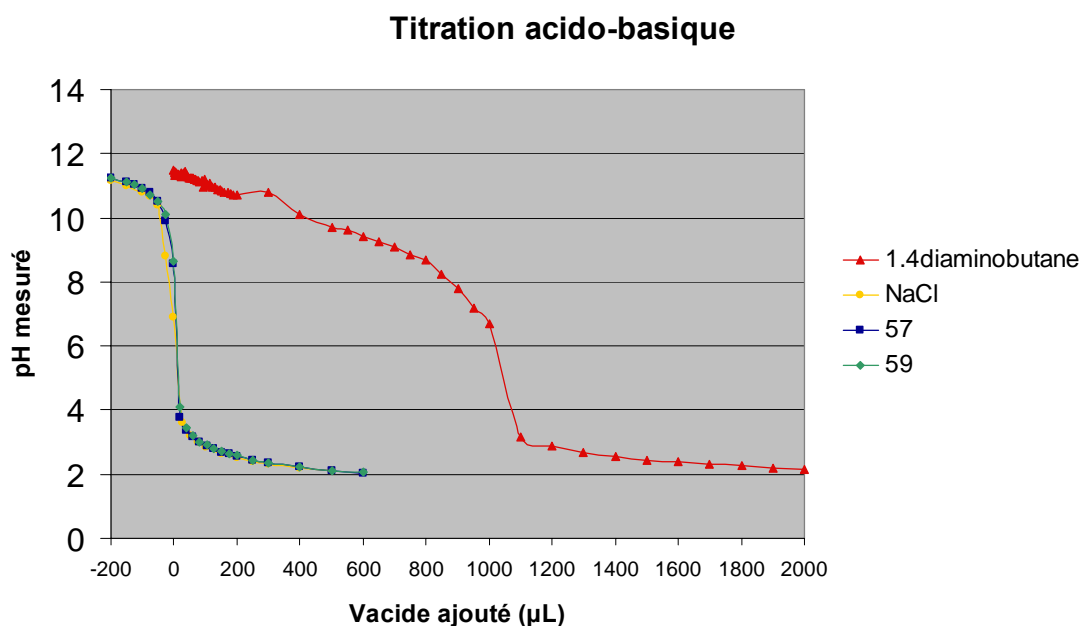


Figure 66 : Titration acido-basique des thiourées **57** et **59**<sup>276</sup>

La titration des deux amines du 1,4-diaminobutane a été utilisée comme témoin positif. Le saut de pH, lors de l'ajout de 1mL d'acide, est caractéristique d'une base faible. En revanche, le comportement des lipopolythiourées **57** ou **59** est en tout point comparable à une solution diluée de NaCl. Nous pouvons donc en déduire qu'il n'y a pas de proton mis en jeu dans ces systèmes, donc pas de comportement acide des lipopolythiourées à pH physiologique.

<sup>276</sup> Les abscisses négatives correspondent à un ajout de base NaOH 10 $\mu$ M

### c) Présence d'amines

A la fin de la synthèse de chaque lipopolythiourée, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince révélée à la ninhydrine. Nous avons systématiquement observé une légère couleur orangée qui semble propre à la fonction thiourée, mais aucune trace d'amine n'a été observée (coloration rose).

Toutefois nous avons voulu le vérifier par une méthode quantitative. Le dosage à l'aide de la fluorescamine permet de quantifier les amines présentes en surface de la particule, grâce à la fluorescence de la fluorescamine. Ce test, qui a déjà permis d'affirmer l'absence d'amine dans les formulations à base de DT3TU,<sup>165</sup> a été effectué ici sur le lipide **39** (Figure 67).

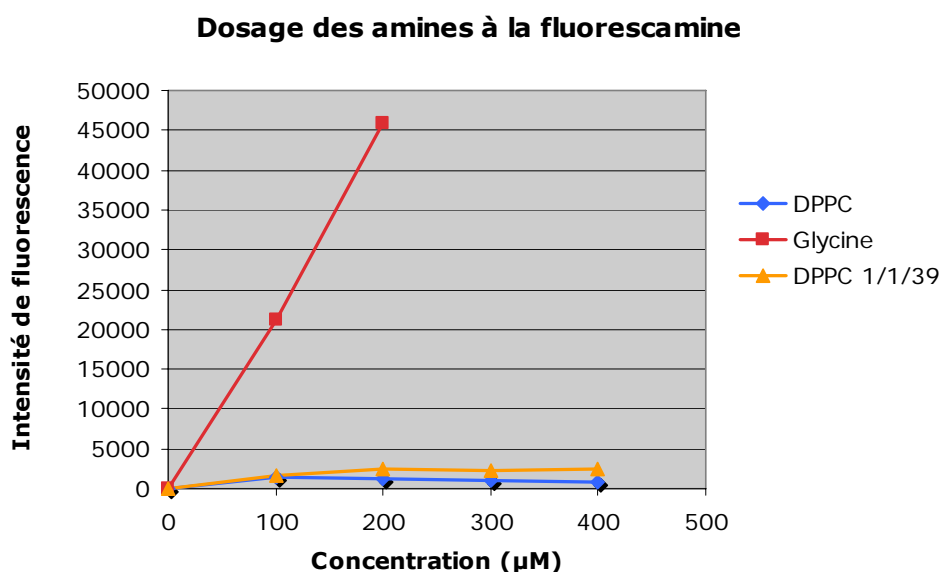


Figure 67 : Dosage de la lipopolythiourée **39** à l'aide de la fluorescamine

Le comportement de la lipopolythiourée **39** peut être comparé à une amine, la glycine, d'une part, et à un amphiphile neutre, la DPPC, d'autre part. Il apparaît clairement que le lipide **39** est semblable au lipide neutre, ce qui montre l'absence d'amine ou, au mieux, une contamination par une quantité négligeable par rapport à la glycine.

### d) Charge en présence d'ADN

Enfin, le comportement des complexes lipopolythiourée/ADN *in vitro* a donné des éléments de réponse sur la charge des complexes. Ainsi, l'augmentation du temps d'incubation des complexes *in vitro* a permis d'améliorer l'efficacité de transfection (*cf.* IV.C.1, p110). Ce comportement diffère des lipides cationiques qui atteignent plus rapidement leur maximum d'efficacité, car la forte interaction électrostatique avec les membranes des cellules cibles assure une internalisation de la majorité des lipoplexes en moins de 24h. Les lipopolythiourées ont probablement une moins forte interaction avec les membranes cellulaires : ceci pourrait être attribué à une charge réduite. Cette hypothèse est confirmée par les images d'internalisation des complexes **11**/DPPC, **12**/DPPC et **38**/DPPC en absence de ciblage (*cf.* IV.C.2, p.111) : très peu de complexes sont observés dans les cellules ou sur les membranes cellulaires.

Par ailleurs, il est reconnu que l'efficacité des systèmes cationiques est, en général, largement réduite par la présence de sérum.<sup>89</sup> C'est pourquoi nous avons voulu étudier l'influence du sérum sur la capacité de transfection des lipopolythiourées (Figure 68).

### Influence du sérum sur l'efficacité de transfection

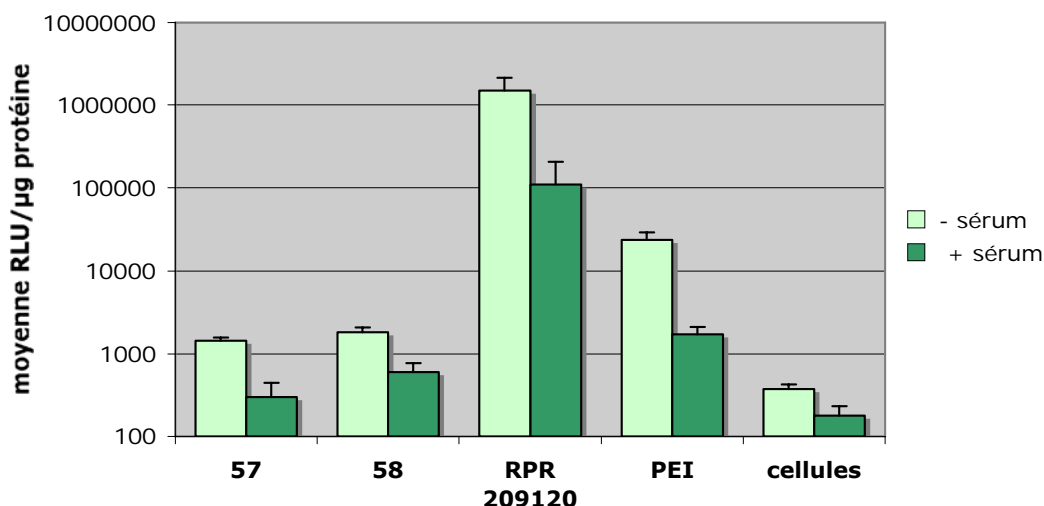


Figure 68 : Influence du sérum sur la transfection des lipopolythiourées **57** et **58** (rapport 20 LPT/P)

Ces résultats nous confirment l'inhibition entraînée par le sérum sur les systèmes cationiques : la lipopolyamine RPR 209120 et le PEI voient leur efficacité réduite de plus de dix fois en présence de sérum. Si la présence de sérum affecte également l'activité des lipopolythiourées **57** et **58**, son influence est nettement moins importante puisque l'activité est au maximum divisée par 4.

Ces résultats permettent de considérer que les complexes de lipopolythiourées, avec ou sans ADN, ne sont pas cationiques.

### 3. Toxicité

Les lipopolythiourées engendrent une toxicité non négligeable, en particulier les lipides **42**, **57** et **65** (cf. IV.C.3.a, p.113). Il est difficile de comprendre l'origine de cette toxicité puisqu'elle ne semble pas liée à la longueur des chaînes aliphatiques (**42** et **65** ont toutes deux montré une certaine toxicité). Cependant, elle représente un inconvénient important de ces systèmes car le maximum d'efficacité de transfection *in vitro* est souvent obtenu à la limite de toxicité pour les cellules (pour les lipopolythiourées **42** et **57** notamment).

Cette toxicité peut être réduite en utilisant la méthode d'hydratation d'un film lipidique, ce qui s'est révélé particulièrement efficace dans le cas de **42** (cf. IV.D.3, p.114). La formation de vésicules multilamellaires semble diminuer la toxicité de ces systèmes par rapport aux vésicules unilamellaires formées par injection éthanolique. Il est possible que la structure unilamellaire des SUV entraîne un relargage brutal des lipopolythiourées toxiques dans les cellules, dès la rupture de la bicouche lipidique : en effet, lors de l'injection *in vivo* d'une lipopolythiourée toxique comme **57**, les animaux sont morts rapidement (en deux heures). La structure multilamellaire, quant à elle, pourrait permettre une libération relativement plus lente du lipide et diminuer ainsi ses effets toxiques.

L'insertion de cholestérol dans la formulation, grâce à la lipopolythiourée **69**, permet également de réduire la toxicité des lipides **57** et **59**, particulièrement *in vivo* (cf. IV.E.1, p117). Le cholestérol est connu pour sa biocompatibilité et sa capacité à rigidifier les membranes biologiques.<sup>234</sup> Il est possible que sa présence modifie la structure des bicouches lipidiques et, par conséquent, les propriétés des complexes lipopolythiourée/ADN. Des études structurales plus poussées seraient nécessaires à l'explication de cet effet du cholestérol.

#### **4. Comparaison des lipopolythiourées avec le lipide DT3TU et les systèmes cationiques**

Cette comparaison peut se faire à plusieurs niveaux :

##### ➤ **Formulation**

Le caractère hydrophobe du lipide DT3TU a constitué un inconvénient majeur qui a entraîné des problèmes de reproductibilité importants des résultats biologiques, en particulier de transfection (cf. I.D.2, p.43). Grâce aux modulations des différents éléments structuraux, nous avons pu synthétiser des composés possédant une balance hydrophile/hydrophobe plus favorable. En effet, les 5 lipopolythiourées caractérisées par un  $\log P < 6,5$  ont pu être formulées sans l'aide de co-lipides (cf. IV.B.2, p.96). Ceci représente une avancée remarquable car elle permet d'accéder directement aux propriétés des lipopolythiourées, en particulier en présence d'ADN.

##### ➤ **Interaction avec l'ADN**

Les lipopolythiourées synthétisées ont toutes montré leur capacité de s'associer à l'ADN comme le montre le test retard sur gel d'agarose. La quantité de lipide nécessaire à cette interaction varie en fonction de la structure des composés. Nous pouvons détecter une modification du dichroïsme circulaire de l'ADN dès 1,8 LPT/P, ce qui se traduit également par un retard du plasmide sur gel. Toutefois, il n'est totalement retenu qu'à partir de 5 LPT/P pour les composés **28**, **42**, **69**, ce qui correspond à 10 fonctions thiourée/phosphate. Par comparaison, le lipide DT3TU montrait une interaction dès 5 nmol DT3TU/ $\mu\text{g}$  d'ADN, *i.e.* 10 fonctions thiourée/phosphate (cf. Tableau 8, p.94). L'interaction semble donc équivalente dans les deux systèmes ; mais l'utilisation d'un lipide à 3 motifs thiourée plutôt qu'à deux permet de réduire la quantité de lipide nécessaire. Cette interaction demeure cependant moins forte que l'interaction électrostatique qui existe entre les lipides cationiques et l'ADN, où l'association a lieu dès un rapport de charges  $N/P = 1$ . En théorie, une seule fonction thiourée pourrait associer une fonction phosphate en formant avec elle deux liaisons hydrogène mais la géométrie complexe des deux entités ne permet pas de prédire cette interaction. Des études sont en cours pour déterminer exactement le nombre de fonctions thiourée nécessaires à l'interaction avec une fonction phosphate de l'ADN.

##### ➤ **Efficacité de transfection**

L'amélioration la plus importante des lipopolythiourées synthétisées par rapport au modèle DT3TU est la forte activité de transfection obtenue *in vitro* et *in vivo*, alors qu'elle était très

faible et peu reproductible dans le cas de la DT3TU. De plus, la transfection est possible dans une zone de stabilité colloïdale, ce qui est intéressant pour une injection intraveineuse, alors que le résultat obtenu pour la DT3U était lié à la précipitation des complexes.

Nous avons mis au point un système d'efficacité comparable aux vecteurs cationiques. *In vitro*, les lipopolythiourées **57**, **58**, **42**, **59** montrent des activités du même ordre de grandeur que le RPR 209120 et le PEI (*cf.* IV.D.1., p108). *In vivo*, cette activité est conservée, elle est même supérieure au RPR 209120 dans le cas de la formulation **57/69** (*cf.* IV.E.2, p.118).

#### ➤ **Comportement *in vivo***

Mettre au point des systèmes non cationiques a pour but d'améliorer le comportement *in vivo* des complexes ADN/vecteur, en particulier augmenter le temps de circulation sanguine après une injection systémique. Le modèle DT3TU a prouvé son potentiel car il permet de réduire l'élimination des complexes par rapport à un système cationique : 30 minutes après l'injection, 37% des complexes ont été retrouvés dans le sang contre 17% dans le cas du RPR209120. Les lipopolythiourées évaluées ont confirmé cette tendance puisque ce taux s'élève à 11% deux heures après l'injection. Ceci met en évidence l'intérêt des lipopolythiourées comme alternative aux lipides cationiques.

#### ➤ **Encore peu d'éléments sur la nature de l'interaction lipopolythiourée/ADN**

Enfin, nous pouvons nous interroger sur la nature de l'interaction lipopolythiourée/ADN. Nous n'avons pas assez d'éléments pour confirmer qu'il s'agit de liaisons hydrogène entre la fonction thiourée et l'ADN. Toutefois, le caractère non cationique des lipopolythiourées tend vers cette hypothèse ; bien que la fonction thiourée puisse recruter d'éventuels cations qui pourraient permettre l'association de l'ADN par pontage. Ce phénomène a été utilisé pour le transport de médicaments dans des liposomes appelés cochléates.<sup>277</sup>

Par ailleurs, une étude de modélisation moléculaire de la DT3TU a montré que l'interaction la plus favorable se produirait avec les phosphates de l'ADN plutôt qu'avec les bases de l'ADN.<sup>278</sup> Nous avons voulu mettre en évidence ce phénomène par l'étude de RMN sur le lipide DT3TU associé à un oligonucléotide. Il a été observé en <sup>1</sup>H un déplacement des signaux des bases de l'ADN, mais aucun effet sur le signal des phosphates en <sup>31</sup>P. D'autre part, nous avons étudié l'interaction lipopolythiourée/phosphate en utilisant une solution diluée de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :<sup>142</sup> l'ajout croissant de lipide **57** n'a pas non plus permis de mettre en évidence un déplacement du signal du phosphate.

## **B. Etudes structure/propriétés**

Lors de la synthèse, nous avons fait varier successivement différents paramètres structuraux : l'espaceur, le répartiteur, les terminaisons et l'ancre hydrophobe. L'évaluation systématique des lipopolythiourées nous permet de disposer d'informations sur chacune de ces variables.

---

<sup>277</sup> Zarif L. (2005) Durg delivery by lipid cochleates, *Methods. Enz.*, 391-314-329.

<sup>278</sup> Petit L., Joubert L., Tranchant I., Herscovici J., Adamo C. (2005) Theoretical study of the interaction between a lipopolythiourée and DNA, *article soumis*.

## 1. Influence de l'espaceur et du répartiteur

L'influence de l'espaceur est peu relatée dans la littérature des lipides cationiques. Il est possible d'utiliser un espaceur biodégradable pour améliorer l'efficacité du transfert, en déstabilisant la particule dans un environnement particulier (par exemple l'endosome)<sup>240</sup>. Cependant, nous nous sommes plutôt intéressés à son influence sur la balance hydrophile/hydrophobe de nos lipides.

Pour cela, nous pouvons comparer les lipides **12**, **25**, **28** et **38** qui comportent tous des terminaisons diol et des chaînes de 14 carbones (Tableau 12).

Espaceur	N°	Formulation	logP	Taille des complexes (nm)	LPT/P nécessaire à l'association	Taille des complexes (nm)	Transfection
Aromatique	<b>12</b>	<b>12</b> /DPPC 1/2	9,27	122	7	250	Aucune
Succinique	<b>25</b>	<b>25</b> /DPPC 1/1	6,91	91	10	332	Aucune
Diglycolique	<b>28</b>	<b>28</b> /DPPC 1/1 <b>28</b> seul	6,38	177 119	7 5	274 84	Aucune Faible
PEG	<b>38</b>	<b>38</b> /DPPC 1/2	7,29	142	7	142	Aucune

Tableau 12 : Influence de l'espaceur sur la formulation et la transfection

L'espaceur diglycolique apporte l'amélioration la plus importante, puisqu'il permet de formuler les lipides seuls, ce qui était prévisible par le calcul du logP. Cependant, si l'on compare les formulations comportant la DPPC, les propriétés évaluées sont voisines (diamètre des particules avec ou sans ADN, capacité d'interaction avec l'ADN). La variation d'espaceur ne permet pas de conférer une activité biologique à un lipide possédant des chaînes aliphatiques de 14 carbones à terminaisons diol.

Par ailleurs, les composés de la famille lysine ne possèdent pas d'espaceur mais un répartiteur dissymétrique. Ces lipopolythiourées **42**, **64** et **65**, formulées avec la DPPC, ont montré une activité de transfection (*cf.* IV.D.1, p.108). Il est possible que cette structure, plus contrainte et plus encombrée du fait des groupements isopropylidène, modifie la rigidité des bicouches et leur organisation (*cf.* Figure 33, p.87). Toutefois il serait nécessaire d'approfondir les études structurales de ces composés.

Finalement, nous pouvons constater que la nature de l'espaceur semble intervenir principalement sur la formulation et ne semble pas un paramètre décisif sur la capacité de transfection.

## 2. Influence de la terminaison

Lors de la synthèse, nous avons introduit des terminaisons méthyle, alcool, diol, isopropylidène ou imidazole.<sup>279</sup> Ces modifications peuvent, d'une part, influencer

<sup>279</sup> Nous n'avons pas pu comparer la terminaison imidazole aux autres lipopolythiourées, car les résultats obtenus ont montré une charge de surface importante, probablement due à la protonation partielle de l'imidazole, qui pourrait intervenir dans l'interaction avec l'ADN. Puisque notre objectif était de mettre au point des systèmes non cationiques, nous nous sommes concentrés sur les autres lipopolythiourées.



l'hydrophilie de la molécule et, d'autre part, du fait de leur proximité avec les motifs thiourée, moduler l'interaction avec l'ADN. L'introduction de fonctions hydroxyle sur la tête cationique d'un lipide a permis d'améliorer la transfection, probablement par la formation de liaisons hydrogène avec l'ADN.<sup>176</sup>

Nous pouvons étudier plusieurs séries de lipopolythiourées. Sur le premier modèle, nous avons déjà fait la comparaison entre les lipides **11** et **12** qui comportent des terminaisons alcool et diol respectivement (*cf.* IV.B.1, p.94). Nous en avons conclu que la présence du diol améliore les propriétés de formulation car il permet de réduire la quantité de DPPC nécessaire à la formation de liposomes et d'induire une meilleure association avec l'ADN sur gel. En revanche, nous n'avons pas pu observer d'amélioration au niveau biologique, puisqu'aucun des deux n'est internalisé dans les cellules (*cf.* IV.D.2, p.111).

Si nous cherchons à comparer les terminaisons méthyle et diol, nous pouvons utiliser la famille diglycolique, en particulier les composés **57**, **59** et **56** (Tableau 13).

Terminaison	N°	Formulation	logP	Taille des complexes (nm)	LPT/P nécessaire à l'association	Taille des complexes (nm)	Transfection
Méthyle	<b>57</b>	<b>57</b> seul	4,84	87	10	174	Bonne
Diol	<b>59</b>	<b>59</b> seul	3,21	62	10	125	Bonne
Diol protégé	<b>56</b>	<b>56</b> seul	5,97	97	30	115	Aucune

Tableau 13 : Influence de la terminaison sur les propriétés physico-chimiques et biologiques

Le lipide **56** se distingue des lipides **57** et **59** par son absence d'activité de transfection, sans doute liée à sa difficulté à retenir l'ADN sur gel. La terminaison protégée semble donc moins favorable qu'un groupement diol ou méthyle. Il est possible que l'encombrement stérique du groupe isopropylidène et l'hydrophobie qu'il entraîne, traduite par une augmentation du logP de 2 unités logarithmiques, défavorise les interactions avec le plasmide. Pourtant, nous avons vu que, dans la famille lysine, ce groupe n'a pas empêché la transfection, en particulier pour la lipopolythiourée **42** (*cf.* IV.C.1.a). En ce qui concerne les terminaisons méthyle et diol, peu de différences sont observées sur les tailles des complexes de **57** et **59** et leur capacité à associer l'ADN, ce qui est aussi le cas des composés **25** et **39** de la famille lysine. Néanmoins, nous pouvons relater les difficultés de formulation rencontrées pour **57** : les préparations donnent des solutions très turbides, qui ont tendance à sédimenter partiellement, et il est observé un manque de reproductibilité dans les gels et les mesures de picogreen de **57** alors que les formulations de **59** sont régulièrement claires et stables. Ceci semble confirmer que la présence du diol améliore l'hydrophilie des composés.

En bref, nous pouvons conclure que la nature de la terminaison n'a pas une influence décisive sur les propriétés biologiques mais permet de moduler les propriétés physico-chimiques, puisque la présence du diol semble dans tous les cas faciliter la formulation des lipopolythiourées.

### 3. Influence de la chaîne : famille lysine

La longueur de la chaîne est un paramètre largement étudié dans la mise au point de lipides cationiques, car elle permet d'équilibrer l'hydrophilie de la tête cationique. En général, on observe une meilleure transfection lorsque la chaîne comporte 14 carbones plutôt que 18.<sup>240</sup> Rares sont les études qui réduisent encore cette longueur ou alors elles utilisent des chaînes dissymétriques.<sup>173</sup> Dans notre cas, la DT3TU comportant déjà 14 carbones et étant encore fortement hydrophobe, nous avons synthétisé des chaînes aliphatiques de 14, 12 et 10 carbones.

Etudions, dans un premier temps, le cas des lipopolythiourées **42**, **64** et **65** de la famille lysine (Tableau 14).

Longueur de la chaîne	N°	Formulation	logP	Taille des complexes (nm)	LPT/P nécessaire à l'association	Taille des complexes (nm)	Transfection
14 C	<b>42</b>	<b>42</b> /DPPC 1/1	11,40	91	5	164	Bonne
12 C	<b>64</b>	<b>64</b> /DPPC 1/1	9,82	100	20	122	Moyenne
10 C	<b>65</b>	<b>65</b> /DPPC 1/1	8,23	68	40	96	Faible

Tableau 14 : Influence de la longueur de la chaîne sur la famille lysine

Une légère réduction de la taille des liposomes et des complexes ADN/vecteurs est observée pour la chaîne la plus courte. Il est surtout remarquable que l'allongement de la chaîne améliore la rétention de l'ADN sur gel et la transfection. Rappelons que ces lipopolythiourées ont été formulées grâce à la DPPC, qui est un phospholipide à 18 carbones. Il faut donc prendre en compte l'interaction entre ces des deux types de lipides, qui s'associent par les domaines hydrophobes, ce qui est plus facile lorsque les chaînes sont de longueur comparable. Nous pouvons supposer que les complexes **42**/DPPC forment des édifices plus stables que **65**/DPPC, particulièrement en présence d'ADN. En effet, la différence d'association à l'ADN corrèle bien avec l'efficacité de transfection (Figure 69).

### Transfection de la famille lysine (20 TU/P)

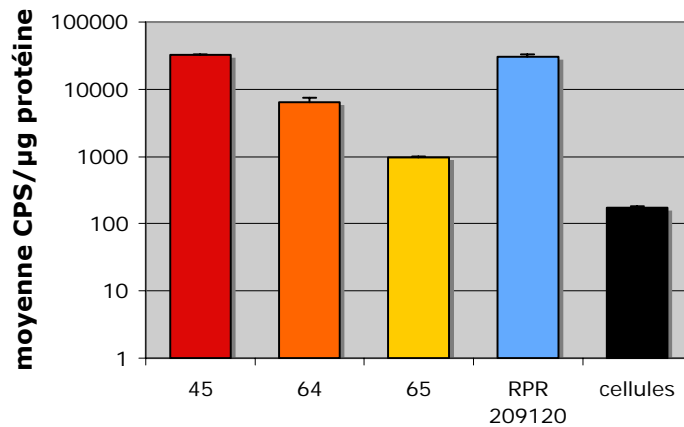


Figure 69 : Influence de la longueur de la chaîne de la famille lysine sur la transfection

#### 4. Influence de la chaîne : famille diglycolique

Nous pouvons également étudier les lipopolythiourées de la famille diglycolique, dont les résultats sont récapitulés dans le Tableau 15.

Longueur de la chaîne	N°	Formulation	logP	Taille des complexes (nm)	LPT/P nécessaire à l'association	Taille des complexes (nm)	Transfection
14 C	<u>28</u>	<u>28</u> seul	6,38	119	5	84	Faible
12 C	<u>58</u>	<u>58</u> seul	4,79	116	5	84	Moyenne
10 C	<u>59</u>	<u>59</u> seul	3,21	62	5	125	Bonne

Tableau 15 : influence de la longueur de la chaîne sur la famille diglycolique

Si les propriétés physico-chimiques de ces vecteurs sont comparables, l'évolution des propriétés biologiques est nette : plus la chaîne diminue, meilleure est la transfection (Figure 70).

### Transfection de la famille diglycolique (20 TU/P)

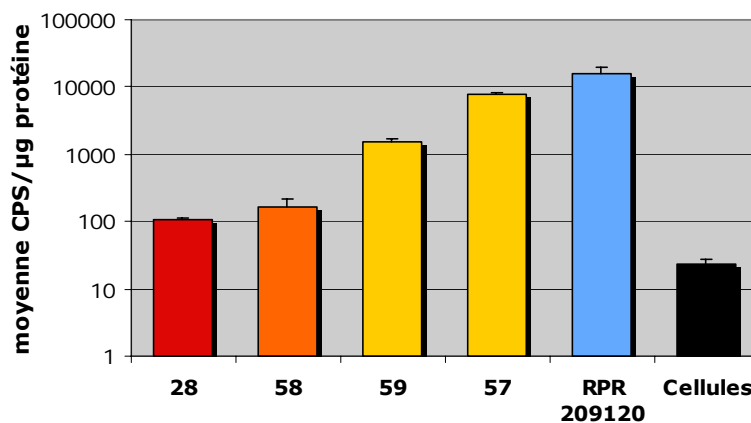


Figure 70 : Influence de la longueur de la chaîne sur la transfection de la famille diglycolique

La situation semble contraire à celle de la famille lysine (Figure 69) mais les lipides **42**, **64** et **65** ont été formulés grâce à la DPPC, alors que les composés **28**, **57**, **58**, **59** ne nécessitent pas de co-lipides. L'amélioration de la transfection est donc ici directement liée à la diminution de la longueur de la chaîne des lipopolythiourées, qui semble être le paramètre décisif pour l'activité biologique. Compte tenu de la forte activité des lipides **57** et **59** seuls, nous avons voulu approfondir notre étude sur les mécanismes mis en jeu lors de la transfection *in vitro*.

### **C. Etude mécanistique**

Le mécanisme du transfert de gènes par les lipides cationiques a été largement rapporté dans la littérature.<sup>87</sup> La charge positive en excès permet dans un premier temps d'interagir avec les composants anioniques des membranes cellulaires, ce qui entraîne leur internalisation. Plusieurs mécanismes sont alors possibles ; mais, dans chacun d'eux, les complexes ADN/vecteurs se situent finalement dans des vésicules dont ils doivent s'échapper avant l'acidification et la maturation en lysosome (*cf.* I.B.3, p.30). Les lipides cationiques pourraient s'extraire de ces endosomes par un mécanisme de « flip-flop » au cours duquel les lipides cationiques fusionneraient avec les lipides anioniques de la membrane endosomale, ce qui mènerait à la libération de l'ADN dans le cytoplasme.<sup>101</sup>

Il apparaît clairement que ce mécanisme dépend largement de la charge des complexes ADN/vecteurs. Dans le cas des lipopolythiourées, les systèmes ne sont pas cationiques et permettent tout de même une expression du gène. Il n'est donc pas évident que les mécanismes mis en jeu soient les mêmes que dans le cas des lipides cationiques. Nous avons voulu les étudier dans le cas des lipopolythiourées **28**, **57**, **58** et **59**, ce qui permet d'accéder directement au comportement des lipopolythiourées, car leur formulation ne nécessite pas de co-lipide.

#### **1. Voie d'entrée dans la cellule**

##### **a) Comportement à basse température**

L'entrée dans la cellule cible peut se faire par de nombreux mécanismes, par exemple l'endocytose, médiée ou non par la clathrine, la macropinocytose, la formation de cavéoles<sup>93</sup> (Figure 12, p.29), ou encore la fusion entre les lipides des complexes et ceux de la membrane cellulaire. Ces processus, qui nécessitent de l'énergie, peuvent être bloqués à basse température. Nous avons comparé l'internalisation des complexes **28**/ADN et RPR 209120/ADN marqués à la rhodamine après 30 minutes d'incubation à 4°C sur des cellules exprimant de façon constitutive la GFP (Figure 71).

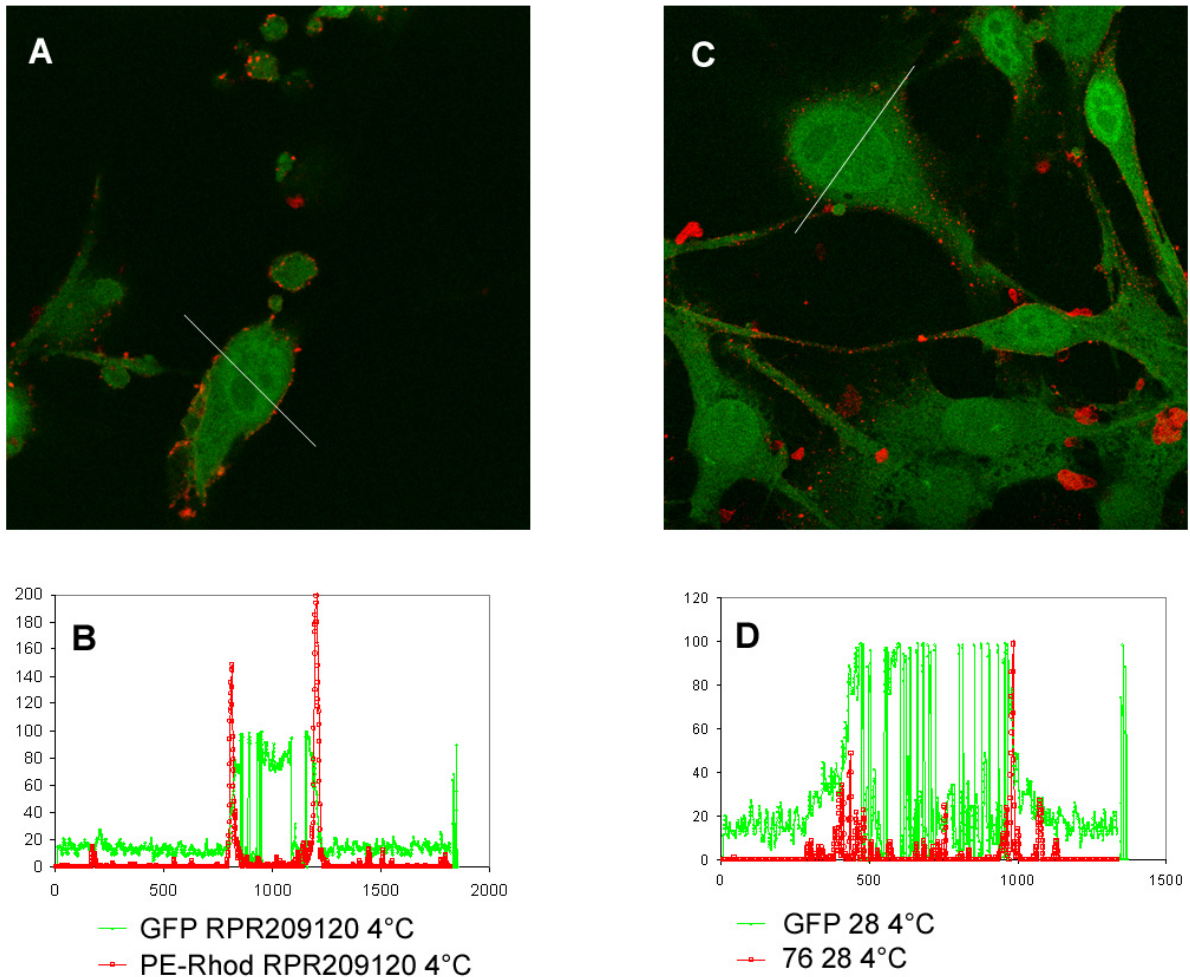


Figure 71 : Internalisation des liposomes de **28** et de RPR 209120 à 4°C

A : Internalisation des complexes RPR 209120

B : Fluorescence de la rhodamine et de la GFP selon le segment déterminé sur A

C : Internalisation des complexes **28**

D : Fluorescence de la rhodamine et de la GFP selon le segment déterminé sur C

L'utilisation d'un microscope confocal permet de quantifier et de localiser précisément les complexes. Ainsi, nous pouvons observer l'adhésion de complexes **28**/ADN et de RPR 209120/ADN sur les membranes des cellules sous forme de légers points rouges. Le graphe de fluorescence permet de suivre la quantité de fluorescence de la rhodamine, d'une part, et de la GFP, d'autre part. Dans le cas du lipide cationique RPR 209120 (Figure 71, graphe B), le maximum de fluorescence de la rhodamine se situe à la limite du domaine de fluorescence de la GFP. Cela signifie que les complexes ont adhéré aux cellules mais n'y ont pas pénétré. Dans le cas des complexes de lipopolythiourées, des vésicules sont également visibles mais, de même que les lipides cationiques, elles ne sont pas repérées dans le cytoplasme. Ces résultats permettent de dire que les lipopolythiourées utilisent un mécanisme actif, bloqué à basse température, pour entrer dans les cellules. En outre, l'intensité du signal de la rhodamine est considérablement diminuée par rapport aux lipides cationiques, ce qui signifie que les complexes **28**/ADN ont une interaction moins forte que les lipoplexes cationiques

avec les membranes cellulaires. Nous retrouvons ici le signe d'un comportement non cationique.

Par ailleurs, les études menées sur les lipopolythiourées **57** et **59** ont montré une très faible internalisation des complexes à 4°C, nettement inférieure à celle des lipoplexes RPR209120/ADN, comme le montre la Figure 72.

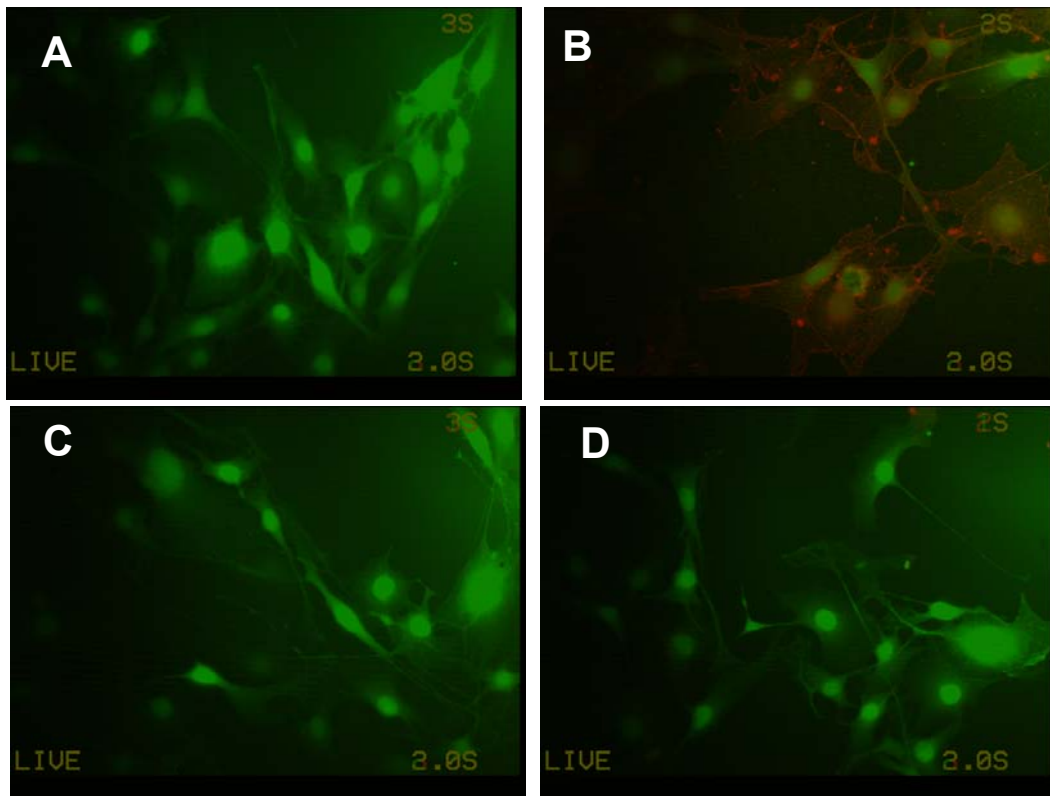


Figure 72 : Internalisation des complexes **57**/ADN et **59**/ADN

- A : Cellules non traitées
- B : RPR 209120/ADN
- C : **57**/ADN
- D : **59**/ADN

Ces résultats permettent d'affirmer que l'entrée des complexes est inhibée à 4°C, et que le mécanisme d'entrée est un processus actif. Quant à sa nature, elle est encore difficile à déterminer. Compte tenu de la toxicité relative des lipopolythiourées **57** et **59** (*cf.* IV.E.1, p.117) et de leur courte chaîne, nous avons envisagé qu'il pourrait s'agir d'un comportement de type détergent.

### **b) Hypothèse de perméabilisation**

Les lipides qui comportent des chaînes de faible longueur peuvent s'insérer dans la membrane cellulaire et modifier localement sa structure, sous forme de pores ou de microdomaines plus perméables. C'est le cas des céramides, dont la toxicité provient

notamment de la formation de pores dans la membrane mitochondriale.<sup>280</sup> Il est en effet remarquable que les lipopolythiourées nécessitent un excès de lipide pour le transfert de gènes. Cet excès de lipide pourrait avoir une activité perméabilisante. Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'influence de l'ajout d'un excès de lipide sur la transfection des complexes **58**/ADN. Pour cela, nous avons réalisé la transfection des complexes **58**/ADN à 10 ou 13 LPT/P, auquel nous avons ajouté un certain nombre d'équivalents de lipide **58** (Figure 73).

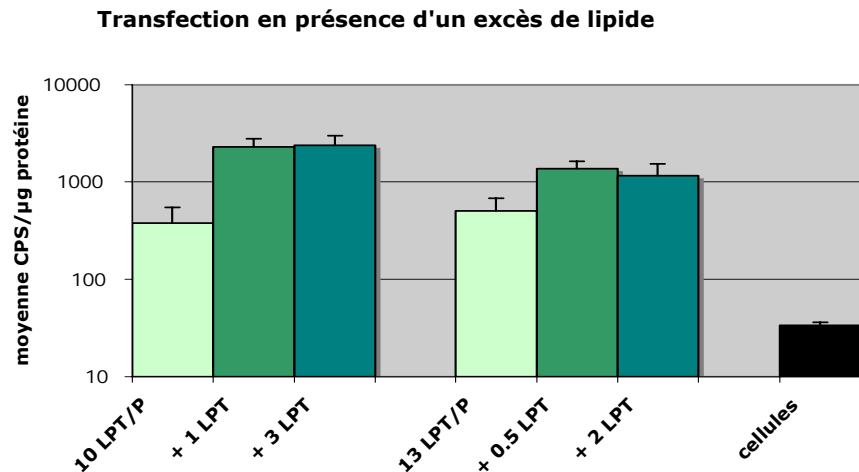


Figure 73 : Transfection des complexes **58**/ADN à 10 et 13 LPT/P, après ajout de lipide **58** libre

Habituellement, les meilleurs résultats de transfection sont obtenus pour des rapports LPT/P plus élevés. En effet, l'efficacité des complexes à 40 LPT/P est 100 fois supérieure à celle des complexes à 10 LPT/P (*cf.* IV.D.1, p.108). Dans cette expérience, l'ajout de lipide libre permet d'améliorer l'efficacité du complexe **58**/ADN à 10 LPT/P aussi bien qu'à 13 LPT/P. Cet excès de lipide semble donc avoir un rôle important, même s'il n'est pas préalablement associé avec l'ADN.

Pour tester une éventuelle perméabilisation des membranes, nous avons effectué une incubation des cellules avec la lipopolythiourée **57** et seulement après 30 minutes nous avons ajouté l'ADN. Aucune transfection n'a été observée, ce qui ne permet pas de conclure quant à l'activité de l'excès de lipopolythiourée sur le mécanisme d'entrée des complexes.

Finalement, ces expériences nous montrent qu'un mécanisme de perméabilisation est possible pour les lipopolythiourées à chaîne courte ; des expériences sont en cours afin de confirmer cette hypothèse. Toutefois, l'efficacité de transfection de **42**, qui possède des chaînes de 14 carbones ne peut pas s'expliquer par ce mécanisme, ce qui nous a encouragés à envisager d'autres hypothèses.

### c) Evaluation de l'interaction avec les GAG

Il a été montré que les lipoplexes cationiques interagissent avec les GAG, extrémités anioniques des protéoglycans<sup>92</sup> (*cf.* I.B.3, p.27). Cette interaction électrostatique peut être inhibée par l'utilisation de sulfate de dextran, qui s'associe aux complexes cationiques et

<sup>280</sup> Siskind L. J., Kolesnick R. N., Colombini M. (2002) Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins, *J. Biol. Chem.*, 277, 26796-26803.



masque l'interaction avec les membranes.<sup>145</sup> Afin d'évaluer l'interaction des complexes **58**/ADN, nous avons réalisé une transfection en présence de dextran (non chargé) et de sulfate de dextran<sup>281</sup> (Figure 74).

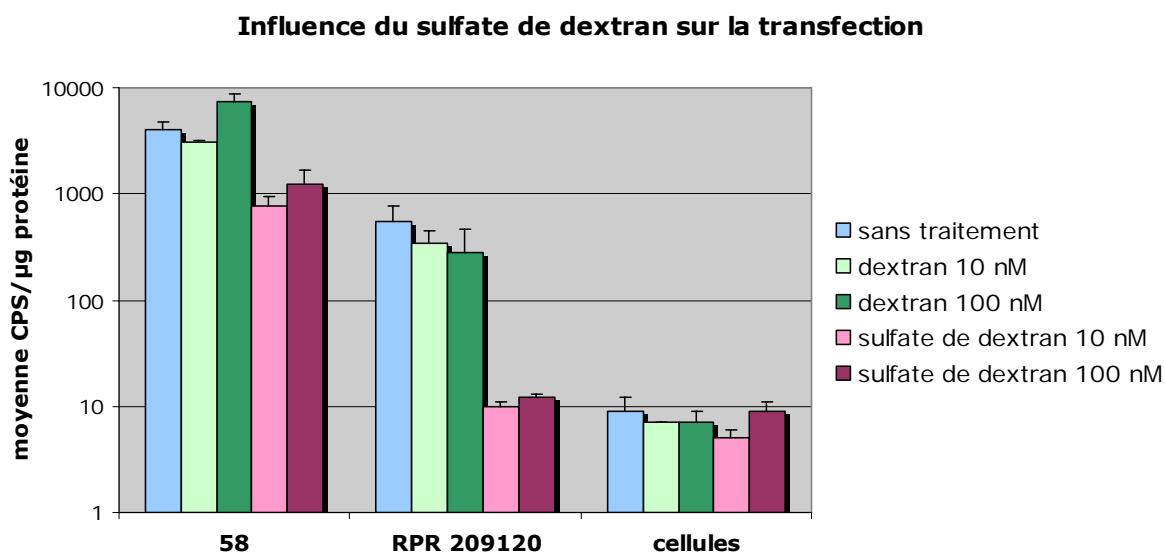


Figure 74 : Influence du sulfate de dextran sur la transfection de **58**

L'ajout de dextran dans le milieu de culture n'a pas d'effet sur l'activité de transfection de la lipopolythiourée **58** ni sur la lipopolyamine RPR 209120. En revanche, l'ajout de sulfate de dextran inhibe complètement la transfection du RPR 209120, ce qui montre que les lipoplexes doivent interagir avec les GAG pour être internalisés. En revanche, cet effet est beaucoup moins prononcé sur les complexes **58**/ADN, puisque la transfection est diminuée de moins d'un facteur 10. Ces résultats nous permettent d'affirmer que les complexes lipopolythiourée/ADN ne nécessitent pas d'interaction avec les GAG pour le transfert de gènes. Ceci nous indique que, du fait de leur absence de charge, les lipopolythiourées ont un mécanisme différent des lipides cationiques.

## 2. Sortie de l'endosome

Quel que soit le mécanisme favorisé pour l'entrée des complexes, nous pouvons observer qu'après 30 minutes d'incubation à 37°C, les complexes sont internalisés, et se retrouvent majoritairement à la périphérie du noyau (Figure 75).

<sup>281</sup> Mounkes L. C., Zhong W., Cipres-Palacin G., Heath T. D., Debs R. J. (1998) Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.*, 273, 167-173.



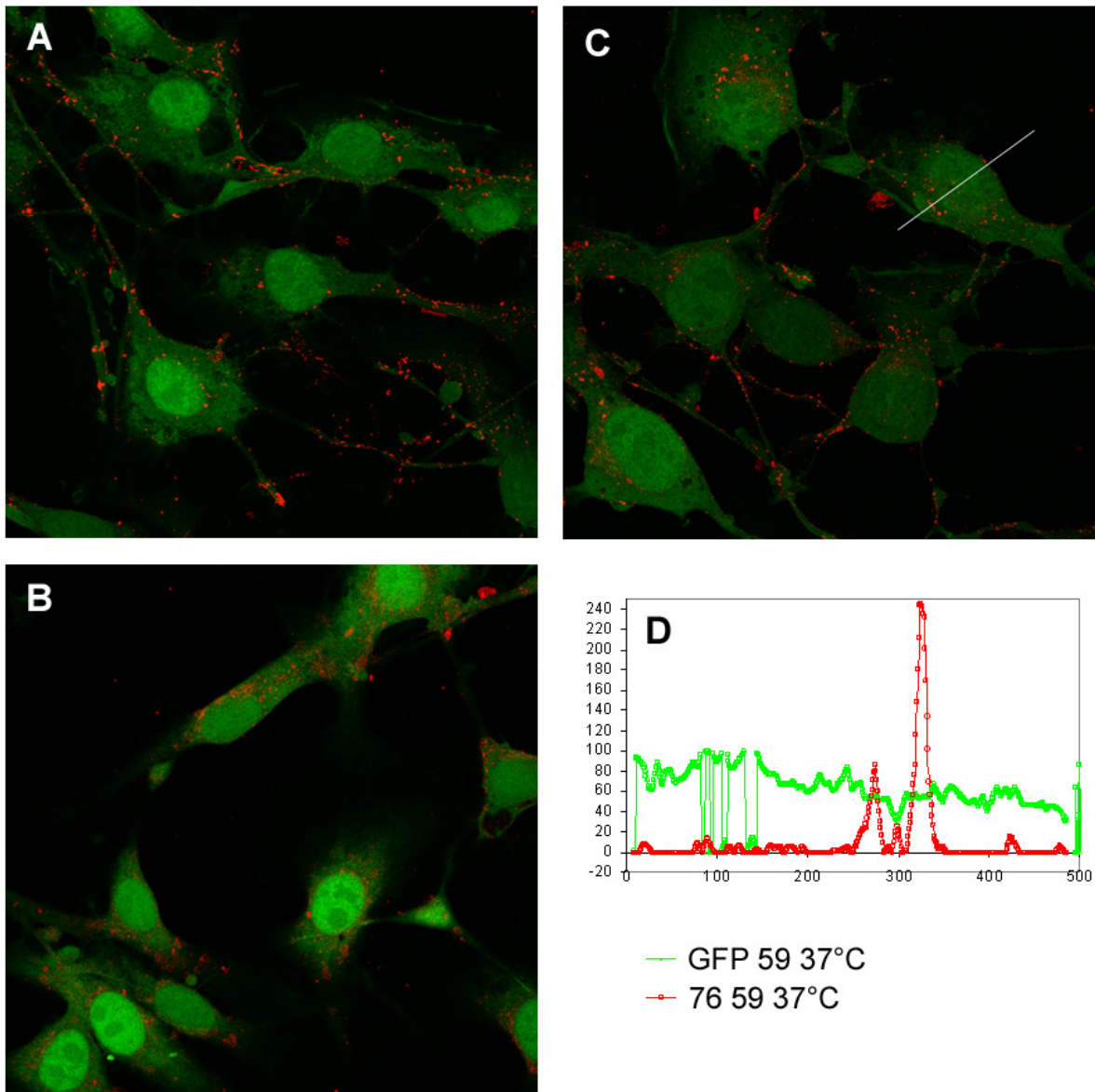


Figure 75 : Internalisation des liposomes de lipopolythiourées après 30 minutes d'incubation à 37°C

A : 57

B : 28

C : 59

D : Fluorescence de la rhodamine et de la GFP selon le segment de l'image B

Ces images permettent d'observer les complexes marqués à la rhodamine à l'intérieur des cellules. Ceci est confirmé par le graphe de fluorescence, où l'on note une intensité forte de rhodamine en un point où la GFP est également exprimée, ce qui signifie que le complexe est dans le cytoplasme. La forme des points rouges nous indique que ces complexes se trouvent probablement dans des vacuoles suite à leur internalisation.

Par ailleurs, peu de différences sont notées entre les lipopolythiourées, puisqu'elles semblent toutes aussi bien internalisées. Par ailleurs, les complexes lipopolythiourée/ADN présentent la même stabilité dans 10% sérum, quelle que soit la longueur de la chaîne (cf. IV.C.4, p.106), et donc probablement la même cinétique de libération de l'ADN. Pourtant, leur efficacité de transfection n'est pas identique, puisque les lipides **57** et **59** ont globalement une meilleure efficacité que les composés **58** et **28** (cf. V.B.4, p.131). Les étapes qui suivent l'internalisation doivent donc être décisives sur l'activité de transfection. La sortie de l'endosome représente une barrière importante au transfert de gènes par les lipides cationiques, puisqu'il est reconnu que la majorité des lipoplexes y restent piégés et sont dégradés dans les lysosomes (cf. I B.3, p.30). Le mécanisme proposé par Szoka pour les lipides cationiques met en jeu la fusion des lipides cationiques et des lipides anioniques des membranes endosomales<sup>101</sup> (Figure 14, p.31). Si cette interaction électrostatique ne peut avoir lieu dans le cas des lipopolythiourées, il est possible d'envisager tout de même un mécanisme de fusion entre les lipides. Les lipides à courte chaîne forment *a priori* des bicouches lipidiques plus fluides et plus flexibles que leurs homologues à plus longue chaîne<sup>172</sup>. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les lipopolythiourées **57** et **59**, du fait de leur chaîne à 10 carbones, permettraient un meilleur échange avec les lipides de la membranes endosomale, ce qui améliorerait la libération de l'ADN, et par là l'efficacité de transfection.

## **D. Conclusion**

Suite à l'évaluation systématique de la famille des lipopolythiourées, nous disposons d'une grande quantité de résultats que nous avons pu exploiter sous plusieurs angles.

D'abord, nous avons établi des relations structure/propriétés sur les lipopolythiourées. En particulier, nous avons montré que la nature des terminaisons et de l'espaceur influence l'hydrophilie des composés, ce qui facilite la formulation. L'activité de transfection du composé **42** indique que la contrainte géométrique du répartiteur a probablement un rôle dans le type de phase lipidique engendré. Néanmoins, le paramètre le plus important semble être la longueur des chaînes aliphatiques puisqu'il est possible d'obtenir une activité de transfection pour les composés comportant une chaîne de 12 ou 10 carbones.

De plus, la formulation n'est plus un problème en ce qui concerne les composés de la famille diglycolique, qui présentent par ailleurs la meilleure efficacité de transfection. La capacité d'interaction des lipopolythiourées avec l'ADN est comparable à celle de la DT3TU, puisque l'association avec l'ADN nécessite le même nombre de fonctions thiourée/phosphate. L'efficacité de transfection *in vitro* et l'amélioration du comportement *in vivo* ont été démontrées au chapitre précédent. Le principal inconvénient de ce système est lié à sa toxicité. Même si nous avons pu la réduire par la modification des techniques de formulation,

comprendre son origine permettrait probablement d'apporter de meilleures solutions à ce problème.

En ce qui concerne le mécanisme, il semble que les lipopolythiourées n'empruntent pas le même mécanisme que les lipides cationiques pour le transfert de gènes, *e.g.* l'interaction avec les GAGs anioniques n'est pas nécessaire. Il s'agit d'un processus actif au cours duquel les complexes se retrouvent internalisés dans des vacuoles à proximité du noyau. Des études sont menées pour évaluer l'hypothèse de perméabilisation des membranes. Par ailleurs, il serait intéressant de quantifier l'ADN qui a pénétré les cellules pour évaluer l'efficacité réelle du transfert de gènes. En effet, du fait de leur absence de charge, nous pouvons supposer que les complexes pénètrent en moins grande quantité que les lipoplexes cationiques, tout en montrant la même efficacité de transfection qu'un système cationique.



## VI. Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse avait pour but de synthétiser de nouveaux vecteurs pour le transfert de gènes. Plus précisément, nous avons choisi de mettre au point des vecteurs sur le modèle de la lipopolythiourée DT3TU. Ce lipide a en effet montré des résultats prometteurs, en particulier *in vivo*, puisqu'il a permis d'améliorer le temps de circulation des complexes ADN/vecteur dans le sang après une injection intraveineuse. Cependant, sa forte hydrophobie a représenté un inconvénient important qui a causé des difficultés de synthèse, de formulation et un manque de reproductibilité des résultats biologiques.

Notre objectif était donc de synthétiser des vecteurs :

- Faciles à synthétiser et rapidement accessibles,
- Qui présentent une large diversité pour envisager des études structure/propriétés,
- Plus hydrophiles que le lipide DT3TU pour une meilleure formulation,
- Qui donnent des résultats biologiques plus reproductibles que le lipide DT3TU.

En ce qui concerne la synthèse, nous avons obtenu seize lipopolythiourées, possédant une tête branchée à deux motifs thiourée, d'une grande diversité. En effet, nous avons synthétisé des lipides comportant une ancre hydrophobe de type cholestérol ou composée de deux chaînes aliphatiques de 10, 12, ou 14 carbones. Les structures se distinguent par leur espaceur (aromatique, succinique, diglycolique, triéthylèneglycol) et leur répartiteur (acétal, dérivé du sérinol ou de la lysine). Enfin, les lipides possèdent des terminaisons variables : méthyle, alcool, diol, diol protégé par un groupe isopropylidène ou imidazole. En outre, la synthèse d'une lipopolythiourée fluorescente a permis le marquage des complexes à la rhodamine, ce qui est essentiel pour les études mécanistiques *in vitro*.

Par ailleurs, les synthèses envisagées présentent, pour la majorité, un nombre d'étapes réduit et un rendement supérieur à celui du lipide DT3TU. Les composés qui ont donné les meilleurs résultats biologiques sont obtenus avec les rendements suivants : **42** : 15%, **57** : 37%, **58** : 5%, **59** : 36%. Néanmoins, il serait intéressant d'optimiser encore la synthèse du composé **58**, par exemple, en changeant de stratégie pour la formation de l'ancre hydrophobe à 12 carbones. Les autres composés ont pu être synthétisés en quantité assez importante pour ne pas limiter les tests biologiques.

Au niveau de la formulation, nous avons pu constater une amélioration majeure de l'hydrophilie des composés par rapport à la DT3TU. Ils ont tous pu être formulés grâce à la DPPC et les lipopolythiourées **28**, **56**, **57**, **58** et **59** sont même capables de former des vésicules sans l'aide de co-lipide. Ce résultat est important car il permet d'accéder directement à l'interaction entre les lipopolythiourées et l'ADN, de confirmer la capacité d'association des lipopolythiourées et d'étudier leur mécanisme *in vitro*. Toutefois, pour améliorer l'efficacité de transfection, il pourrait être intéressant d'associer aux formulations des amphiphiles possédant des propriétés de ciblage ou fusogènes comme la DOPE.

La structure des complexes formés par les lipopolythiourées, avec ou sans ADN, reste encore indéterminée. Il est probable que l'interaction avec l'ADN fasse intervenir des liaisons hydrogène entre les fonctions thiourée et les groupements phosphate de l'ADN ; cependant nous n'avons pas pu le vérifier par RMN. L'étude de dichroïsme circulaire nous montre que l'ADN ne change pas de conformation, même si l'ellipticité est légèrement modifiée, probablement à cause de l'association avec les lipopolythiourées. Enfin, la microscopie électronique montre une organisation sous forme de pelote en présence d'ADN, mais des études, spectroscopiques ou de diffraction des rayons X, permettraient d'apporter de plus amples informations. Saisir la nature et la force de cette interaction est d'un grand intérêt pour comprendre le devenir des complexes dans les cellules, notamment la cinétique de libération de l'ADN.

Les résultats obtenus lors des tests de transfection, en présence des lipides [42](#), [57](#), [58](#) et [59](#), montrent que les lipopolythiourées constituent l'un des rares systèmes non cationiques qui présente une efficacité de transfection comparable aux systèmes cationiques. Toutefois, cette activité s'accompagne d'une certaine toxicité, qu'il est possible de réduire en modifiant les paramètres physico-chimiques, tels que la technique de formulation ou la composition lipidique. La diversité des lipides synthétisés a permis d'établir des relations structure/propriétés. Ainsi, les terminaisons et l'espaceur influent surtout sur la formulation des composés et la longueur de la chaîne semble plus déterminante sur l'activité de transfection. Enfin, l'originalité de ce système a encouragé des études mécanistiques, qui ont montré que les lipopolythiourées, du fait de leur caractère non cationique, n'empruntent pas le même mécanisme que les lipoplexes cationiques ; notamment, les complexes n'interagissent pas avec les GAG des membranes cellulaires. Les perspectives de ce travail sont d'éclaircir encore ce mécanisme, en étudiant par exemple l'hypothèse de perméabilisation des lipides à courte chaîne et leur capacité de fusion avec les membranes. Par ailleurs, il serait intéressant de connaître la quantité de plasmides entrée dans la cellule afin de comparer l'efficacité réelle de transfection des lipopolythiourées avec celle des lipides cationiques.

L'évaluation biologique *in vivo* a montré qu'il est possible de maintenir une activité de transfection du même ordre que le lipide cationique RPR 209120 après une injection intratumorale. Par ailleurs, la circulation des complexes de lipopolythiourée/ADN est comparable à celle d'un liposome conventionnel neutre, ce qui constitue une amélioration notable vis-à-vis d'un système cationique. Il serait intéressant, là encore, d'évaluer la transfection dans les différents organes après une injection systémique et d'utiliser un gène thérapeutique pour appliquer ces systèmes à une pathologie comme le cancer.

Finalement, tous ces résultats montrent que les lipopolythiourées peuvent être considérées comme des vecteurs de gènes à part entière et que ces systèmes, non cationiques, sont particulièrement prometteurs pour une injection systémique dans une optique de thérapie génique.

## VII. Partie expérimentale

### A. Matériel

Les réactifs de départ sont commerciaux (Sigma-Aldrich-Fluka, Acros) et ont été utilisés sans purification supplémentaire, sauf le chlorure de tosyle (recristallisé dans l'éther de pétrole quelques heures avant utilisation), le cholestéryl chloroformate (recristallisé dans l'acétone) et l'anhydride diglycolique (déshydraté sur  $P_2O_5$ ). Nous remercions Isabelle Tranchant pour la synthèse du composé **18**, Pierre-Antoine Nioré pour celle du composé **29**, Marie-José Egron pour le composé **70**.

Les solvants sont fournis par SDS. Le THF est distillé continuellement sur sodium et benzophénone sous atmosphère d'azote. Le toluène est séché sur potasse avant d'être distillé. Le dichlorométhane a été distillé sur  $P_2O_5$ .

Les lipides neutres DPPC, DMPC, DOPE et DOPE-Rhodamine sont commercialisés par Avanti Polar Lipids. Le cholestérol provient d'Aldrich. Nous remercions Michel Bessodes pour la synthèse des éléments de ciblage : le CholPEG<sub>5000</sub>-RGD<sub>4C</sub>, les lipide-PEG-RGD et lipide-PEG-RAD, et Marie Garinot pour la synthèse du DODA-PEG<sub>2000</sub>.

L'ADN plasmidique contient le gène de la luciférase (pVax2luc).

Les cellules utilisées sont des cellules B16 de mélanome de souris. Pour les expériences d'internalisation, les cellules sont modifiées pour exprimer constitutivement la *Green Fluorescent Protein* (GFP). Les transfections sont également réalisées sur HUVEC (Primoculture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine) et Eahy (HUVEC modifiées). Le milieu de culture *Minimum Essential Medium* provient de GibcoBRL.

Les souris saines utilisées sont des souris Swiss Webster (CFW<sup>®</sup>) et les souris porteuses de tumeurs sont des souris C57BL/6 auxquelles des tumeurs 3LL ont été implantées en sous-cutané. Elles sont fournies par Crever SA.

### B. Méthodes

#### 1. Méthodes de purification et d'analyse

##### ➤ Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La cinétique des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince. Elles sont réalisées sur des plaques en plastique, support de gel de silice (Merck 60 F<sub>254</sub>), et révélées par différentes méthodes :

- Rayonnement ultraviolet (254 nm)
- Ninhydrine (200 mg dans 100 mL d'EtOH), avec chauffage
- Acide phosphomolybdique (5g dans une solution 100 mL d'EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95/5), avec chauffage
- Vapeurs d'iode

### ➤ **Chromatographies sur silice**

Les chromatographies sur colonne de silice ont été réalisées sous pression d'air comprimé (chromatographie éclair) sur gel de silice 60 Merck (granulométrie 35-70 $\mu$ m)<sup>282</sup>.

Les purifications appelées « chromatographies sur cartouche » sont des purifications sur des courtes colonnes de gel de silice 60 Merck (rapport produit/gel 1/5) à l'aide d'un dispositif aspirant le solvant. La colonne est équilibrée à l'heptane puis l'échantillon est déposé en solution dans un minimum de dichlorométhane. La colonne est éluée par dix fractions d'un mélange heptane/acétate d'éthyle, sauf mention particulière, d'un volume est égal au volume de silice. Pour chaque fraction on augmente la quantité d'acétate d'éthyle de 10%, afin de passer de 100 % d'heptane à 100 % d'acétate d'éthyle.

Les chromatographies en phase inverse sont effectuées sur des courtes colonnes en phase inverse Supelco (Supelclean C8 phase inverse) à l'aide d'un dispositif aspirant le solvant. La colonne est équilibrée à l'eau puis éluée par des fractions d'un mélange en gradient H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/MeOH.

### ➤ **Résonance Magnétique Nucléaire**

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Advance DRX Bruker, à 300,13 MHz pour le <sup>1</sup>H et 75, 47 MHz pour le <sup>13</sup>C, découplé du proton. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm), par rapport au trétraméthylsilane (TMS). La multiplicité des signaux est exprimée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), p (pentuplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet). Les constantes de couplage sont exprimées en Herz (Hz).

### ➤ **Spectroscopie InfraRouge**

Les spectres IR sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Nicolet 120. Les bandes sont exprimées en cm<sup>-1</sup>.

### ➤ **Point de fusion**

Ils sont mesurés à l'aide d'un microscope DRP Cogit équipé d'une plateforme thermostatée (thermostat Reichert). Ils sont exprimés en degrés centigrades.

### ➤ **Analyses élémentaires et masse haute résolution (HR-ESMS)**

Elles sont réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison (69).

### ➤ **Analyses CHLP**

Elles sont réalisées d'une part sur un appareil WATERS LC 4000 équipé d'un détecteur à barrettes de diodes Waters 996, avec comme colonne analytique (l = 250 mm, d.i. = 4,6 mm) :

- VYDAC Protein C4,
- VYDAC reverse phase C8,
- Econosphère C18 5U.

Les éluants sont des systèmes constitués de H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%, CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,05% et de MeOH.

D'autre part les analyses sont effectuées sur un appareil SHIMADZU LCSM-2010 A, équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M10 A (lampe D<sub>2</sub>&W, balayage de 190 à 600nm), d'un détecteur de masse LCSM-2010 A (ESI) et d'un détecteur à diffusion de lumière ELSD-LT. L'unique colonne utilisée est une colonne analytique Alltech (C8, phase

---

<sup>282</sup> Still W. C., Kahn M., Mitra A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, 43, 14, 2923-2925.



inverse, l = 53mm, d.i. = 7mm), Les éluants sont H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,1% et CH<sub>3</sub>CN/HCOOH 0,1%.

Les gradients utilisés sont les suivants :

Nom	Appareil	t (min)	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN	MeOH	Débit (mL/min)
<b>Gradient W1</b>	WATERS LC 4000	0	20%	-	20%	1
		1	20%	-	80%	1
		35	0%	-	100%	1
		70	0%	-	100%	0
<b>Gradient W2</b>	WATERS LC 4000	0	-	100%	0%	1
		1	-	100%	0%	1
		50	-	0%	100%	1
		70	-	0%	100%	0
<b>Gradient W3</b>	WATERS LC 4000	0	100%	0%	0%	1
		1	100%	0%	0%	1
		15	0%	100%	0%	1
		50	0%	0%	100%	1
		60	0%	0%	100%	0
<b>Gradient W4</b>	WATERS LC 4000	0	70%	30%	0%	1
		1	70%	30%	0%	1
		25	0%	100%	0%	1
		50	0%	0%	100%	1
		60	0%	0%	100%	0
<b>Gradient S1</b>	SHIMADZU LCSM-2010	0	70%	30%	-	1
		1	70%	30%	-	1
		5	0%	100%	-	1
		12	0%	100%	-	1
		15	70%	30%	-	1
		20	70%	30%	-	0
<b>Gradient S2</b>	SHIMADZU LCSM-2010	0	70%	30%	-	1
		15	0%	100%	-	1
		20	0%	100%	-	1
		30	70%	30%	-	0

Tableau 16 : Gradients utilisés en CHLP

## 2. Méthodes physico-chimiques

### ➤ Préparation des liposomes

- **Injection éthanolique** : les lipides sont solubilisés dans un minimum d'éthanol (dans un mélange acétone/chloroforme/éthanol s'il y a des problèmes de solubilité). Cette solution est additionnée goutte à goutte, sous vive agitation dans 10 volumes d'eau mQ. Le mélange est agité pendant une nuit puis évaporé sous vide à température ambiante.

*Exemple* : 5 mg de **59** sont dissous dans 500 µL d'éthanol, et 230 µL de cette solution (3µmol de **59**) sont ajoutés goutte-à-goutte dans une solution de 2,3 mL d'eau mQ sous forte agitation. Après une nuit d'agitation, le mélange turbide est évaporé sous vide sans chauffage, jusqu'à obtention d'une solution de 440 µL, soit une concentration de 6,8 mM.

- **Hydratation d'un film lipidique** : le lipide et le co-lipide sont solubilisés mole à mole dans le chloroforme, préalablement passé sur albumine pour enlever toute trace d'acide. Le milieu est évaporé progressivement jusqu'à obtention d'un film lipidique homogène. L'eau mQ est ajoutée doucement et le mélange est agité à l'évaporateur

rotatif. La suspension obtenue est éventuellement soniquée pour former une suspension homogène de liposomes.

*Exemple* : **42** (1,77 mg, 2  $\mu$ mol) et la DPPC (1,47 mg, 2  $\mu$ mol) sont dissous dans 500  $\mu$ L de chloroforme. Après évaporation, 400  $\mu$ L d'eau mQ sont ajoutés pour avoir une concentration de 5  $\mu$ M en **42**.

#### ➤ **Mesure de taille et de potentiel zêta**

Le diamètre hydrodynamique des particules et leur potentiel zêta sont mesurés à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano Series MALVERN. Les échantillons sont placés dans une cuve en plastique appropriée. Pour la mesure de taille, environ 1 $\mu$ L d'une solution échantillon 10mM est dilué dans 900 $\mu$ L d'eau mQ. Trois mesures successives sont réalisées sous un angle de 90°C, et ne sont prises en compte que si les critères de validité (fournis par Malvern) sont remplis. Le diamètre des particules est donné en nm avec un indice de polydispersité compris entre 0 et 1. Pour la mesure de potentiel zêta, 10 $\mu$ L d'une solution échantillon 10mM sont dilués dans 900 $\mu$ L de NaCl 20mM. Trois mesures sont réalisées systématiquement. Le potentiel zêta est exprimé en mV.

#### ➤ **Préparation des complexes lipopolythiourée/ADN**

L'ADN plasmidique (0,2 g/L dans l'eau mQ) est ajouté volume à volume à une solution de liposomes agitée par vortex puis laissée au repos pendant 4h environ.

#### ➤ **Mesure du fluorescence du Picogreen**

Les échantillons (volume correspondant à 40 ng d'ADN) sont déposés sur une plaque 96 puits et 100 $\mu$ L de picogreen (dilué 200 fois dans le tris-borate EDTA 1N (TBE)) sont ajoutés dans chaque puits. La mesure est réalisée à l'aide de l'appareil Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer. Le pourcentage de fluorescence est obtenu par la calcul suivant :  
 $\% \text{ fluo} = (\text{mesure} - \text{bf}) / (\text{ADN} - \text{bf})$  où bf est la mesure de fluorescence du picogreen seul, et ADN la valeur mesurée pour l'ADN seul.

#### ➤ **Migration électrophorétique sur gel d'agarose**

Sur un gel d'agarose (0,8g d'agarose dans 100mL de TBE) sont déposés 30 $\mu$ L de complexes lipopolythiourée/ADN (correspondant à 0,3  $\mu$ g d'ADN) ainsi que 5 $\mu$ L de bleu de bromophénol. Le gel est soumis à un courant électrique de 80V pendant une heure. L'ADN est révélé par incubation du gel dans une solution de BET (50  $\mu$ L de BET dans 200mL de TBE 1N), qui est ensuite placé sous une lampe U.V.

#### ➤ **Microscopie électronique à transmission**

Les complexes lipopolythiourée/ADN sont déposés sur une grille de Formvar/carbone en cuivre (200 mesh) fournie par Agar Scientific. L'acétate d'uranyle a été utilisé comme agent de contraste. Les analyses ont été réalisées sur un microscope JEOL, JEM 100S.

#### ➤ **Dosage des amines à la fluorescamine**

Sur les échantillons de concentration croissante en lipide (complétés à 900  $\mu$ L par le TBE 1N) sont ajoutés 100  $\mu$ L de fluorescamine (0,3M dans l'acétone). La mesure de la fluorescence est réalisée sur une appareil Perkin Elmer LS50B. Elle est lue à 480 nm après excitation à 390 nm.

### ➤ **Titration acido-basique**

Dans un petit bécher sont placés 6mL d'eau distillée auxquels sont ajoutés 100µL de NaCl 20mM. 0,06 µmol d'échantillon sont ajoutés, afin d'obtenir une concentration de 10µM. Des volumes successifs (environ 25µL) de HCl 100µM ou NaOH 100µM sont ajoutés sous agitation. L'agitation est arrêtée pour la mesure du pH. Cette dernière se fait grâce au pH-mètre Mettler TOLEDO MP220, l'électrode est une Electrode InLab 410, pH0-14, 0-100°C, électrolyte 9823.

### ➤ **Dichroïsme circulaire**

L'échantillon d'ADN (14µg dans 240 µL) est introduit dans une cuve de verre et des quantités progressives de lipopolythiourée (environ 10mM) sont ajoutées. Le spectre est enregistré sur l'appareil JOBIN YVON CD6. 4 scans successifs de 190 à 350 nm sont enregistrés puis moyennés. L'ellipticité est donnée en deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>.

### ➤ **Stabilité dans le sérum**

Sur 20µL de complexes lipopolythiourée/ADN (0,1g/L d'ADN) sont ajoutés 20µL de milieu de culture à 10% de sérum. Les échantillons sont placés à 37°C. A 6h, un aliquot de 10µL de chaque échantillon est prélevé et conservé à -4°C. A 24h, tous les échantillons sont replacés à température ambiante. Sur 10µL de ces échantillons sont ajoutés 5µL SDS 2%, 2µL EDTA 0.5M et 3 µL de bleu de bromophénol. Ce mélange est déposé sur un gel d'agarose (1g d'agarose dans 100 mL de TBE 1N avec 0.05%SDS). Le gel est soumis à une tension de 80V pendant une heure, puis lavé dans un bain d'eau pendant 24h. L'ADN est révélé après incubation dans le BET (50µL de BET dans 200mL de TBE 1N) sous lampe U.V.

### ➤ **Formulation automatisée**

La formulation automatisée a été réalisée à l'aide du robot Chemspeed ASW 2000, sur un banc de 16 réacteurs en verre de 13mL. Les produits sont manipulés grâce à un bras automatisé et prélevés par une seringue de 10mL.

## **3. Méthodes biologiques**

### ➤ **Culture cellulaire**

Des cellules B16, dérivées de mélanome de souris, ou Eahy, dérivées des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, sont mises en culture dans un milieu de culture Minimum Essential Medium, auquel sont ajoutés de la L-Glutamine à 29,2mg/mL, 50 unités/mL de pénicilline, 50 unités/mL de streptomycine et une solution d'acides aminés non essentiels. Les cellules sont cultivées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> ventilées et incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub> (5%).

### ➤ **Transfection**

Un jour avant la transfection, les cellules sont décollées de leur support grâce à une solution de trypsine-EDTA. La trypsine est une enzyme protéolytique qui clive la matrice cellulaire ainsi que les protéines. L'EDTA permet, par chélation des ions calcium et magnésium, de détacher les cellules entre elles et d'ouvrir la voie à l'action de la trypsine. Les cellules décollées sont déposées dans des plaques 24 puits à raison de 45 000 cellules par puits environ et incubées dans le milieu MEM. Après 24 heures, elles sont approximativement à 80% de confluence. 200µL de complexes lipopolythiourée/ADN (correspondant à 0,5 µg d'ADN), préparés 4 heures avant la transfection, sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 48 heures à 37°C.

### ➤ **Dosage des protéines**

Les cellules transfectées sont lavées deux fois avec 500µL de PBS (tampon phosphate) puis lysées par ajout de 200µL de tampon de lyse comprenant du SDS (2,5%), du TRIS (50mM) à un pH de 7,5. Après 15 minutes, les cellules sont transférées dans un eppendorff et centrifugées à 12 000 tours/minute pendant 5 minutes. Dans une plaque transparente 96 puits, 10µL de surnageant sont déposés puis 10µL d'iodoacétamine sont ajoutés et la plaque est incubée à 37°C pendant une heure. Le réactif de dosage BCA (kit de dosage Protein Assay kit) est ajouté dans les puits et l'absorbance est lue à 562 nm sur le Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer. Grâce à une gamme étalon préalablement établie (avec l'albumine de sérum bovin), cette luminescence peut être reliée à la concentration en protéine de chaque puits.

### ➤ **Dosage de l'activité luciférase**

Dans une plaque 96 puits blanche sont déposés 10µL de surnageant issu de la lyse des cellules (*cf.* ci-dessus). Le luminomètre verse 50µL de luciférine, substrat de la luciférase, dans chaque puits. L'activité luciférase est dosée sur l'appareil Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer, par émission de lumière en présence de lumière, de coenzyme A et d'ATP pendant 10 secondes et rapportée à 2000 cellules. L'activité luciférase est ainsi exprimée en unité de lumière relative (RLU) et normalisée avec la concentration de protéines de l'échantillon (*cf.* ci-dessus). Elle est finalement exprimée en RLU/µg de protéine.

### ➤ **Internalisation des complexes lipopolythiourée/ADN**

Un jour avant la transfection, les cellules sont déposées dans des plaques 12 puits équipés de lamelles de verre, à raison de 65 000 cellules par puits, et incubées à 37°C dans le milieu MEM pendant 24h. 200 µL de complexes lipopolythiourée/ADN (correspondant à 0,5µg d'ADN) comportant 0,5% molaire de lipopolythiourée **76** fluorescente sont ensuite déposés dans chaque puits. Après 24h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés deux fois au PBS, et 500µL de PFA dans 3% de PBS sont ajoutés. Les plaques sont laissées 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante, avant d'être à nouveau lavées deux fois au PBS. Le DAPI est ajouté à son tour (0,1µg/mL dans 500µL de PBS). Après 30 minutes d'obscurité, les plaques sont lavées au PBS, à l'eau, puis montées au mowiol. L'observation est faite sur un microscope ZEISS Axiophot non inversé (objectif x40 à immersion), ou sur un microscope confocal TCS SPII Leika.

### ➤ **Évaluation de la toxicité *in vitro***

La toxicité est évaluée par un test colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5)-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Un jour auparavant, les cellules B16 sont déposées dans des plaques 96 puits à raison de 50 000 cellules par puits, et incubées 24h à 37°C sous atmosphère contrôlée de CO<sub>2</sub> (5%). 100µL de solution de lipopolythiourée sont ensuite déposés dans chaque puits. Après 48h d'incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu de culture est remplacé par 100µL d'une solution de MTT à 0,5g/mL. Les plaques sont incubées deux heures et demie à 37°C puis les cellules sont lysées par 100µL de tampon (10g de triton X100, 10mL de HCl 1N dans 100mL d'isopropanol). L'absorption est lue à 562 nm sur l'appareil Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer.

### ➤ **Évaluation de la toxicité aiguë *in vivo***

Différentes doses de lipopolythiourées, ou de complexes lipopolythiourée/ADN, sont injectées à des groupes de souris Swiss (3 animaux par échantillon, et 3 témoins). Les animaux sont observés quotidiennement sur une période de 14 jours, en ce qui concerne le

poids, le changement de la peau et du poil, les yeux et les muqueuses, la respiration, la circulation, le système nerveux central et autonome, et l'activité locomotrice. La dose est considérée toxique si l'un des animaux d'un groupe meurt.

### ➤ Transfection intratumorale

Les complexes lipopolythiourée/ADN sont injectés dans un volume de 30µL (correspondant à 3µg d'ADN, 20 TU/P) dans les deux muscles tibial crânial de souris C57BL/6 porteuses de tumeurs 3LL, anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine. Les souris sont sacrifiées 96 heures après l'injection et les muscles sont prélevés et broyés dans 1mL de tampon de lyse, et sont centrifugés 10 minutes à 12 000 tours/minute à 4°C). 10 µL de surnageant sont déposés sur une plaque 96 puits pour le dosage de la luciférase (cf. ci-dessus).

### ➤ Études de biodistribution

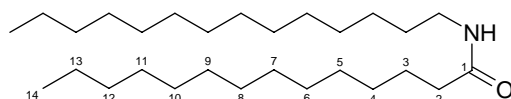
200µL de complexes de lipopolythiourée/ADN contenant 0,5% molaire de la lipopolythiourée **76** fluorescente (20 TU/P, 11µg d'ADN) sont injectés dans la veine caudale de souris C56BL/6 porteuses de tumeurs 3LL, anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine. Deux heures après l'injection, le sang est prélevé par ponction intracardiaque. Les souris sont sacrifiées et le foie, la rate, la tumeur et les poumons sont immédiatement prélevés, pesés et homogénéisés dans du PBS (5µL/mg de tissu). Les lipides sont extraits à partir de 100µL de sang et des homogénats des organes avec 3mL d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1, par agitation vigoureuse pendant 45 minutes puis par centrifugation (1000 tours/minute pendant 5 minutes). La fluorescence est lue à 590 nm dans le surnageant à l'aide de l'appareil Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer, après excitation à 550 nm.

## C. Synthèses et description des produits

### ➤ N,N-Tétradécyl,tétradécanamide (1)

C<sub>28</sub>H<sub>57</sub>NO

M = 423.77 g.mol<sup>-1</sup>



30 g d'acide tétradécanoïque (132 mmol) et 30 g de tétradécylamine (141 mmol) sont chauffés pendant 4 heures à 150°C sous pression réduite (50 mmHg) dans un ballon équipé d'un agitateur magnétique relié à un ballon contenant un agent desséchant (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Le produit résultant est ensuite dissous dans 700 mL de THF en présence d'Amberlyst-15 (8,6 g, 18,4 eq/mmol), pour fixer l'excès d'amine. Après 30 minutes d'agitation, la solution est filtrée et concentrée pour obtenir 55,7 g d'un solide blanc (99%).

PF = 83 °C

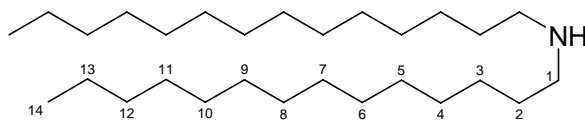
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.88 (t, 6H, J = 6.5 Hz, H-14 et H-14'), 1.25 (m, 42H, H-4-H-13 et H-3'-H-13'), 1.47 (m, 2H, H-3), 1.60 (m, 2H, H-2'), 2.15 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H-2), 3.23 (dt, 2H, J = 7.5 Hz, H-1'), 5.55 (s, 1H, NH)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.09 (C-14 et C-14'), 22.71 (C-13 et C-13'), 25.90 (C-3), 29.99 (C-2'), 29.69 (C-4-C-11 et C-3'-C-11'), 31.96 (C-12 et C-12'), 36.97 (C-2), 39.56 (C-1'), 171.02 (C-1)

➤ **N,N-Ditétradécylamine (2)**

C<sub>28</sub>H<sub>59</sub>N

M = 409.79 g.mol<sup>-1</sup>



La ditétradécylamide **1** (20 g, 47,3 mmol) est dissoute dans 700 mL de THF anhydre fraîchement distillé, sous atmosphère d'azote. L'hydruure de lithium et d'aluminium (3,4 g, 89 mmol) est ajouté par portions à 0°C. Le mélange est ensuite chauffé au reflux pendant 16 heures. La réaction terminée, le milieu réactionnel est refroidi par un bain de glace. L'excès d'hydruure est détruit par l'addition successive de 3,5 mL d'eau, 6,8 mL de NaOH 2N, puis 3,5 mL d'eau. Après 30 minutes d'agitation vigoureuse à température ambiante, le mélange est filtré et le filtrat est évaporé pour obtenir 17,7 g de solide blanc (92%).

PF = 56°C

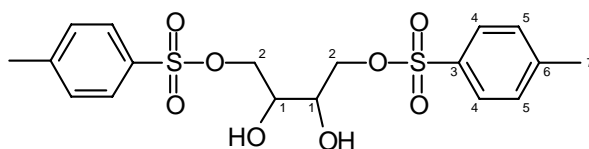
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, J = 6.5 Hz, H-14), 1.25 (m, 44H, H-3-H-13), 1.46 (m, 2H, H-2), 2.58 (t, 4H, J = 7.0 Hz, H-1)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.06 (C-14), 22.69 (C-13), 27.48 (C-3), 29.69 (C-4-C-11), 30.36 (C-2), 31.96 (C-12), 50.15 (C-1)

➤ **2,3-dihydroxy-1,4-di-para-toluènesulfonyloxy-butane (3)**

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

M = 430.50g.mol<sup>-1</sup>



Une solution de chlorure de tosylo fraîchement recristallisé (15,6 g, 82 mmol) dans 60 mL de dichlorométhane anhydre est additionnée goutte à goutte sur une solution de D,L-threitol (5,0 g, 41 mmol) dans la pyridine anhydre (16,6 mL, 205 mmol), sous atmosphère d'azote à -20°C sur une période de 5 heures. Le milieu est agité à 0°C pendant une nuit, avant d'être évaporé. Une solution d'HCl 1N (100 mL) est versée sur l'huile résiduelle, qui est extraite 6 fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution de saumure, séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrées et évaporées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne (éluant : heptane/AcOEt 6:4), pour obtenir 9,1 g d'huile (52%).

PF = 83 °C

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.44 (s, 6H, H-7), 2.95 (m, 2H, OH), 3.88 (m, 2H, H-1), 4.05 (d, 4H, J = 5Hz, H-2), 7.35 (d, 4H, J = 8.1 Hz, H-5), 7.88 (d, 4H, J = 8.1 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 21.80 (C-7), 68.62 (C-1), 71.05 (C-2), 128.96 (C-5), 130.21 (C-4), 132.68 (C-3), 145.81 (C-6)

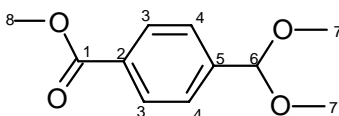
**CLHP** : 9.25 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\max}$  = 231 et 261 nm,  $m/z$  = 431 (M+H)<sup>+</sup>, 453 (M+Na)<sup>+</sup>, 475 (M+Cl)<sup>-</sup>, 96%

**Analyse élémentaire** :      Calculé      C = 50.22 ; H = 5.15 ; N = 14.90  
   Trouvé      C = 50.21 ; H = 5.35 ; N = 14.64

➤ **4-Diméthoxyméthyl-benzoate de méthyle (4)**

C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

M = 164.16 g.mol<sup>-1</sup>



Le chlorure de thionyle (24,3 mL, 334 mmol) est additionné, goutte-à-goutte, sur une solution de 4-carboxybenzaldehyde (5,0 g, 33 mmol) dans 300 mL de méthanol anhydre, sous atmosphère d'azote, à 0°C sur une période d'une heure. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 18 heures, puis évaporé à sec. Le liquide est distillé pour donner 5,5 g de liquide incolore (quantitatif).

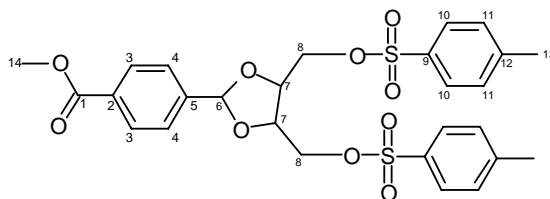
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 3.30 (s, 6H, H-7), 3.88 (s, 3H, H-8), 5.47 (s, 1H, H-6), 7.50 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, H-4), 8.02 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, H-3)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 52.16 (C-7), 53.05 (C-8), 102.89 (C-6), 127.03 (C-4), 129.81 (C-3), 130.23 (C-2), 143.25 (C-5), 166.83 (C-1)

➤ **4-[4,5-Bis-(toluène-4-para-sulfonyloxyméthyl)-1,3-dioxolan-2-yl]-benzoate de méthyle (5)**

C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>

M = 576.65 g.mol<sup>-1</sup>



Le diol **3** (1,07 g, 2,5 mmol), l'acide paratoluène sulfonique monohydrate (48 mg, 0,25 mmol), et l'acétal **4** (0,58 g, 2,75 mmol) dans 30 mL de benzène anhydre, sont chauffés à reflux pendant 5 heures avec un appareil de type Dean-Stark. La réaction est arrêtée par ajout de 0,5 mL de pyridine, puis le mélange est évaporé. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : heptane/AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4 : 1 : 1 puis 4 : 4 : 1) pour obtenir 1,08 g de solide clair (75%).

PF = 130°C

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 2.45 (s, 6H, H-13), 3.96 (s, 3H, H-14), 4.14 (m, 2H, H-7), 4.22 (m, 4H, H-8), 5.82 (s, 1H, H-6), 7.28-7.37 (m, 6H, H-4 et H-11), 7.71-7.77 (m, 4H, H-10), 7.97 (d, 2H,  $J$  = 7.5 Hz, H-3)

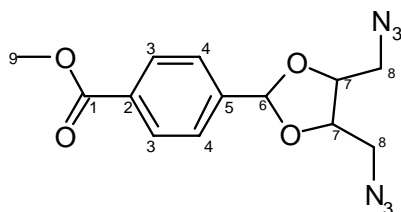
$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.80 (C-13), 52.36 (C-14), 68.51 (d, C-8), 75.68 (d, C-7), 103.98 (C-6), 126.59 (C-4), 128.10 (C-10), 129.74 (C-3), 130.17 (C-11), 131.23 (C-2), 132.14 (C-9) 141.12 (C-5), 145.61 (C-12), 166.71 (C-1)

CLHP : 10.32 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 236$  nm,  $m/z = 577$  (M+H)<sup>+</sup>, 100%

Analyse élémentaire :	Calculé	C = 56.24 ; H = 4.89 ; S = 11.12
	Trouvé	C = 55.65 ; H = 5.01 ; S = 11.44

➤ **4-(4,5-Bis-azidométhyl-1,3-dioxolan-2-yl)-benzoate de méthyle (6)**

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4$   
 $M = 318.29$  g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange de dérivé ditosylé **5** (1,48 g, 2,5 mmol) et d'azoture de sodium (0,97 g, 15,0 mmol) dans 25 mL de DMF anhydre est chauffé à reflux pendant 15 heures. Le solvant est ensuite coévaporé à l'aide du toluène. Le résidu huileux est partagé entre l'acétate d'éthyle (20 mL) et une solution saturée de NaCl (30 mL). La phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et concentrées. L'huile jaune obtenue (0,75 g, 94%) ne nécessite pas de purification supplémentaire.

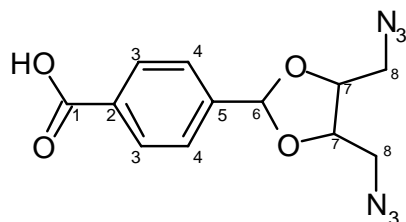
$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.49 et 3.60 (m, 4H, H-8), 3.90 (s, 3H, H-9), 4.20 (m, 2H, H-7), 6.03 (s, 1H, H-6), 7.57 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-4), 8.06 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-3)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 51.88 (C-8), 52.24 (C-9), 77.54 et 78.36 (C-7), 103.58 (C-6), 126.56 (C-4), 129.83 (C-3), 131.32 (C-2), 141.57 (C-5), 166.72 (C-1)

CLHP : 9.90 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 230$  nm,  $m/z = 378$  (M+CH<sub>3</sub>COO)<sup>-</sup>, 82%

➤ **Acide 4-(4,5-Bis-azidométhyl-1,3-dioxolan-2-yl)-benzoïque (7)**

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4$   
 $M = 304.27$  g.mol<sup>-1</sup>



L'ester **6** (1,02 g, 3,2 mmol) est traité par une solution d'hydroxyde de sodium (0,64 g, 16,0 mmol) dans un mélange eau/méthanol/THF (1:1:1, v/v/v, 45 mL) à température ambiante, jusqu'à disparition de l'ester de départ. Le milieu est alors acidifié par HCl 2N glacé jusqu'à



pH 3, puis extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée une fois par une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrée et concentrée pour obtenir 0,94 g d'huile jaune (97%).

PF = 40°C

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.44-3.67 (m, 4H, H-8), 4.23 (m, 2H, H-7), 6.07 (s, 1H, H-6), 7.61 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-4), 8.15 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-3)

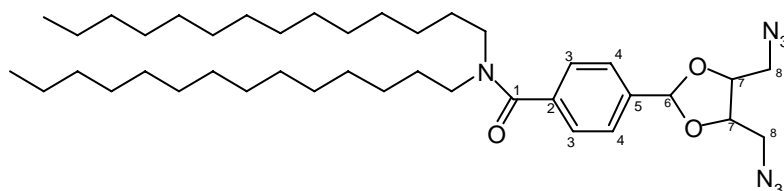
$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 51.80 (C-8), 77.54 et 78.36 (C-7), 103.48 (C-6), 126.71 (C-4), 130.50 (C-3), 131.31 (C-2), 142.39 (C-5), 171.85 (C-1)

CLHP : 8.86 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm,  $m/z = 302$  (M-H) $^-$ , 348 (M+HCOO) $^-$ , 98%

➤ **4-(4,5-Bis-azidométhyl-1,3-dioxolan-2-yl)-N, N-ditétradécyl-benzamide (8)**

$\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_3$

$M = 696.04$  g.mol $^{-1}$



Une solution de chloroformate d'isobutyle (0,23 mL, 1,8 mmol) dans 3 mL de THF anhydre est additionnée lentement à une solution refroidie à -40°C d'acide **7** (0,54 g, 1,8 mmol) et de N-méthylmorpholine (0,20 mL, 1,8 mmol) dans 30 mL de THF anhydre. Après une heure d'agitation à -40°C, le milieu est traité par une solution de ditétradécylamine **2** (0,68 g, 1,8 mmol) et de N-méthylmorpholine (0,20 mL, 1,8 mmol) dans 5 mL de THF anhydre. Le mélange trouble est agité vigoureusement jusqu'au retour à t.a., puis pendant encore 20 heures. Le mélange réactionnel est ensuite dilué par 150 mL d'acétate d'éthyle et 150 mL d'eau, la phase organique est décantée, puis la phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques rassemblées sont lavées deux fois par une solution de HCl 1N, deux fois par une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , et enfin deux fois par une solution saturée de NaCl. Après séchage ( $\text{MgSO}_4$ ), filtration, et concentration, le produit brut est purifié par chromatographie éclair (éluant : AcOEt/heptane 1:4 puis 3:7) pour obtenir 0,55 g d'huile claire (46%).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.9$  Hz, H-14'), 1.21-1.46 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.63 (m, 4H, H-2'), 3.14 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 3.38-3.63 (m, 6H, H-1' et H-8), 4.20 (m, 2H, H-7), 6.01 (s, 1H, H-6), 7.37 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, H-4), 7.52 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, H-3)

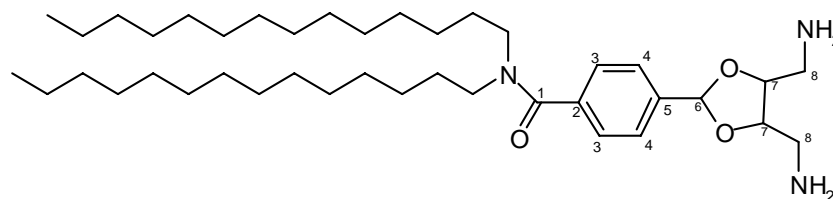
$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.20 (C-14'), 22.78 (C-13'), 27.17 (C-3'), 28.77 (C-2'), 29.73 (C-4'-C11'), 32.01 (C-12'), 44.76 et 49.04 (C-1'), 51.85 (C-8), 77.41 et 78.26 (C-7), 103.82 (C-6), 126.69 (C-3 et C-4), 137.57 (C-2), 138.76 (C-5), 171.09 (C-1).

CLHP : 18.34 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 198$  nm,  $m/z = 697$  (M+H) $^+$ , 99%

➤ **4-(4,5-Bis-aminométhyl-1,3-dioxolan-2-yl)-N, N-ditétradécyl-benzamide (9)**

$\text{C}_{40}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_3$

$$M = 644.05 \text{ g.mol}^{-1}$$



Le diazide **8** (0,35 g, 0,5 mmol) est dissous dans 10 mL d'éthanol absolu. Le palladium sur charbon activé est ajouté (50 mg) et le milieu réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité pendant 19 heures. Le mélange réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré pour obtenir une huile claire (310 mg, 96%).

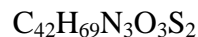
$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.84 (t, 6H,  $J = 6.9$  Hz, H-14'), 1.04-1.46 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.56 (m, 4H, H-2'), 2.99-3.40 (m, 8H, H-1' et H-8), 4.24 (m, 2H, H-7), 5.97 (s, 1H, H-6), 6.40 (m, 4H, NH<sub>2</sub>), 7.28 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, H-4), 7.55 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, H-3)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.12 (C-14'), 22.71 (C-13'), 27.25 (C-3'), 28.82 (C-2'), 29.73 (C-4'-C11'), 31.97 (C-12'), 41.33 et 42.16 (C-8), 45.02 et 49.24 (C-1'), 77.63 et 78.65 (C-7), 102.87 (C-6), 126.51 (C-4), 127.31 (C-3), 138.16 (C-2 et C-5), 171.29 (C-1).

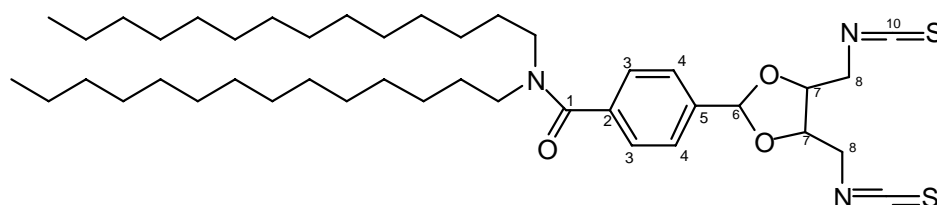
**CLHP (1)** : 38.4 min, gradient W1, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 190$  nm.

**CLHP (2)** : 10.12 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 190$  nm,  $m/z = 645$  (M+H)<sup>+</sup>, 323 ((M+2H)/2)<sup>+</sup>, 92%

➤ **4-(4,5-Bis-isothiocyanatométhyl-1,3-dioxolan-2-yl)-N, N-ditétradécyl-benzamide (10)**



$$M = 728.16 \text{ g.mol}^{-1}$$



A une solution de diamine **9** (0,32 g, 0,5 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre, sont ajoutés sous atmosphère d'azote 0,26 mL de DIPEA (1,5 mmol) et 0,12 mL de disulfure de carbone (2 mmol). Après 1h30 d'agitation, une solution de chlorure de paratoluènesulfonyle fraîchement recristallisé (0,19 g, 1 mmol) dissous dans 3 mL de dichlorométhane anhydre est additionnée goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 heures. Il est ensuite dilué au dichlorométhane, puis lavé trois fois par une solution de NaCl saturée, séché (MgSO<sub>4</sub>), filtré et concentré. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair (éluant AcOEt/heptane 8:2, 7:3 et 6:4) pour obtenir 0,24 g d'huile claire (66%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.84 (t, 6H,  $J = 6.9$  Hz, H-14'), 1.04-1.30 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.46 (m, 4H, H-2'), 3.15 et 3.46 (m, 4H, H-1'), 3.80 et 3.90 (m, 4H, H-8), 4.28 (m, 2H, H-7), 6.06 (s, 1H, H-6), 7.39 (d, 2H,  $J = 6.5$  Hz, H-4), 7.53 (d, 2H,  $J = 6.5$  Hz, H-3)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.07 (C-14'), 22.71 (C-13'), 27.17 (C-3'), 29.04 (C-2'), 29.73 (C-4'-C11'), 31.93 (C-12'), 44.97 et 49.19 (C-1'), 46.59 (C-8), 76.69 et 77.53 (C-7), 104.40 (C-6), 126.74 (C-3 et C-4), 132.02 (C-10), 138.58 (C-2), 138.83 (C-5), 171.17 (C-1).

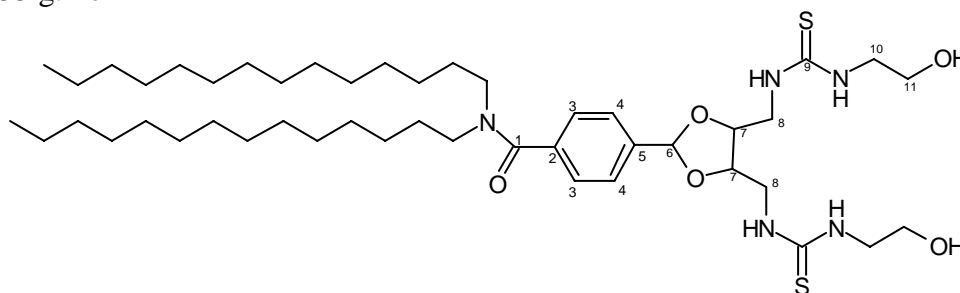
IR (NaCl) :  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 1086 ( $\nu_{\text{C-O-C}}$ ), 1465 ( $\delta_{\text{CH}_2}$ ), 1629 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 2048 ( $\nu_{\text{N=C=S}}$ ), 2842 ( $\nu_{\text{C-H}_2}$ ), 2934 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ), 3196 ( $\nu_{\text{C-H}}$  aromatiques)

CLHP : 37.5 min, Gradient W1, colonne C8 VYDAC  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

➤ 4-{4,5-Bis-[3-(2-hydroxy-éthyl)-thioureidométhyl]-1,3-dioxolan-2-yl}-N, N-ditétradécyl-benzamide (**11**)

$\text{C}_{46}\text{H}_{83}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2$

$M = 850.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



L'éthanolamine (26  $\mu\text{L}$ , 0,4 mmol) est additonée sous atmosphère d'azote à une solution d'isothiocyanate **10** (62 mg, 0,09 mmol) dans 1 mL de THF fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 22 heures puis évaporé et purifié sur cartouche en phase inverse C8 (gradient : de 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  à 100% de MeOH). On obtient 29,8 mg d'huile claire (39%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.87 (m, 6H, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.62 (m, 4H, H-2'), 3.14 (m, 2H, H-1'), 3.44-3,78 (m, 14H, H-1', H-8, H-10 et H-11), 4.16 (m, 2H, H-7), 5.94 (s, 1H, H-6), 7.25 (m, 4H, NH), 7.33 (m, 2H, H-4), 7.52 (m, 2H, H-3)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.09 (C-14'), 22.71 (C-13'), 27.22 (C-3'), 28.83 (C-2'), 29.73 (C-4'-C11'), 31.97 (C-12'), 45.30 (C-8), 45.80 (C-10), 46.97 et 49.45 (C-1'), 61.42 (C-11), 77.50 et 78.93 (C-7), 102.83 (C-6), 126.48 (C-4), 127.05 (C-3) 138.14 (C-2), 138.80 (C-5), 171.71 (C-1), 183.35 (C-9).

CLHP (**1**) : 35.55 min, gradient W1, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

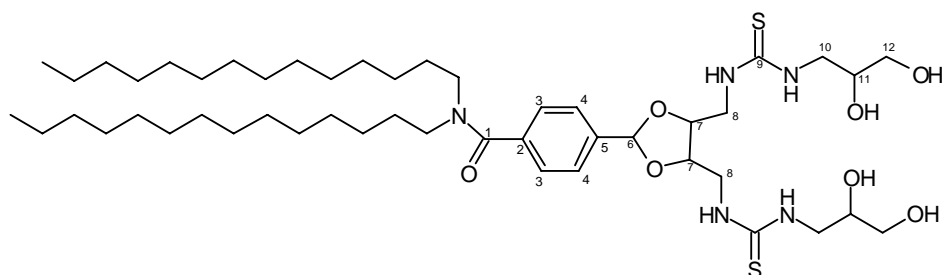
CLHP (**2**) : 15.5 min, gradient W2, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

➤ 4-{4,5-Bis-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thioureidométhyl]-1,3-dioxolan-2-yl}-N, N-ditétradécyl-benzamide (**12**)<sup>283</sup>

$\text{C}_{48}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$

$M = 910.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

<sup>283</sup> Cette manipulation a été faite à l'aide du robot de synthèse



Une solution de 3-amino-1,2-propanediol (22 mg, 0,24 mmol) dans la DMF (20  $\mu$ L) est additionnée sous atmosphère d'azote à l'isothiocyanate **10** (41 mg, 0,056 mmol) dissous dans 0,56 mL de DMF anhydre. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 20 heures puis évaporé à sec. Le résidu organique est dilué dans l'acétate d'éthyle, lavé trois fois par une solution saturée de NaCl, séché ( $\text{MgSO}_4$ ), filtré et concentré. Après purification sur cartouche en phase inverse C8 (gradient de 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  à 100% de MeOH), on obtient 20 mg d'huile claire (38%).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.88 (m, 6H, H-14'), 1.27 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.65 (m, 4H, H-2'), 3.16 (m, 2H, H-1'), 3.35-3.48 (m, 6H, H-1' et H-8), 3.47-3.68 (m, 8H, H-10 et H-12), 3.97 (m, 2H, H-11), 4.16 (m, 2H, H-7), 5.97 (s, 1H, H-6), 7.35 (m, 2H, H-4), 7.55 (m, 2H, H-3)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 13.96 (C-14'), 22.64 (C-13'), 27.11 (C-3'), 28.78 (C-2'), 29.73 (C-4'-C11'), 31.91 (C-12'), 45.27 (C-8), 45.83 (C-10), 46.91 et 49.44 (C-1'), 63.65 (C-12), 70.99 (C-11), 77.68 et 78.93 (C-7), 102.88 (C-6), 126.42 (C-4), 126.86 (C-3), 138.02 (C-2), 138.72 (C-5), 171.87 (C-1), 183.49 (C-9).

**CLHP (1)** : 31.7 min, Gradient W1, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

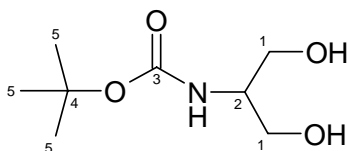
**CLHP (2)** : 14.92 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 243$  nm,  $m/z = 911$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 956 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ )<sup>-</sup>, 91%

**HR-ESMS** : Calculé ( $\text{C}_{48}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{O}_7\text{NaS}_2$ )  $m/z = 932.5945$   
 Trouvé  $m/z = 932.5965$

### ➤ (2-hydroxy-1-hydroxyméthyl-éthyl)-carbamate de tert-butyle (**13**)

$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_4$

$M = 191.23$  g.mol<sup>-1</sup>



A une solution de 2-amino-1,3-propanediol (5 g, 55 mmol) dans 200 mL d'éthanol est additionnée une solution de di-tert-butyl-dicarbonat (12 g, 55 mmol) dans 200 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 5 heures et évaporé à sec. Le solide blanc, dilué dans un minimum de dichlorométhane, est recristallisé dans l'heptane. On obtient 10 g de solide blanc (93%).

**PF** = 82°C

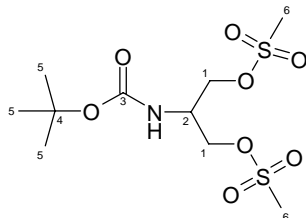
$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.45 (s, 9H, H-5), 3.24 (m, 2H, OH), 3.67-3.83 (m, 5H, H-1 et H-2), 5.34 (d, 1H,  $J = 6.6$  Hz, NH)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 28.44 (C-5), 53.31 (C-2), 63.45 (C-1), 80.07 (C-4), 156.14 (C-3)

Analyse élémentaire :      Calculé      C = 49.96 ; H = 8.94 ; N = 7.32  
   Trouvé      C = 50.25 ; H = 8.96 ; N = 7.32

➤ **2-tert-butoxycarbonylamino-3-méthanesulfonyloxy-méthanesulfonate de propyle (14)**

$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_8\text{S}_2$   
 $M = 347.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



A une solution du diol **13** (8,5 g, 44 mmol) dans 100 mL de dichlorométhane est ajouté le chlorure de méthane sulfonyle (8,3 mL, 107 mmol) et la triéthylamine (18,6 mL, 133 mmol) sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 3 heures. La solution est diluée par 500 mL de dichlorométhane, lavée deux fois par 150 mL d'eau, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Après filtration et évaporation du solvant, on obtient un liquide brun qui se solidifie à froid (15,5 g, rendement quantitatif).

PF = 85°C

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.43 (s, 9H, H-5), 3.06 (s, 6H, H-6), 4.23-4.37 (m, 5H, H-1 et H-2), 5.07 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, NH)

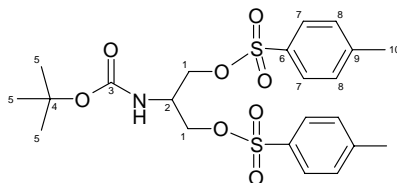
$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 28.32 (C-5), 37.54 (C-6), 48.69 (C-2), 67.02 (C-1), 80.05 (C-4), 154.97 (C-3)

CLHP : 7.88 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 195$  nm,  $m/z = 370$  ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>, 391 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ )<sup>-</sup>

Analyse élémentaire :      Calculé      C = 34.57 ; H = 6.09 ; N = 4.03 ; S = 18.46  
   Trouvé      C = 32.86 ; H = 5.98 ; N = 4.32 ; S = 19.09

➤ **Para-toluènesulfonate de 2-tert-butoxycarbonylamino-3-para-toluènesulfonyloxypropyle (15)**

$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{S}_2$   
 $M = 499.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



A une solution de diol **13** (0,5 g, 2,6 mmol), dans 15 mL de dichlorométhane anhydre sont additionnés la pyridine (1,3 mL, 15,7 mmol), le chlorure de para-toluènesulfonyle (2,0 g, 10,5 mmol), et une quantité catalytique de DMAP. Après 20 heures d'agitation à t.a., le mélange est dilué par 150 mL de dichlorométhane, puis lavé trois fois par chacune de ces solutions : HCl 1N,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 10% et saumure. Après séchage ( $\text{MgSO}_4$ ) et évaporation du solvant, le produit brut est purifié sur cartouche de silice, pour obtenir 0,87 mg de solide blanc (62%).

PF = 97°C

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 1.39 (s, 9H, H-5), 2.46 (s, 6H, H-10), 4.02-4.05 (m, 5H, H-1 et H-2), 4.82 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, NH), 7.58 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-8), 7.50 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-7)

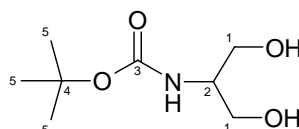
$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 21.72 (C-10), 28.28 (C-5), 48.38 (C-2), 67.29 (C-1), 80.05 (C-4), 128.04 (C-7), 130.12 (C-8), 132.29 (C-6), 145.39 (C-9), 154.97 (C-3)

CLHP : 10.32 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 194$  et 234 nm,  $m/z = 522$  (M+Na) $^+$

➤ **2-Azido-1-azidométhyl-éthyl-carbamate de tert-butyle (16)**

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_2$

$M = 241.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution du dérivé dimésylé **14** (1,8 g, 5,1 mmol), d'azoture de sodium (2,0 g, 30,6 mmol) et d'éther-couronne à 18 chaînons (0,14 g, 0,5 mmol) dans 25 mL de DMF est chauffée à reflux pendant 20 heures. Le mélange est coévaporé à l'aide du toluène et de l'eau, puis dilué par l'acétate d'éthyle et l'eau. La phase organique est décantée et la phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution saturée de NaCl, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et évaporées. On obtient une huile jaune (1,24 g, rendement quantitatif) qui ne nécessite pas de purification supplémentaire.

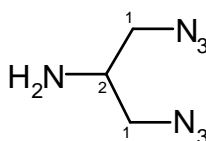
$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 1.43 (s, 9H, H-5), 3.40 (dd,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 16.6$  Hz, H-1), 3.51 (dd,  $J_1 = 6.8$  Hz,  $J_2 = 16.6$  Hz, H-1), 3.85 (m, 1H, H-2), 4.91 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 28.36 (C-5), 49.61 (C-2), 51.84 (C-1), 80.05 (C-4), 155.19 (C-3)

➤ **2-Azido-1-azidométhyl-éthylamine (17)**

$\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_7$

$M = 141.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution de TFA à 75% dans l'eau (80 mL) est additionnée à une solution du diazide **16** (4,7 g, 20 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane. Après 4 heures d'agitation à t.a., le mélange réactionnel est versé sur un lit de  $\text{NaHCO}_3$  puis filtré. La phase aqueuse est extraite six fois au dichlorométhane, puis traitée par NaOH 2N jusqu'à pH 10, et à nouveau extraite trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et évaporées, pour donner une huile brune (2,7 g, 96%) qui ne nécessite pas de purification supplémentaire.

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 1.45 (s, 2H, NH), 3.02 (p, 1H,  $J_1 = 5.7$  Hz, H-2), 3.32 (dd, 2H,  $J = 6.0$  Hz,  $J_2 = 12.0$  Hz, H-1), 3.40 (dd, 2H,  $J_1 = 5.8$  Hz,  $J_2 = 12.0$  Hz, H-1)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 50.69 (C-2), 55.08 (C-1)

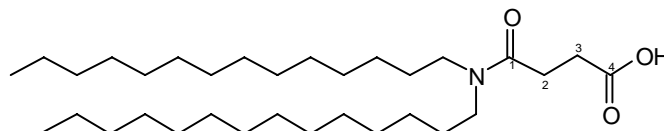
CLHP : 1.96 min, Gradient S1,  $\lambda_{\text{max}} = 195$  nm,  $m/z = 142$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

HRMS (EI DCI) :  $m/e = 142$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

➤ **Acide N,N-ditétradécyl-succinique (18)**

$\text{C}_{32}\text{H}_{63}\text{NO}_3$

$M = 509.86$  g.mol $^{-1}$



L'anhydride succinique (10,7, 107 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (0,48 g, 3,9 mmol) sont ajoutés à une solution de ditétradécylamine **2** (8,0 g, 19,5 mmol) dans un mélange de pyridine (32 mL) et dichlorométhane (80 mL). Le mélange réactionnel est agité à t.a. pendant 18 heures, puis il est dilué par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et à HCl 1N. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée pour obtenir 9,8 g d'huile (98%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 6H,  $J = 6.3$  Hz, H-14'), 1.23 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.48 (m, 2H, H-2'), 2.64 (s, 4H, H-2, H-3), 3.22 (m, 4H, H-1').

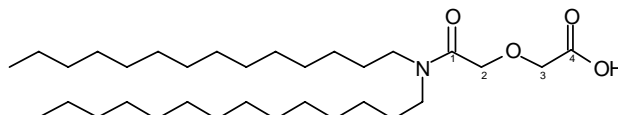
$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.08 (C-14'), 22.69 (C-13'), 27.74 (C-3'), 28.10 (C-2), 28.92 (C-2'), 29.67 (C-4'-C-11'), 30.07 (C-3), 31.96 (C-12'), 46.21 et 47.98 (C-1'), 171.46 (C-4), 176.34 (C-1).

CLHP : 16.92 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 197$  nm,  $m/z = 511$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 509 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$

➤ **Acide ditétradécylcarbamoylméthoxy-acétique (19)**

$\text{C}_{32}\text{H}_{63}\text{NO}_4$

$M = 525.86$  g.mol $^{-1}$



L'anhydride diglycolique, préalablement déshydraté (6,3 g, 53,8 mmol), et le DMAP (1,3 g, 10,7 mmol) sont ajoutés à une solution de ditétradécylamine **2** (8,8 g, 21,5 mmol) dans 200 mL de dichlorométhane anhydre. La réaction est agitée à t.a. pendant 18 heures. Le milieu réactionnel est dilué par 200 mL de dichlorométhane, lavé trois fois par HCl 1N et par une solution saturée de NaCl, puis séché ( $\text{MgSO}_4$ ), filtré et concentré pour obtenir 11,3 g d'un solide clair (rendement quantitatif).

PF = 62°C

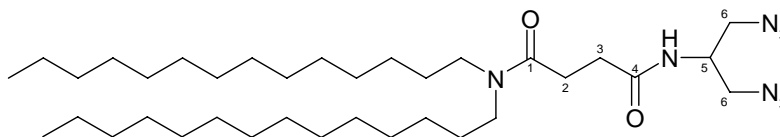
$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.9$  Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.54 (m, 2H, H-2'), 3.08 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.34 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 4.21 (s, 2H, H-2), 4.38 (s, 2H, H-3)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.13 (C-14'), 22.72 (C-13'), 27.01 (C-3'), 28.71 (C-2'), 29.68 (C-4'-C-11'), 31.97 (C-12'), 46.95 (C-1'), 71.21 (C-2), 72.87 (C-3), 170.69 (C-1), 172.03 (C-4)

**CLHP** : 16.71 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\max}$  = 197 nm,  $m/z$  = 527 (M+H)<sup>+</sup>, 95%

➤ **N-(2-Azido-1-azidométhyl-éthyl)-N',N'-ditétradécylsuccinamide (20)**

$C_{35}H_{68}N_8O_2$   
M = 632.98 g.mol<sup>-1</sup>



**Méthode A :**

Le chloroformate d'isobutyle (107  $\mu$ L, 0,83 mmol), dilué dans 2 mL de THF anhydre, est additionné goutte-à-goutte à -40°C sous atmosphère inerte à une solution d'acide **18** (0,38 g, 0,75 mmol) et la N-méthylmorpholine (91  $\mu$ L, 0,83 mmol) dans 2 mL de THF anhydre. Après une heure d'agitation à -40°C, le milieu est traité par une solution d'amine **17** (106 mg, 0,83 mmol) et de N-méthylmorpholine (107  $\mu$ L, 0,83 mmol), dans 2 mL de THF anhydre. Le mélange trouble est agité vigoureusement jusqu'au retour à t.a. puis pendant encore 20 heures. Le milieu réactionnel est dilué par 10 mL d'acétate d'éthyle et 10 mL d'eau, et la phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques rassemblées sont lavées trois fois par chacune de solutions suivantes : HCl 1N, NaHCO<sub>3</sub> saturée et NaCl saturée. Après séchage (MgSO<sub>4</sub>), filtration, et concentration, le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir une huile claire (80 mg, 42%).

**Méthode B :**

Une solution de DCC (0,16 g, 0,75 mmol) dans le dichlorométhane (1 mL) est additionnée goutte-à-goutte à une solution d'amine **17** (74 mg, 0,53 mmol) et d'acide **18** (0,26 g, 0,50 mmol) dans 3 mL de dichlorométhane anhydre. L'agitation vigoureuse est maintenue une nuit. Après l'addition d'ether (5 mL) il se forme un précipité blanc qui est filtré sur célite. Le filtrat est concentré puis dilué dans 10 mL de THF en présence de 270 mg de résine Amberlyst-21 (4 éq), pour fixer l'excès d'acide. Après filtration et évaporation, on obtient 308 mg d'huile (93%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J$  = 6.6 Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.47 (m, 4H, H-2'), 2.60 (dd, 4H,  $J$  = 21.1 Hz,  $J$  = 7.0 Hz, H-2 et H-3), 3.23 (dt, 4H,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 22.5 Hz, H-1'), 3.43 (dd, 4H,  $J_1$  = 6.0 Hz,  $J_2$  = 14.4 Hz, H-6), 4.15 (m, 1H, H-5), 7.23 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, NH)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 13.95 (C-14'), 22.66 (C-13'), 27.12 (C-3'), 27.84 (C-2), 28.97 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.90 (C-12' et C-3), 46.42 et 48.09 (C-1'), 48.55 (C-5), 51.62 (C-6), 171.39 (C-1), 172.87 (C-4)

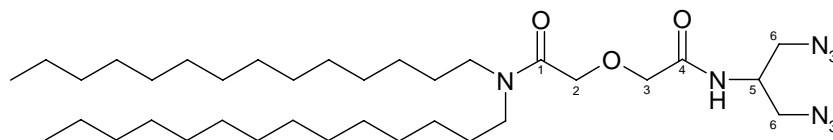
**CLHP** : 28.07 min, gradient W2, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\max}$  = 240 nm.

**CLHP** : 14.47 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\max}$  = 196 nm,  $m/z$  = 634 (M+H)<sup>+</sup>

➤ **2-[(2-Azido-1-azidométhyl-éthylcarbamoyle)-méthoxy]-N,N-ditétradécylacétamide (21)**

$C_{35}H_{68}N_8O_3$   
M = 648.98 g.mol<sup>-1</sup>





Une solution de DCC (2,3 g, 11,4 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) est additionnée goutte-à-goutte sur une solution d'amine **17** (1,1 g, 8,0 mmol) et d'acide **19** (4,0 g, 7,6 mmol) dans 50 mL de dichlorométhane anhydre. L'agitation vigoureuse est maintenue une nuit. Après l'ajout d'ether (70 mL) sur le milieu concentré, il se forme un précipité blanc qui est filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de silice, puis remis en solution dans 50 mL de dichlorométhane en présence de 1,6 g d'Amberlyst-21 (4 éq) pendant 4 heures. Après filtration et concentration, on obtient 4,9 g d'huile (98%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.52 (m, 4H, H-2'), 3.06 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.31 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.47 (dd, 4H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 12.3$  Hz, H-6), 3.55 (dd, 4H,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 12.3$  Hz, H-6), 4.10 (s, 2H, H-3), 4.17 (m, 1H, H-5), 4.27 (s, 2H, H-2), 8.75 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.13 (C-14'), 22.73 (C-13'), 27.06 (C-3'), 27.64 (C-2'), 29.70 (C-4'-C-11'), 31.98 (C-12'), 46.45 et 46.91 (C-1'), 48.44 (C-5), 51.54 (C-6), 70.33 (C-2), 72.68 (C-3), 168.70 (C-1), 170.30 (C-4)

**CLHP (1)** : 46.98 min, Gradient W3, colonne C18 Econosphère,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

**CLHP (2)** : 17.39 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 198$  nm,  $m/z = 650$  (M+H)<sup>+</sup>, 648 (M-H)<sup>-</sup>, 695 (M+HCOO)<sup>-</sup>, 94%

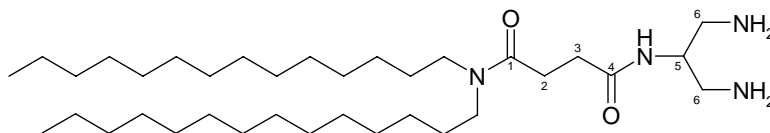
**Analyse élémentaire** :

Calculé	C = 64.78 ; H = 10.56 ; N = 17.27
Trouvé	C = 64.84 ; H = 10.71 ; N = 16.91

➤ **N-(2-Amino-1-aminométhyl-éthyl)-N',N'-ditétradécylsuccinamide (22)**

$\text{C}_{35}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_2$

$M = 580.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'azide **20** (0,30 g, 0,48 mmol) et de palladium sur charbon activé (60 mg) dans 10 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène, puis agité pendant 19 heures, et filtré sur célite. Le filtrat est concentré pour obtenir une huile claire (0,27 g, 98%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.80 (t, 6H,  $J = 8.4$  Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.49 (m, 4H, H-2'), 2.43 (m, 2H, H-2), 2.63 (m, 2H, H-3), 2.75 (m, 4H, H-6), 2.86 (m, 4H, NH<sub>2</sub>), 3.25 (m, 4H, H-1'), 3.82 (m, 1H, H-5), 7.12 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

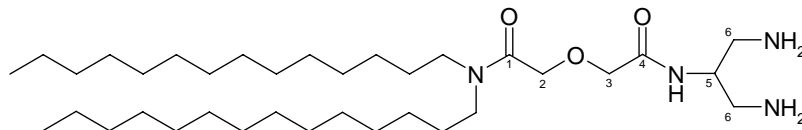
$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.14 (C-14'), 22.73 (C-13'), 27.12 (C-3'), 27.82 (C-2'), 29.40 (C-2), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.97 (C-12' et C-3), 43.56 (C-6), 46.36 et 48.10 (C-1'), 53.27 (C-5), 171.39 (C-1), 172.87 (C-4)

**CLHP (1)** : 36.41 min, Gradient W3, colonne C18 Econosphère,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

**CLHP (2)** : 10.12 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 195$  nm,  $m/z = 582$  (M+H)<sup>+</sup>, 626 (M+HCOO)<sup>-</sup>, 88%

➤ **2-[(2-Amino-1-aminométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-N,N-ditétradécylacétamide**  
(23)

$C_{35}H_{72}N_4O_3$   
M = 596.99 g.mol<sup>-1</sup>



**Méthode A :**

Un mélange d'azide **21** (0,5 g, 0,77 mmol), palladium sur charbon activé (75 mg) dans 10 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité pendant une nuit, puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré pour obtenir une huile claire (0,45 g, 97%).

**Méthode B :**

Une solution d'azide **21** (0,20 g, 0,31 mmol) et de triphénylphosphine sur résine (0,73 g, 1,24 mmol) dans 8 mL de THF et 1 mL d'eau est chauffé à 40°C. Après une nuit le milieu est filtré, concentré, et purifié sur cartouche de silice pour obtenir 162 mg d'huile (88%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.88 (t, 6H, J = 6.0 Hz, H-14'), 1.26 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.53 (m, 4H, H-2'), 2.55 (m, 4H, NH<sub>2</sub>), 2.71-2.87 (m, 4H, H-6), 3.08 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H-1'), 3.30 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H-1'), 3.93 (m, 1H, H-5), 4.09 (d, J = 7.5 Hz, H-3), 4.25 (d, J = 7.5 Hz, H-2), 8.21 (d, 1H, J = 8.4 Hz, NH)

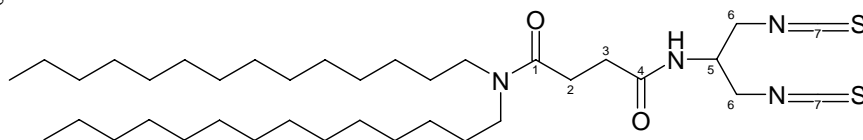
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.09 (C-14'), 22.69 (C-13'), 27.02 (C-3'), 27.62 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.94 (C-12'), 43.69 (C-6), 46.28 et 46.89 (C-1'), 53.25 (C-5), 69.63 (C-2), 72.10 (C-3), 168.70 (C-1), 170.30 (C-4)

CLHP : 14.61 min, gradient W3, colonne C18 Econosphère, λ<sub>max</sub> = 240 nm.

Analyse élémentaire : Calculé (+2H<sub>2</sub>O) C = 66.62 ; H = 11.82 ; N = 8.88  
Trouvé C = 67.02 ; H = 12.03 ; N = 7.85

➤ **N-(2-isothiocyanato-1-isothiocyanatométhyl-éthyl)-N',N'-ditétradécylsuccinamide**  
(24)

$C_{37}H_{68}N_4O_2S_2$   
M = 665.11 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange de diamine **22** (0,28 g, 0,5 mmol), de 0,25 mL de DIPEA (1,4 mmol) et 0,11 mL de disulfure de carbone (1,9 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre sont agités pendant 3 heures. Le chlorure de paratoluènesulfonyle fraîchement recristallisé (0,18 g, 0,9 mmol) dissous dans 3 mL de dichlorométhane anhydre est ensuite additionné goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 20 heures, puis il est dilué au dichlorométhane, lavé trois fois par une solution saturée de NaCl, séché (MgSO<sub>4</sub>), filtré et concentré. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 71 mg d'huile claire (22%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.51 (m, 4H, H-2'), 2.56 (m, 2H, H-2), 2.69 (m, 2H, H-3), 3.25 (m, 4H, H-1'), 3.76 (dd, 4H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 11.1$  Hz, H-6), 4.28 (m, 1H, H-5), 7.51 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.18 (C-14'), 22.77 (C-13'), 27.19 (C-3'), 27.87 (C-2'), 29.03 (C-2), 29.74 (C-4'-C-11'), 32.01 (C-12' et C-3), 45.98 et 46.69 (C-1') et 48.10 (C-5), 49.04 (C-6), 171.39 (C-1), 172.87 (C-4)

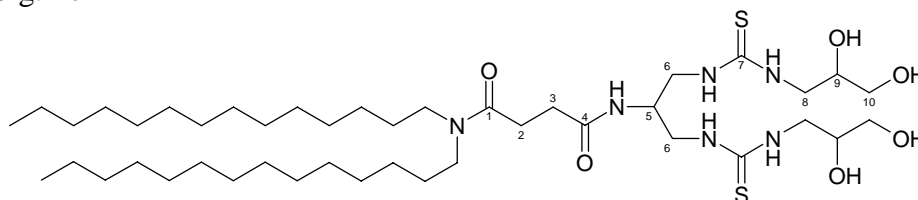
**IR (NaCl)** :  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 1629 ( $\nu_{\text{N-C=O}}$ ), 1675 ( $\nu_{\text{NH-C=O}}$ ), 2089 ( $\nu_{\text{N=C=S}}$ ), 2852 ( $\nu_{\text{C-H}_2}$ ), 2929 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ )

**CLHP** : 29.31 min, Gradient W3, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

➤ **N-{2-[3-(2,3-Dihydroxy-propyl)-thiouréido]-1-[3-(2,3-dihydroxypropyl)-thiouréidométhyl]-éthyl}-N',N'-ditétradécyl-succinamide (25)**

$\text{C}_{43}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$

$M = 747.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution de 1-amino-2,3-propanediol (40 mg, 0,44 mmol) dans 1 mL de DMF anhydre est additionnée sur l'isothiocyanate **24** (73 mg, 0,11 mmol) dissous dans 1,5 mL de DMF anhydre. Le mélange est agité pendant 2 heures à t.a. puis chauffé à 50°C pour la nuit. Le milieu est concentré puis dilué dans 4 ml de dichlorométhane, lavé deux fois par une solution saturée de NaCl, séché ( $\text{MgSO}_4$ ), concentré, puis purifié d'abord sur cartouche en phase inverse C8 (gradient de 100%  $\text{H}_2\text{O}$  à 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  puis à 100% MeOH), puis sur cartouche de silice. On obtient 23 mg d'huile (25%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-14'), 1.26 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.55 (m, 4H, H-2'), 2.52 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-2), 2.68 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-3), 3.11 (t 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.18 (t 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.21 (m, 2H, H-8), 3.39 (m, 4H, H-6 et H-8), 3.53 (m, 6H, H-6 et H-10), 3.77 (t, 2H,  $J = 4.5$  Hz, H-9), 3.87 (m, 1H, H-5), 6.97 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.05 (C-14'), 22.70 (C-13'), 27.02 (C-3'), 27.81 (C-2'), 28.93 (C-2), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.68 (C-3), 31.91 (C-12'), 44.46 (C-8), 46.18 (C-6), 46.58 et 48.29 (C-1'), 53.12 (C-5), 63.44 (C-10), 70.93 (C-9), 171.66 (C-1) 174.76 (C-4)

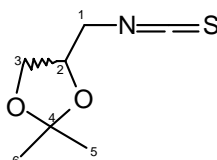
**CLHP (1)** : 26.56 min, gradient W1, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

**CLHP (2)** : 27.97 min, gradient W3, colonne C18 Econosphere,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

➤ **4-Isouthiocyanatométhyl-2,2-diméthyl-[1,3]-dioxolane (26)**

$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$

$M = 173.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange de DCC (3,2 g, 15,5 mmol) et de disulfure de carbone (6,3 mL, 104 mmol) dans 10 mL de THF anhydre est refroidi à -5°C par un bain de glace/NH<sub>4</sub>Cl (4:1 v/v). La 2,2 diméthyl-1,2-dioxolan-4-méthanamine racémique (2,0 g, 15,5 mmol) diluée dans 7 mL de THF est additionnée goutte à goutte sur une période d'une heure. Le mélange est agité pendant 4 heures à t.a. Le précipité blanc formé est filtré sur célite, et le filtrat, d'abord concentré, est repris dans l'ether. Le précipité blanc est à nouveau filtré sur célite et le filtrat évaporé. Le produit brut est purifié sur colonne de silice (éluant : heptane/AcOEt 8:2), pour obtenir finalement 2,2 g de liquide clair (85%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.31 et 1.42 (s, 3H, H-5, H-6), 3.54 (dd, 1H, *J* = 5.1 Hz, *J* = 15.0 Hz, H-1), 3.64 (dd, 1H, *J* = 5.1 Hz, *J* = 15.0 Hz, H-1), 3.80 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, H-3), 4.07 (dd, *J* = 6.3 Hz, *J* = 8.7 Hz, H-3), 4.26 (q, 1H, *J* = 5.3 Hz, H-2)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 25.24 et 26.85 (C-5, C-6), 47.47 (C-1), 66.69 (C-3), 73.76 (C-2), 110.49 (C-4), 133.12 (C-7).

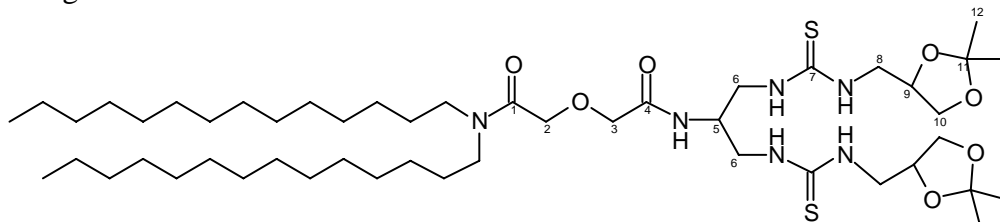
CLHP : 7.91 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 240 nm, *m/z* = 174 (M+H)<sup>+</sup>

Analyse élémentaire :	Calculé	C = 48.53 ; H = 6.40 ; N = 8.09 ; S = 18.51
	Trouvé	C = 48.54 ; H = 6.52 ; N = 8.00 ; S = 18.51

➤ 2-({2-[3-(2,2-Diméthyl-1,2-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyle}-méthoxy)-*N,N*-ditétradécylacétamide (**27**)

C<sub>49</sub>H<sub>94</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>

*M* = 943.46 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'amine **23** (0,24 g, 0,5 mmol), et de *N,N*-diisopropyléthylamine (0,87 mL, 5,0 mmol) dans 4 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **37** (0,22 g, 1,25 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit, puis est évaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice (gradient de l'heptane à l'acétate d'éthyle puis à l'acétone), pour obtenir 0,37 g d'huile incolore (66%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.86 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, H-14'), 1.26 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.32 (s, 6H, H-12), 1.42 (s, 6H, H-12), 1.50 (m, 4H, H-2'), 3.08 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.20 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.67-3.83 (m, 8H, H-6 et H-8), 4.02-4.10 (m, 6H, H-3 et H-10), 4.29 (m, 7H, H-2, H-5, H-9), 7.7 (m, 4H, NH)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 13.98 (C-14'), 22.59 (C-13'), 25.27 et 26.85 (C-12), 27.62 (C-3'), 28.91 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.84 (C-12'), 44.73 (C-6 et C-8), 46.57 et 46.59 (C-1'), 54.29 (C-5), 68.86 (C-10), 69.81 (C-2), 71.79 (C-3), 74.30 (C-9), 109.47 (C-11), 168.33 (C-1) 171.78 (C-4), 183.18 (C-7)

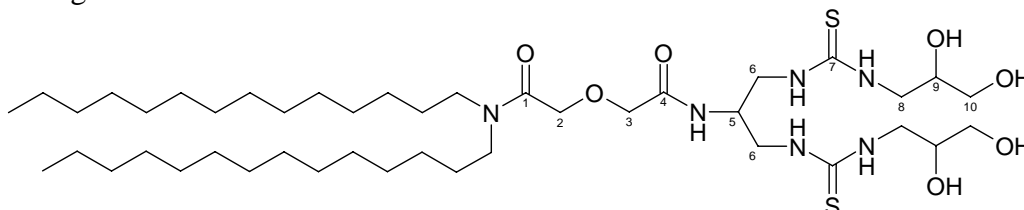
CLHP (**1**) : 32.34 min, Gradient W1, colonne C8 VYDAC, λ<sub>max</sub> = 244 nm

CLHP (**2**) : 19.92 min, Gradient S2, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 210 et 244 nm, *m/z* = 944 (M+H)<sup>+</sup>, 966 (M+Na)<sup>+</sup>, 96%

<b>Analyse élémentaire :</b>	Calculé	C = 62.38 ; H = 10.04 ; N = 8.91 ; S = 6.80
	Trouvé	C = 61.83 ; H = 10.21 ; N = 8.64 ; S = 5.94

➤ **2-({2-[3-(2,3-Dihydroxy-propyl)-thiouréido]-1-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl}-méthoxy)-N,N-ditétradécylacétamide (**28**)**

C<sub>43</sub>H<sub>86</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>  
M = 863.33 g.mol<sup>-1</sup>



La thiourée **27** (0,13 mg, 0,13 mmol) dissoute dans 1,3 mL de THF est traitée par 1,3 mL d'acide chlorhydrique 1N. La réaction est suivie par HPLC analytique, et arrêtée après 3 heures d'hydrolyse. Après évaporation à froid, le milieu est lyophilisé pour donner 0,10 mg de solide clair (92%).

**PF** = 50°C

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.86 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, H-14'), 1.24 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.51 (m, 4H, H-2'), 3.06 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.28 (m, 4H, H-1' et H-8), 3.46 (m, 4H, H-6 et H-8), 3.55-3.67 (m, 6H, H-6 et H-10), 3.80 (m, 2H, H-9), 4.08 (s, 2H, H-3), 4.17 (m, 1H, H-5), 4.25 (s, 1H, H-2), 7.32-7.53 (m, 4H, NH), 8.29 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.00 (C-14'), 22.61 (C-13'), 27.00 (C-3'), 28.89 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.86 (C-12'), 40.31 (C-8), 40.81 (C-6), 46.73 et 46.96 (C-1'), 49.43 (C-5), 64.03 (C-10), 69.64 (C-2), 71.17 (C-9), 71.85 (C-3), 168.39 (C-1) 170.61 (C-4), 183.53 (C-7)

**CLHP** : 14.55 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 240 et 210 nm, *m/z* = 863 (M+H)<sup>+</sup>, 899 (M+Cl)<sup>-</sup>, 96%

**Analyse élémentaire :** Calculé (+H<sub>2</sub>O) C = 58.67 ; H = 9.96 ; N = 9.55 ; S = 7.28

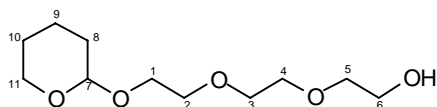
Trouvé C = 58.11 ; H = 9.64 ; N = 9.17 ; S = 6.16

**HR-ESMS :** Calculé (C<sub>39</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>NaS<sub>2</sub>) *m/z* = 885.5897

Trouvé *m/z* = 885.5887

➤ **2-{2-[2-(tétrahydropyranyl-2-yloxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthanol (**29**)**

C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>  
M = 234.29 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution de triéthylène glycol (30 g, 200 mmol) et d'APTS (1,9 g, 10 mmol) dans 200 mL de dichlorométhane est refroidie à 0°C pendant 30 minutes avant l'addition du 3,4-dihydropyrane (9,9 mL, 100 mmol). L'agitation est maintenue 2 heures à t.a. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,06 g dans 20 mL d'H<sub>2</sub>O). Après évaporation, le produit brut est purifié sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 3:7) pour obtenir 24,4 g d'huile (52%).

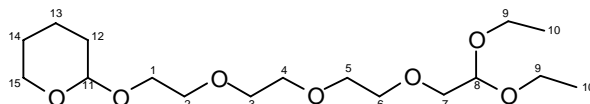
$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.45 (m, 6H, H-8-H-10), 3.50-3.65 (m, 6H, H-1-H-5, H-11), 3.78 (m, 1H, H-6), 4.56 (m, H-7)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 19.44 (C-9), 25.43 (C-10), 30.54 (C-8), 61.70 (C-11), 62.21 (C-6), 66.63 (C-1), 70.58 (C-2-C-4), 72.62 (C-5), 98.99 (C-7)

➤ **2-{2-[2-(tétrahydropyranyl-2-yloxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthanol (30)**

$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_7$

$M = 350.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



L'hydru de sodium (1,7 g, 43 mmol) est ajouté par portions à une solution de 2,0 g de d'alcool **29** (17 mmol) dans 50 mL de THF sont refroidi à 0°C. Le bromoacétaldéhyde diéthylacétal (2,3 mL, 17 mmol) est additionné goutte à goutte après une heure d'agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pour la nuit. La réaction est arrêtée par ajout de 2 mL d'eau, dans un bain de glace, et évaporée. Le résidu est dilué par le dichlorométhane et l'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois au dichlorométhane et les phases organiques réunies sont lavées par une solution saturée de NaCl, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et évaporées. Après purification sur colonne de silice (éluant heptane/ $\text{AcOEt}$  1 :1), on obtient 3,0 g d'huile jaune (rendement quantitatif).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.11 (t, 6H,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , H-10), 1.41-1.72 (m, 6H, H-12, H-13, H-14), 3.43 (m, 4H, H-9), 3.48 (m, 2H, H-15), 3.53-3.59 (m, 12H, H-1-H-6), 3.75 (m, 2H, H-7), 4.53 (m, 2H, H-8, H-11)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 15.32 (C-10), 19.45 (C-13), 25.46 (C-14), 30.58 (C-12), 62.21 (C-1 et C-9), 66.64 (C-15), 70.62 (C3-C-5), 70.91 (C-2, C-6), 71.95 (C-7), 98.86 (C-11), 101.22 (C-8)

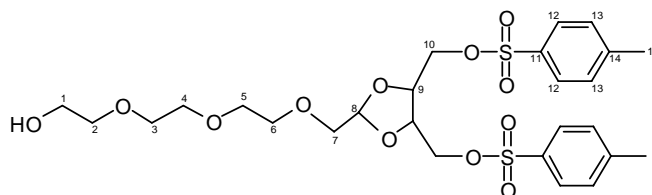
**CLHP** : 7.18 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 197 \text{ nm}$ ,  $m/z = 373$  ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>, 96%

**Analyse élémentaire** :      Calculé      C = 58.26 ; H = 9.78  
   Trouvé      C = 57.79 ; H = 9.90

➤ **2-{2-[2-(4,5-Bis-(toluène-4-sulfonyloxyméthyl)-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthanol (32)**

$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{S}_2$

$M = 604.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution du diéthylacétal **30** (0,23 g, 0,65 mmol) de composé ditosylé **3** (0,28 g, 0,65 mmol) et d'APTS (22 mg, 0,13 mmol) dans 10 mL de benzène anhydre est porté au reflux

pendant 22 heures, et la réaction est arrêtée par ajout de 0,1 mL de pyridine. Le mélange est évaporé à sec puis purifié pour recueillir deux produits formés : le premier possédant un alcool libre **32** (96 mg, 24%), le second comportant un alcool encore protégé par le THP **31** (140 mg, 31%).

Ce dernier **31** (140 mg, 0,20 mmol) est remis en solution dans 2 mL de méthanol et 0,5 mL d'eau, en présence d'APTS (16 mg, 0,09 mmol), et la réaction est agitée pendant 6 heures. Elle est arrêtée par ajout d'un excès de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solide dans le milieu. Après évaporation, le résidu est dilué dans le dichlorométhane, lavé trois fois par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis par une solution saturée de NaCl, séchée (MgSO<sub>4</sub>) et concentrée. On obtient 65 mg d'alcool libre **32**, ce qui correspond à un rendement total de la réaction de 52%.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.46 (s, 6H, H-15), 2.85 (m, 1H, OH), 3.47 (d, 2H, *J* = 4.6 Hz, H-7), 3.60-3.65 (m, 10H, H-2-H-6), 3.71 (m, 2H, H-1), 4.07-4.13 (m, 6H, H-9 et H-10), 5.11 (t, *J* = 3.3 Hz, H-8), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, H-13), 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, H-12)

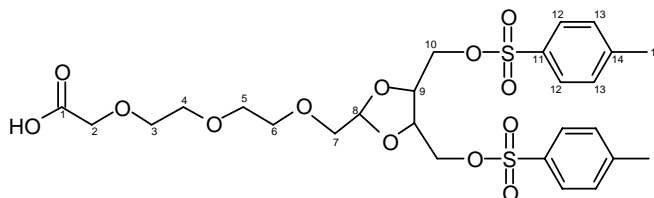
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 21.67 (C-15), 61.84 (C-1), 66.33 (d, C-10), 70.56 (C-3 et C-4), 70.69 (C-5), 71.26 (C-6), 71.88 (C-2), 72.54 (C-7), 75.67 (C-9), 104.16 (C-8), 128.05 (C-12), 130.06 (C-13), 132.71 (C-11), 145.28 (C-14)

CLHP : 9.45 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 199 et 233 nm, *m/z* = 605 (M+H)<sup>+</sup>, 627 (M+Na)<sup>+</sup>

➤ Acide {2-[2-(4,5-Bis-(toluène-4-sulfonyloxyméthyl)-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-acétique (**33**)

C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub>

M = 618.68 g.mol<sup>-1</sup>



A une solution d'alcool **32** (145 mg, 0,24 mmol) est solubilisé dans 2,5 mL d'acétone et 0,75 mL d'une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 15% sont additionnés le bromure de sodium (5 mg, 0,05 mmol), le TEMPO (4 mg, 0,024 mmol), et l'acide trichloroisocyanurique (0,11 g, 0,48 mmol). Le milieu est agité vigoureusement pendant 14 heures. La réaction est arrêtée par ajout de 0,14 mL d'isopropanol, filtrée, évaporée à sec. Le solide obtenu est solubilisé par sonication dans une solution aqueuse saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La solution est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. Après séchage (MgSO<sub>4</sub>), et concentration, on obtient 106 mg d'huile jaune (71%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.40 (s, 6H, H-15), 3.41 (d, 2H, *J* = 4.6 Hz, H-7), 3.57-3.68 (m, 8H, H-3-H-6), 4.05 (m, 6H, H-9 et H-10), 4.10 (s, 2H, H-2), 5.05 (t, *J* = 3.3 Hz, H-8), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, H-13), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, H-12)

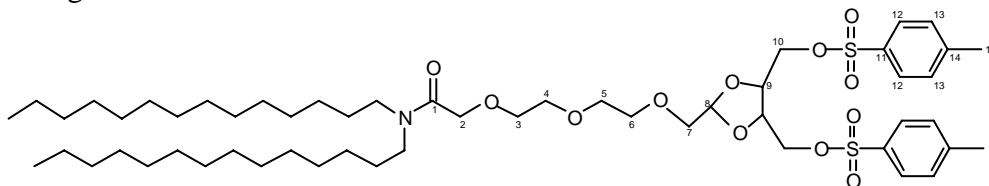
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 21.65 (C-15), 61.42 (d, C-10), 70.35 (C-3), 70.50 (C-4), 71.08 (C-5 et C-6), 71.67 (C-7), 75.61 (C-9 et C-2), 104.01 (C-8), 128.00 (C-12), 132.37 (C-13), 133.87 (C-11), 145.28 (C-14), 173.01 (C-1)

CLHP : 9.68 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 196 et 230 nm, *m/z* = 619 (M+H)<sup>+</sup>, 641 (M+Na)<sup>+</sup>, 618 (M-H)<sup>-</sup>

➤ **2-{2-[2-(4,5-Bis-(toluène-4-sulfonyloxyméthyl)-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-N,N-ditétradécyl-acétamide (**34**)**

$C_{54}H_{91}NO_{12}S_2$

$M = 1010.45 \text{ g.mol}^{-1}$



L'isobutyl chloroformate (24  $\mu\text{L}$ , 0,19 mmol), dilué dans 0,5 mL de THF anhydre, est additionné à  $-40^\circ\text{C}$  à une solution d'acide **33** (105 mg, 0,17 mmol) et de N-méthylmorpholine (21  $\mu\text{L}$ , 0,19 mmol) dans 4 mL de THF fraîchement distillé. Après une heure d'agitation à  $-40^\circ\text{C}$ , le milieu est traité par une solution de ditétradécylamine **2** (70 mg, 0,17 mmol) et de N-méthylmorpholine ((21  $\mu\text{L}$ , 0,19 mmol) dans 0,5 mL de THF anhydre. Le mélange trouble, est agité vigoureusement jusqu'au retour à t.a., puis pendant encore 20h. Le mélange réactionnel est ensuite dilué par 10 mL d'acétate d'éthyle et 10 mL d'eau, la phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques rassemblées sont lavées trois fois par chacune des solutions suivantes : HCl 1N,  $\text{NaHCO}_3$  saturé, et NaCl saturé. Après séchage ( $\text{MgSO}_4$ ), filtration, et concentration, le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir une huile claire (72 mg, 42%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.86 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-14'), 1.20-1.32 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.49 (m, 4H, H-2'), 2.44 (s, 6H, H-15), 3.15 et 3.26 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H, H-1'), 3.42 (d, 2H,  $J = 4.6$  Hz, H-7), 3.58-3.68 (m, 8H, H-3-H-6), 4.01-4.09 (m, 6H, H-9 et H-10), 4.16 (s, 2H, H-2), 5.07 (t,  $J = 3.6$  Hz, H-8), 7.35 (d,  $J = 8.1$  Hz, H-13), 7.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, H-12)

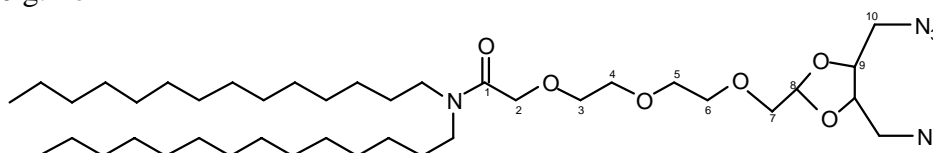
$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.14 (C-14'), 21.69 (C-15), 22.72 (C-13'), 27.11 (C-3'), 29.03 (C-2'), 29.69 (C-4'-C-11'), 31.97 (C-12'), 45.86 et 47.03 (C-1'), 68.25 (d, C-10), 70.07 (C-3), 70.58 (C-4-C-6), 71.27 (C-2), 71.88 (C-7), 75.60 (C-9), 104.16 (C-8), 128.06 (C-12), 130.09 (C-13), 133.66 (C-11), 145.31 (C-14), 168.69 (C-1)

**CLHP** : 17.39 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 227$  nm,  $m/z = 1011$  (M+H) $^+$ , 1034 (M+Na) $^+$

➤ **2-{2-[2-(4,5-Bis-azidométhyl-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-N,N-ditétradécyl-acétamide (**35**)**

$C_{40}H_{77}N_7O_6$

$M = 752.10 \text{ g.mol}^{-1}$



Un mélange de dérivé ditosylé **34** (0,36 g, 0,36 mmol) et d'azoture de sodium (0,23 g, 3,60 mmol) dans 10 mL de DMF anhydre est chauffé à reflux pendant 15h sous atmosphère d'azote. Le solvant est ensuite coévaporé à l'aide du toluène. Le résidu huileux est partagé entre l'acétate d'éthyle (20 mL) et une solution saturée de NaCl (30 mL). La phase aqueuse



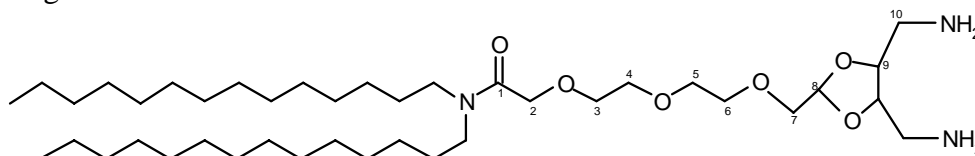
est extraite par deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies et séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), concentrées. L'huile jaune obtenue (0,28 g, rendement quantitatif) ne nécessite pas de purification supplémentaire.

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.86 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-14'), 1.20-1.32 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.52 (m, 4H, H-2'), 3.16 et 3.27 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H, H-1'), 3.38-3.55 (m, 4H, H-10), 3.61 (d, 2H,  $J = 4.6$  Hz, H-7), 3.68 (m, 8H, H-3-H-6), 4.05 (m, 2H, H-9), 4.17 (s, 2H, H-2), 5.26 (t,  $J = 3.6$  Hz, H-8)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.05 (C-14'), 22.65 (C-13'), 26.90 (C-3'), 28.07 (C-2'), 29.69 (C-4'-C-11'), 31.90 (C-12'), 45.79 et 46.99 (C-1'), 49.96 (C-10), 70.13 (C-3), 70.56 (C-4-C-6), 71.24 (C-2), 72.07 (C-7), 77.12 (d, C-9), 103.66 (C-8), 162.49 (C-1)

➤ 2-{2-[2-(4,5-Bis-aminométhyl-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-N,N-ditétradécyl-acétamide (**36**)

$\text{C}_{40}\text{H}_{81}\text{N}_3\text{O}_6$   
 $M = 700.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



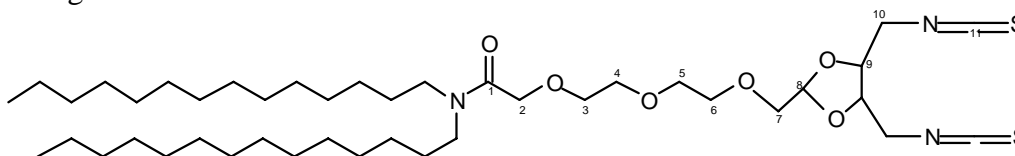
Un mélange de diazide **35** (0,30 g, 0,4 mmol) et de palladium sur charbon activé est ajouté (50 mg) dans 10 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène, puis agité pendant 19 heures à t.a. Le mélange réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré, pour obtenir une huile claire (304 mg, rendement quantitatif).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.80 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-14'), 1.20-1.32 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.45 (m, 4H, H-2'), 2.50 (m, 4H, NH), 2.78-2.93 (m, 4H, H-10), 3.09 et 3.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H, H-1'), 3.53 (d, 2H,  $J = 4.6$  Hz, H-7), 3.59-3.63 (m, 8H, H-3-H-6), 4.09 (m, 2H, H-9), 4.12 (s, 2H, H-2), 5.14 (t,  $J = 3.6$  Hz, H-8)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.11 (C-14'), 22.69 (C-13'), 27.05 (C-3'), 28.06 (C-2'), 29.69 (C-4'-C-11'), 31.93 (C-12'), 43.66 (C-10), 45.87 et 46.98 (C-1'), 69.88 (C-3), 70.55 (C-4-C-6), 71.17 (C-2), 72.44 (C-7), 80.50 (d, C-9), 102.33 (C-8), 168.69 (C-1)

➤ 2-{2-[2-(4,5-Bis-isothiocyanatométhyl-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-N,N-ditétradécyl-acétamide (**37**)

$\text{C}_{42}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$   
 $M = 784.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution de diamine **36** (0,26 g, 0,35 mmol), de DIPEA (0,18 mL, 1,0 mmol) et de disulfure de carbone (84  $\mu\text{L}$ , 1,4 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre sont agités pendant 90 minutes avant l'addition goutte-à-goutte d'une solution de chlorure de

paratoluènesulfonyle fraîchement recristallisé (0,13 g, 0,7 mmol) dissous dans 3 mL de dichlorométhane anhydre. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 20 heures. Après concentration, le produit brut est purifié sur cartouche de silice et on obtient 96 mg d'huile claire (35%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.87 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-14'), 1.22-1.29 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.51 (m, 4H, H-2'), 3.13 et 3.28 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H, H-1'), 3.62 (d, 2H,  $J = 4.3$  Hz, H-7), 3.65-3.73 (m, 8H, H-3-H-6), 3.79-3.84 (m, 4H, H-10), 4.16 (m, 2H, H-9), 4.18 (s, 2H, H-2), 5.34 (t,  $J = 3.6$  Hz, H-8)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.14 (C-14'), 22.70 (C-13'), 27.07 (C-3'), 28.96 (C-2'), 29.67 (C-4'-C-11'), 31.93 (C-12'), 45.87 et 46.44 (C-1'), 46.94 (C-10), 69.88 (C-3), 70.51 (C-4-C-6), 71.32 (C-2), 71.83 (C-7), 77.03 (d, C-9), 104.43 (C-8), 168.54 (C-1)

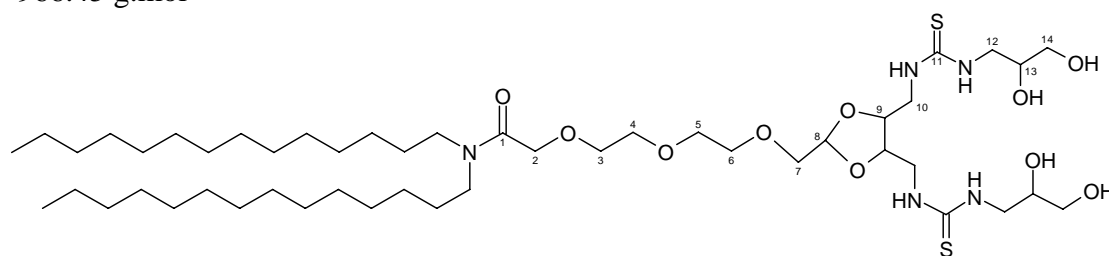
**IR (NaCl)** :  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 1116 ( $\nu_{\text{C-O-C}}$ ), 1460 ( $\delta_{\text{CH}_2}$ ), 1654 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 2095 ( $\nu_{\text{N=C=S}}$ ), 2852 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ), 2929 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ )

**CLHP** : 17.84 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 196$  nm,  $m/z = 785$  (M+H) $^+$

➤ **2-[2-(4-[4,5-Bis-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréidométhyl]-[1,3]-dioxolan-2-ylméthoxy)-éthoxy)-éthoxy]-N,N-ditétradécyl-acétamide (38)**

$\text{C}_{48}\text{H}_{95}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}_2$

$M = 966.45$  g.mol $^{-1}$



Une solution de 3-amino-1,2-propanediol (8 mg, 0,092 mmol), dans 100  $\mu\text{L}$  de DMF anhydre est additionnée à une solution d'isothiocyanate **37** (18 mg, 0,023 mmol) dans 200  $\mu\text{L}$  de DMF anhydre. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 20 heures puis évaporé à sec. Le résidu organique est dilué dans l'acétate d'éthyle, lavé trois fois par une solution de NaCl saturée, séché ( $\text{MgSO}_4$ ), filtré et concentré. Après purification sur cartouche de silice, on obtient 16 mg d'huile claire (72%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-14'), 1.22-1.29 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.52 (m, 4H, H-2'), 3.11 et 3.28 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H, H-1'), 3.50-3.75 (m, 22H, H-3-H-7, H-10, H-12 et H-14), 4.13-4.34 (m, 6H, H-2, H-9 et H-13), 5.25 (t,  $J = 3.6$  Hz, H-8)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.13 (C-14'), 22.72 (C-13'), 27.16 (C-3'), 28.94 (C-2'), 29.67 (C-4'-C-11'), 31.98 (C-12'), 45.44 (C-10 et C-12), 46.48 et 47.14 (C-1'), 63.74 (C-14), 68.98 (C-13), 69.84 (C-3), 70.28 (C-4-C-6), 70.59 (C-2), 71.39 (C-7), 78.35 (d, C-9), 101.93 (C-8), 169.06 (C-1), 183.55 (C-11)

**CLHP (1)** : 18.45 min, Gradient W3, colonne C4 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

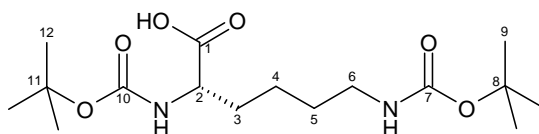
**CLHP (2)** : 14.65 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 242$  nm,  $m/z = 967$  (M+H) $^+$ , 989 (M+Na) $^+$ , 93%

**HR-ESMS** : Calculé ( $\text{C}_{48}\text{H}_{95}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{NaS}_2$ )  $m/z = 988.6418$

Trouvé  $m/z = 988.6389$

➤ Acide (S)-2,6-bis-*tert*-butoxycarbonylaminohexanoïque (**39**)

C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
M = 346.43 g.mol<sup>-1</sup>



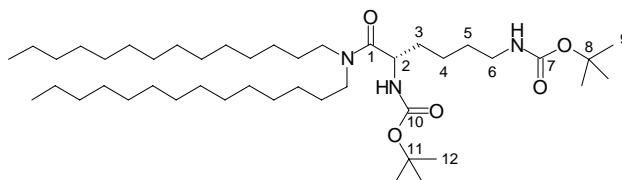
Une solution di-*tert*-butyldicarbonate (4,2 g, 19,4 mmol) dans 27 mL de THF est additionnée goutte-à-goutte à 0°C sur une solution de bis-chlorhydrate de la L-lysine (2,0 g, 9,3 mmol) dans une solution d'hydroxyde de soude 1N (27 mL). L'agitation est maintenue 20 heures avant neutralisation par ajout de 30 mL d'acide chlorhydrique 1N. Le mélange est extrait au dichlorométhane (3 fois 25 mL), la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée pour obtenir 2,7 g d'une huile claire (85%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20 (m, 2H, H-4), 1.38 (s, 9H, H-9 et H-12), 1.45 (m, 2H, H-5), 1.80 (m, 2H, H-3), 3.02 (m, 4H, H-6), 3.70 (m, 1H, H-2), 4.21 (m, 1H, NH), 5.35 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH), 6.05 (m, 1H, COOH)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 22.48 (C-4), 28.41 (C-9 et C-12), 29.51 (C-5), 32.23 (C-3), 40.23 (C-6), 53.27 (C-2), 79.18 (C-8), 79.80 (C-11), 155.94 (C-7 et C-10), 156.31 (C-10), 175.54 (C-1)

➤ (S)-[1-(bis-tétradécyl-carbamoyl)-5-*tert*-butyoxycaminopentyl]-carbamate de *tert*-butyle (**40**)

C<sub>44</sub>H<sub>87</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
M = 738.20 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'acide **39** (0,50 g, 1,44 mmol), de N-hydroxysuccinimide (0,17 g, 1,44 mmol), et de DCC (0,74 g, 3,60 mmol) dans 50 mL de THF fraîchement distillé sont agités pendant une heure avant l'addition de la ditétradécylamine **2** (0,50 g, 1,21 mmol). Le milieu est agité à t.a. pendant 20 heures. Il est alors lavé à l'eau, séché (MgSO<sub>4</sub>), et évaporé. Après purification sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 95:5), on obtient 0,73 g d'huile (67%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.88 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz, H-14'), 1.26 (m, 30H, H-3'-H13' et H-4), 1.44 (s, 9H, H-9 et H-12), 1.45 (m, 2H, H-5), 1.58 (m, 6H, H-3 et H-2'), 3.11 (m, 2H, H-1'), 3.25 (m, 2H, H-6), 3.49 (m, 2H, H-1'), 4.52 (m, 1H, H-2), 4.54 (m, 1H, NH), 5.39 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH)

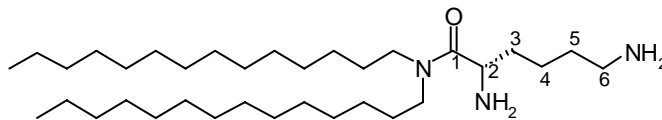
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.17 (C-14'), 22.76 (C-4 et C-13'), 27.05 (C-3'), 27.67 (C-2'), 28.45 (C-9 et C-12), 29.62 (C-5, C-4'-C-11'), 31.94 (C-12'), 33.74 (C-3), 40.40 (C-6), 46.10 et 47.85 (C-1'), 49.90 (C-2), 79.38 (C-8 et C-11), 155.94 (C-7 et C-10), 171.85 (C-1)

CLHP : 17.64 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 190 nm, *m/z* = 760 (M+Na)<sup>+</sup>, 99%

➤ (S)- 2,7-diamino-N,N-ditétradécyl-heptanamide (**41**)

C<sub>34</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O

M = 537.96 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution d'amide **40** (0,73 g, 1,0 mmol) dans 1 mL de dichlorométhane, est traitée par 4 mL de TFA (75% en volume). Le mélange est agité trois heures puis il est versé doucement sur un lit de NaHCO<sub>3</sub> solide. Après dilution à l'eau (40 mL) et filtration, le milieu est extrait au dichlorométhane (2 fois 15 mL). La phase aqueuse est traitée par NaOH 2N jusqu'à pH 9 puis extraite à nouveau au dichlorométhane (3 fois 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées, pour donner 0,36 g d'huile jaune (68%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.86 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz, H-14'), 1.23 (m, 30H, H-4, et H-3'-H-13'), 1.47 (m, 6H, H-5 et H-2'), 1.88 (m, 2H, H-3), 2.81 (m, 2H, H-6), 3.10 (m, 2H, H-1'), 3.24 (m, 2H, H-1'), 3.47 (m, 2H, H-2), 5.40 (m, 1H, NH).

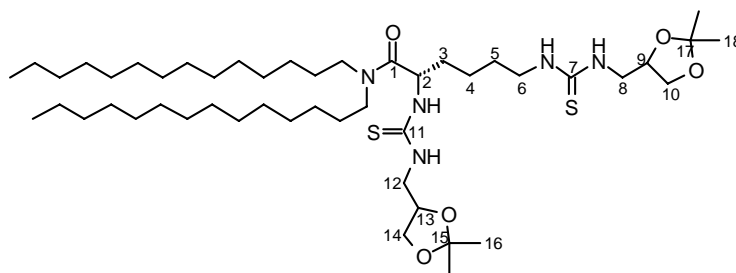
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.12 (C-14'), 22.72 (C-4 et C-13'), 27.10 (C-3'), 27.70 (C-2'), 29.70 (C-5, C-4'-C-11'), 31.97 (C-12'), 34.00 (C-3), 40.91 (C-6), 46.33 et 47.58 (C-1'), 51.48 (C-2), 171.85 (C-1)

CLHP : 9.87 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 197 nm, *m/z* = 539 (M+H)<sup>+</sup>, 90%

➤ (S)-N,N-ditétradécyl-2,6-bis[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-méthyl]-thiouréido-pentanamide (**42**)

C<sub>48</sub>H<sub>93</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>

M = 884.43 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution d'amine **41** (0,12 g, 0,22 mmol), et de DIPEA (0,3 mL, 2,2 mmol) dans 1,5 mL de dichlorométhane anhydre est agitée dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (97 mg, 0,55 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit, puis évaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 75 mg d'huile claire (38%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-4, H-5 et H-3'-H-13'), 1.33 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.37 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.44 (m, 4H, H-2'), 1.67 (m, 2H, H-3), 3.20 (m, 4H, H-6 et H-1'), 3.45 (m, 2H, H-1') 3.69 (m, 4H, H-8 et H-12), 4.05 (m, 4H, H-10 et H-14), 4.29 (m, 4H, H-9, H-13), 5.59 (m, 1H, H-2), 6.85 (m, 2H, NH), 7.80 (m, 2H, NH)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.15 (C-14'), 22.74 (C-13', C-4), 25.26 et 27.06 (C-16 et C-18), 27.15 (C-3'), 28.69 (C-5), 29.07 (C-2'), 29.68 (C-4'-C-11'), 31.97 (C-12'), 33.69 (C-3), 44.54 (C-6), 46.74 (C-1', C-8, C-12), 46.63 (C-1'), 53.74 (C-2), 66.61 (C-10, C-14), 75.01 (C-9 et C-13), 109.60 (C-15 et C-17), 172.79 (C-1), 183.19 (C-7 et C-11)

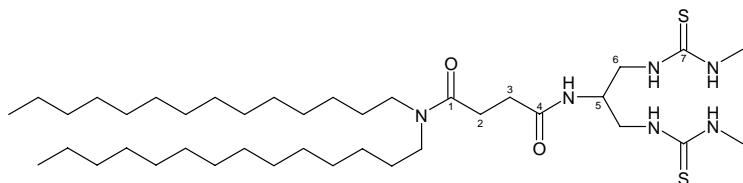
CLHP : 17.14 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 223$  nm et 244 nm,  $m/z = 907$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , 930 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ ) $^-$ , 99%

Analyse élémentaire : Calculé C = 65.19 ; H = 10.60 ; N = 7.92 ; S = 7.25  
 Trouvé C = 65.18 ; H = 10.66 ; N = 7.21 ; S = 6.58

HR-ESMS : Calculé ( $\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{N}_5\text{O}_5\text{NaS}_2$ )  $m/z = 906.6516$   
 Trouvé  $m/z = 906.6498$

➤ N-{2-(3-Méthyl-thiouréido)-1-[(3-méthyl-thiouréido)-méthyl]-éthyl}-N',N'-ditétradécyl-succinamide (**43**)

$\text{C}_{39}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$   
 $M = 727.22$  g.mol $^{-1}$



Un mélange d'amine **22** (58 mg, 0,1 mmol), de triéthylamine (14  $\mu\text{L}$ , 1 mmol), de méthyl isothiocyanate (11 mg, 0,15 mmol) sous atmosphère d'azote dans le dichlorométhane anhydre (1mL) est agité à température ambiante pendant 15h. Après évaporation, le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 46 mg d'huile (63%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 8.4$  Hz, H-14'), 1.25 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.46 (m, 4H, H-2'), 2.47 (m, 2H, H-2), 2.66 (d, 2H, H-3), 3.01 (s, 6H, H-8), 3.22 (m, 4H, H-1'), 3.75-3.90 (m, 5H, H-5 et H-6), 7.59 (m, 5H, NH)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.20 (C-14'), 22.79 (C-13'), 27.17 (C-3'), 28.01 (C-2'), 29.02 (C-2), 29.66 (C-4'-C-11'), 31.21 (C-8), 31.78 (C-3), 32.06 (C-12'), 44.75 (C-6), 46.83 et 48.51 (C-1'), 51.99 (C-5), 171.88 (C-1), 173.67 (C-4), 183.61 (C-7)

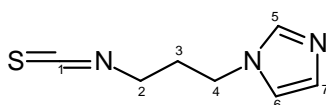
CLHP (**1**) : 27.69 min, Gradient W3, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm

CLHP (**2**) : 16.44 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 242$  nm,  $m/z = 728$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 774 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ ) $^-$ , 97%

HR-ESMS : Calculé ( $\text{C}_{39}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_2\text{NaS}_2$ )  $m/z = 749.5525$   
 Trouvé  $m/z = 749.5487$

➤ 1-(3-Isothiocyanato-propyl)-1H-imidazole (**44**)

$\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$   
 $M = 167.23$  g.mol $^{-1}$



Méthode A :

Une solution de 1-(3-aminopropyl)-imidazole (0,95 mL, 8,0 mmol) dans 4 mL de THF anhydre est additionnée goutte-à-goutte sur une solution de 1,6 g de DCC (8,0 mmol), et 3,3 mL de disulfure de carbone (54,5 mmol) dans 5 mL de THF anhydre refroidie à  $-7^{\circ}\text{C}$  par un bain de glace/  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (v/v 4/1). L'agitation est maintenue pendant 20 heures à t.a. Après évaporation, on précipite la dicyclohexylurée formée par de l'éther éthylique. La solution est filtrée, concentrée puis purifiée sur cartouche de silice pour obtenir 0,79 g d'huile (59%)

#### Méthode B :

Le di-2-pyridyl thionocarbonate (0,19 g, 0,8 mmol) est ajouté à une solution de 1-(3-Aminopropyl)-imidazole (0,1 g, 0,8 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. La réaction est agitée à t.a. pendant 15 heures. Le milieu réactionnel est dilué par 50 mL de dichlorométhane, lavé trois fois par une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée, puis trois fois par une solution de  $\text{NaCl}$  saturée. Après séchage ( $\text{MgSO}_4$ ), et évaporation, on obtient une huile orangée (80 mg, 60%).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.11 (p, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-3), 3.45 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-2), 4.08 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-4), 6.89 (m, 1H, H-6), 7.03 (m, 1H, H-7), 7.45 (s, 1H, H-5)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 31.19 (C-3), 41.95 (C-2), 43.51 (C-4), 118.79 (C-7), 130.07 (C-6), 137.19 (C-5)

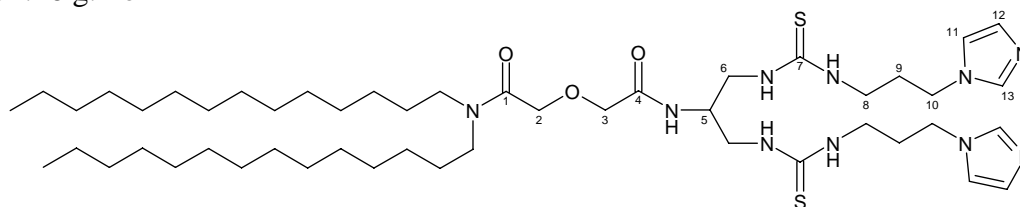
**IR** ( $\text{NaCl}$ ) :  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2110 ( $\nu_{\text{N}=\text{C}=\text{S}}$ ), 2878 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ), 2924 ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ), 3119 ( $\nu_{\text{CH}_2\text{alcènes}}$ )

**CLHP** : 2.33 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 242$  nm,  $m/z = 168$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 99%

#### ➤ 2-((2-[3-(3-pyrrol-1-yl-propyl)-thiouréido]-1-[3-(3-pyrrol-1-yl-propyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl)-méthoxy)-N,N-ditétradécylacétamide (**45**)

$\text{C}_{49}\text{H}_{90}\text{N}_{10}\text{O}_3\text{S}_2$

$M = 931.46$  g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'amine **23** (81 mg, 0,14 mmol), et de DIPEA (118  $\mu\text{L}$ , 0,7 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **44** (25 mg, 0,15 mmol). Le mélange est agité pendant deux heures puis chauffé à  $40^{\circ}\text{C}$ . la réaction est suivie par HPLC, et est arrêtée au bout de 30 heures. Le milieu est évaporé à sec, et le produit brut est purifié en présence de résine tris(2-aminoéthyl)amine pour fixer l'excès d'isothiocyanate. Après une nuit d'agitation mécanique, et suivi par IR, la résine est filtrée et le filtrat concentré pour donner 87 mg d'huile (67%).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-14'), 1.26 (m, 44H, H-3'-H-13'), 1.49 (m, 4H, H-2'), 2.06 (m, 2H, H-9), 3.05 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 3.26 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 3.37-3.71 (m, 8H, H-6 et H-8), 4.02 (m, 6H, H-5 et H-10), 4.08 (m, 2H, H-3), 4.26 (m, 2H, H-2), 6.94 (s, 1H, H-11), 6.98 (s, 1H, H-12), 7.57 (s, 1H, H-13 et NH), 8.48 (m, 1H, NH)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 13.99 (C-14'), 22.60 (C-13'), 27.01 (C-3'), 28.91 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-11'), 30.44 (C-9), 31.84 (C-12'), 41.35 (C-8), 42.31 (C-6), 44.57 (C-10), 46.35 et

46.93 (C-1'), 51.04 (C-5), 69.62 (C-2), 71.76 (C-3), 118.92 (C-11), 129.12 (C-12), 137.36 (C-13), 168.45 (C-1) 170.95 (C-4), 183.64 (C-7)

**IR (NaCl)** : 1659 ( $\nu_{C=O}$ ), 2852 ( $\nu_{CH_2}$ ), 2914 ( $\nu_{CH_2}$ ), 3067 ( $\nu_{CH_2}$ alcènes)

**CLHP (1)** : 10.63 min, Gradient W4, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{max}$  = 240 nm.

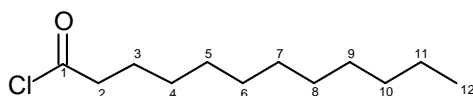
**CLHP (2)** : 9.93 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{max}$  = 240 nm,  $m/z$  = 466 ((M+2H)/2)<sup>+</sup>, 978 (M+HCOO)<sup>-</sup>, 90%

**HR-ESMS** : Calculé (C<sub>49</sub>H<sub>90</sub>N<sub>10</sub>O<sub>3</sub>NaS<sub>2</sub>)  $m/z$  = 953.6537  
Trouvé  $m/z$  = 953.6570

### ➤ Chlorure de dodécanoyle (**46**)

C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>ClO

M = 218.77 g.mol<sup>-1</sup>



Le chlorure de thionyle (3,6 mL, 35 mmol) est additionné goutte-à-goutte sur une solution d'acide dodécanoïque (5,0 g, 25 mmol) dans 250 mL de dichlorométhane anhydre en présence de résine Amberlyst-21 est ajoutée (12,5 g, 60 mmol) à 0°C. La réaction est suivie par RMN pendant 4 heures. Le mélange est filtré, la résine est rincée au dichlorométhane et le filtrat est concentré pour donner 5,5 g de liquide brun (rendement quantitatif)

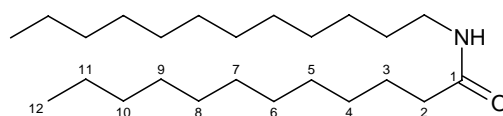
**<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 3H,  $J$  = 6.5 Hz, H-12), 1.26 (m, 16H, H-4-H-11), 1.71 (p, 2H,  $J$  = 6.5 Hz, H-3), 2.85 (t, 2H,  $J$  = 7.5 Hz, H-2)

**<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 14.16 (C-12), 22.75 (C-11), 25.15 (C-3), 28.52 (C-4), 29.15 (C-5), 29.40 (C-6 et C-8), 29.60 (C-7 et C-10), 31.97 (C-9), 47.19 (C-2), 172.48 (C-1)

### ➤ N,N-dodécyl-dodécanamide (**47**)

C<sub>24</sub>H<sub>49</sub>NO

M = 367.66 g.mol<sup>-1</sup>



La dodécylamine (6,3 mL, 27 mmol) est ajoutée goutte-à-goutte à 0°C sur une solution de chlorure d'acide **46** (5,6 g, 25 mmol) dans 250 mL de dichlorométhane anhydre en présence de résine Amberlyst-21 (10,4 g, 50 mmol). La réaction est agitée à t.a. pendant 16 heures, avant filtration du milieu réactionnel. Le produit brut est purifié sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 9:1 puis 7:3) pour obtenir 3,0 g de solide blanc (33%)

**PF** = 74°C

**<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J$  = 6.0 Hz, H-12 et H-12'), 1.26 (m, 36H, H-4-H-11 et H-3'-H-11'), 1.48 (t, 2H,  $J$  = 6.9 Hz, H-3), 1.62 (t, 2H,  $J$  = 6.9 Hz, H-2'), 2.15 (t, 2H,  $J$  = 6.9 Hz, H-2), 3.24 (q, 2H,  $J$  = 6.9 Hz, H-1'), 5.40 (m, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 14.17 (C-12 et C-12'), 22.77 (C-11 et C-11'), 25.97 (C-3), 27.01 (C-3'), 29.69 (C-4-C-9 et C-4'-C-9'), 32.00 (C-2', C-10' et C-10), 37.06 (C-2), 39.59 (C-1'), 170.17 (C-1)

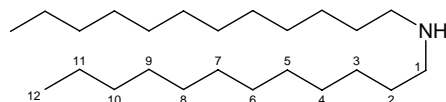
**CLHP** : 14.22 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\max} = 195$  nm,  $m/z = 368$  (M+H)<sup>+</sup>, 409 (M+CH<sub>3</sub>CN)<sup>+</sup> 99%

**Analyse élémentaire** :      Calculé      C = 78.41 ; H = 13.43 ; N = 3.81  
   Trouvé      C = 78.36 ; H = 13.44 ; N = 3.71

➤ **N,N-Didodécylamine (48)**

C<sub>24</sub>H<sub>51</sub>N

M = 353.68 g.mol<sup>-1</sup>



L'hydrure de lithium et d'aluminium (0,62 g, 15,5 mmol) est ajouté par portions à 0°C à une solution d'amide **47** (3,0 g, 8,2 mmol) dans 120 mL de THF anhydre fraîchement distillé. Le mélange est ensuite chauffé au reflux pendant 17 heures puis refroidi par un bain de glace. L'excès d'hydrure est détruit par l'addition successive de 0,5 mL d'eau, 1 mL de NaOH 2N, puis 0,5 mL d'eau. Après 30 minutes d'agitation vigoureuse à température ambiante, le mélange est filtré et le filtrat est évaporé pour obtenir 2,5 g de solide blanc (86%).

**PF** = 41°C

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-12), 1.26 (m, 36H, H-3-H-11), 1.48 (m, 2H, H-2), 1.73 (s, 1H, NH), 2.59 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1)

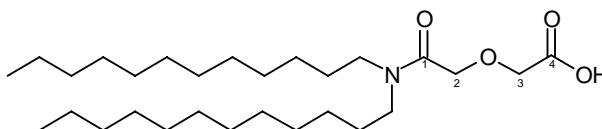
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 14.17 (C-12), 22.75 (C-11), 27.50 (C-3), 29.70 (C-4-C-9), 30.17 (C-2), 31.99 (C-10), 50.16 (C-1)

**CLHP** : 10.21 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\max} = 222$  nm,  $m/z = 354$  (M+H)<sup>+</sup>, 395 (M+CH<sub>3</sub>CN)<sup>+</sup>, 95%

➤ **Acide didodécylcarbamoylméthoxy-acétique (49)**

C<sub>28</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

M = 469.75 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange de didodécylamine **48** (1,0 g, 1,4 mmol), d'anhydride diglycolique préalablement déshydraté (1,6 g, 14,1 mmol), et de DMAP (0,17 g, 1,4 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane anhydre est agité à t.a. pendant 23 heures. Le milieu réactionnel est dilué par 200 mL de dichlorométhane, lavé trois fois par HCl 1N, trois fois par une solution saturée de NaCl, et séché (MgSO<sub>4</sub>), et évaporé. Le brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 1,1 g de solide clair (84%).

**PF** = 55°C

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-12'), 1.26 (m, 36H, H-3'-H-11'), 1.55 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz, H-2'), 3.08 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.35 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 4.21 (s, 2H, H-2), 4.38 (s, 2H, H-3)

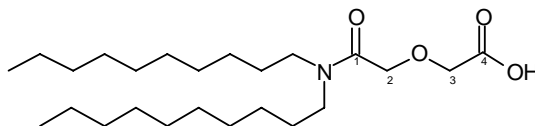


$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.18 (C-12'), 22.76 (C-11'), 27.02 (C-3'), 27.51 (C-2') 29.70 (C-4'-C-9'), 31.98 (C-10'), 46.98 (C-1'), 71.32 (C-2), 73.15 (C-3), 170.68 (C-1), 174.13 (C-4)

CLHP : 14.44 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 198$  nm,  $m/z = 470$  (M+H)<sup>+</sup>, 468 (M-H)<sup>-</sup>, 100%

➤ **Acide didécylcarbamoylméthoxy-acétique (50)**

$\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_4$   
 $M = 413.65$  g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange de didécylamine (3,0 g, 10 mmol), d'anhydride diglycolique (4,7 g, 40 mmol) préalablement déshydraté, et de DMAP (0,6 g, 5 mmol) dans 100 mL de dichlorométhane anhydre est agité à t.a. pendant 20 heures. Après dilution au dichlorométhane (150 mL), le milieu est lavé trois fois par 50 mL d'une solution de HCl 1N, et 50 mL d'une solution saturée de NaCl, séché sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporé pour obtenir une huile qui se solidifie à froid (4,14 g, rendement quantitatif).

PF = 55°C

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.25 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.53 (m, 4H, H-2'), 3.08 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 3.33 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 4.19 (s, 2H, H-2), 4.39 (s, 2H, H-3)

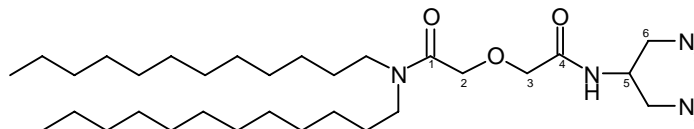
$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.08 (C-10'), 22.69 (C-9'), 26.85 (C-3'), 27.45 (C-7'), 28.67 (C-6'), 29.30 (C-4' et C-5'), 29.51 (C-2'), 31.89 (C-8'), 46.93 (C-1'), 71.20 (C-2), 72.78 (C-3), 170.7 (C-1), 171.1 (C-4)

CLHP : 12.98 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 197$  nm,  $m/z = 414$  (M+H)<sup>+</sup>, 412 (M-H)<sup>-</sup>, 100%

Analyse élémentaire :	Calculé	C = 69.69 ; H = 11.22 ; N = 3.30
	Trouvé	C = 69.00 ; H = 11.35 ; N = 3.39

➤ **2-[(2-Azido-1-azidométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-N,N-didodécylacétamide (51)**

$\text{C}_{31}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_3$   
 $M = 592.88$  g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'acide **49** (0,50g, 1,06 mmol), de N-hydroxysuccinimide (0,12 mg, 1,06 mmol) et de DCC (0,55 g, 2,65 mmol) dans 10 mL de THF fraîchement distillé est agité pendant deux heures à t.a., avant l'ajout de l'amine **17** (0,13mg, 0,89 mmol) dans 2 mL de THF anhydre. L'agitation est poursuivie 19 heures. Le milieu est alors concentré puis dilué dans l'acétate d'éthyle, lavé deux fois à l'eau puis deux fois par une solution saturée de NaCl. Après séchage ( $\text{MgSO}_4$ ), filtration et évaporation du solvant, le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir finalement 0,51 g d'huile jaune (81%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-12'), 1.26 (m, 36H, H-3'-H-11'), 1.50 (t, 4H,  $J = 6.9$  Hz, H-2'), 3.04 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.30 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 3.45 (dd, 4H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 12.3$  Hz, H-6), 3.53 (dd, 4H,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 12.3$  Hz, H-6), 4.09 (s, 2H, H-3), 4.20 (m, 1H, H-5), 4.25 (s, 2H, H-2), 8.70 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.12 (C-12'), 22.72 (C-11'), 27.04 (C-3'), 27.62 (C-2') 29.70 (C-4'-C-9'), 31.95 (C-10'), 46.42 (C-1'), 46.89 (C-1'), 48.43 (C-5), 51.51 (C-6), 70.30 (C-2), 72.63 (C-3), 168.68 (C-1), 170.28 (C-4)

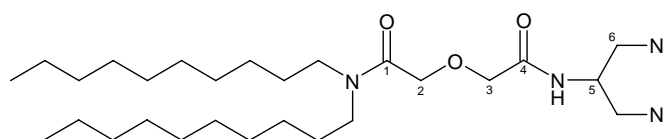
**Analyse élémentaire :**

Calculé	C = 62.80 ; H = 10.20 ; N = 18.90
Trouvé	C = 63.37 ; H = 10.31 ; N = 17.04

➤ **2-[(2-azido-1-azidométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-N,N-bis-décyl-acétamide (52)**

$\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_3$

$M = 536.77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution de DCC (2,3 g, 11,1 mmol) dans le dichlorométhane (25 mL) est additionnée goutte-à-goutte à une solution d'acide **50** (3,0 g, 7,4 mmol) et d'amine **17** (1,1 g, 7,7 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. Le mélange est agité 20 heures à t.a. avant évaporation du solvant. Après l'ajout d'éther (50 mL) il se forme un précipité blanc qui est filtré sur célite. Le filtrat, concentré, est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 2,3 g d'huile (58%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.25 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.51 (m, 4H, H-2'), 3.05 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 3.31 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 3.47 (dd, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-6), 3.55 (dd, 2H,  $J = 6.0$  Hz, H-6), 4.10 (s, 2H, H-3), 4.22 (m, 1H, H-5), 4.27 (s, 2H, H-2), 8.77 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.12 (C-10'), 22.71 (C-9'), 26.94 (C-3'), 27.63 (C-7'), 28.94 (C-6'), 29.36 (C-4' et C-5'), 29.56 (C-2'), 31.92 (C-8'), 46.43 et 46.90 (C-1'), 48.42 (C-5), 51.52 (C-6), 70.31 (C-2), 72.65 (C-3), 168.65 (C-1), 170.25 (C-4)

**CLHP :** 13.12 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 198 \text{ nm}$ ,  $m/z = 537 (\text{M}+\text{H})^+$ ,  $559 (\text{M}+\text{Na})^+$ ,  $536 (\text{M}-\text{H})^-$ ,  $572 (\text{M}+\text{Cl})^-$ ,  $582 (\text{M}+\text{HCOO})^-$ , 89%

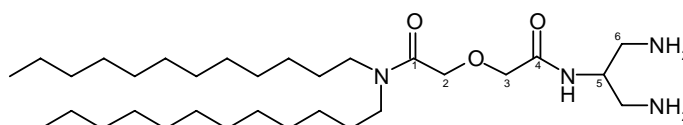
**Analyse élémentaire :**

Calculé	C = 60.42 ; H = 9.76 ; N = 20.73
Trouvé	C = 60.64 ; H = 9.88 ; N = 20.73

➤ **2-[(2-Amino-1-aminométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-N,N-didodécylacétamide (53)**

$\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_3$

$M = 538.91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'azide **51** (0,4 g, 0,68 mmol) et palladium sur charbon activé (50 mg) dans 12 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène, puis agité pendant une nuit à t.a.

Le mélange réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré, pour obtenir une huile claire (232 mg, 63%).

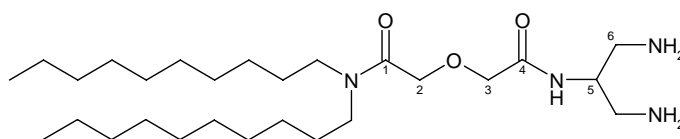
$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-12'), 1.24 (m, 36H, H-3'-H-11'), 1.49 (m, 4H, H-2'), 3.06 (m, 4H, H-6), 3.26 (m, 4H, H-1'), 3.94 (m, 4H, H-5), 4.09 (s, 2H, H-3), 4.26 (s, 2H, H-2), 8.41 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.11 (C-12'), 22.71 (C-11'), 26.99 (C-3'), 27.70 (C-2') 29.40 (C-4'-C-9'), 31.96 (C-10'), 42.42 (C-6), 46.32 (C-1'), 46.99 (C-1'), 51.12 (C-5), 69.64 (C-2), 71.82 (C-3), 168.53 (C-1), 170.01 (C-4)

➤ **2-[(2-amino-1-aminométhyl-éthylcarbamoyle)-méthoxy]-N,N-bis-décyl-acétamide (54)**

$\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_3$

$M = 484.79 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'azide **52** (2,3 g, 4,3 mmol) et de palladium sur charbon activé (300 mg) dans 70 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène, puis agité pendant 17 heures. Le mélange réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré, purifié sur cartouche de silice pour obtenir une huile claire (1,5 g, 72%).

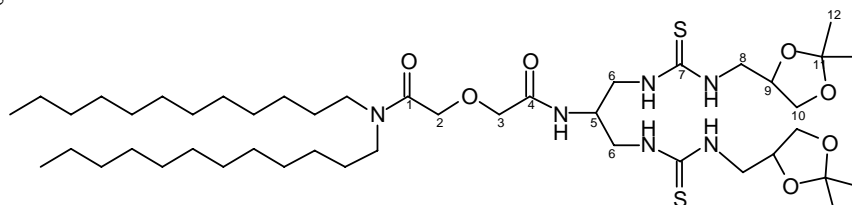
$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.84 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.25 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.48 (m, 4H, H-2'), 1.77 (m, 4H, NH<sub>2</sub>), 2.54 (dd, 1H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 12.0$  Hz, H-6), 2.71 (dd, 1H,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 12.6$  Hz, H-6), 3.05 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 3.26 (m, 3H, H-1', H-5), 3.39 (s, 2H, H-3), 4.05 (s, 2H, H-2), 8.20 (m, 1H, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.11 (C-10'), 22.69 (C-9'), 26.94 (C-3'), 27.66 (C-7'), 28.98 (C-6'), 29.35 (C-4' et C-5'), 29.55 (C-2'), 31.90 (C-8'), 43.46 (C-6), 46.28 et 46.90 (C-1'), 53.35 (C-5), 69.78 (C-2), 72.15 (C-3), 168.65 (C-1), 170.25 (C-4)

➤ **2-({2-[3-(2,2-Diméthyl-1,2-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyle}-méthoxy)-N,N-didodécylacétamide (55)**

$\text{C}_{45}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$

$M = 887.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'amine **53** (0,11 mg, 0,20 mmol) et de DIPEA (0,35 mL, 2,0 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (87 mg, 0,50 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit à t.a., puis

éaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice (gradient de 100% d'heptane à 100% AcOEt puis à 100% d'acétone), pour obtenir 110 mg d'huile jaune (62%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-12'), 1.26 (m, 36H, H-3'-H-11'), 1.33 (s, 6H, H-12), 1.41 (s, 6H, H-12), 1.52 (m, 4H, H-2'), 3.09 (t, 2H,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 3.30 (t, 2H,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 3.67-3.80 (m, 8H, H-6 et H-8), 4.08 (m, 6H, H-3 et H-10), 4.29 (m, 7H, H-2, H-5, H-9), 7.68 (m, 4H, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.15 (C-12'), 22.74 (C-11'), 25.41 et 26.98 (C-12), 27.77 (C-3'), 29.06 (C-2'), 29.68 (C-4'-C-9'), 31.98 (C-10'), 40.05 (C-6 et C-8), 46.72 et 47.17 (C-1'), 49.56 (C-5), 66.97 (C-10), 70.08 (C-2), 72.06 (C-3), 74.43 (C-9), 109.64 (C-11), 168.68 (C-1) 171.15 (C-4), 183.05 (C-7)

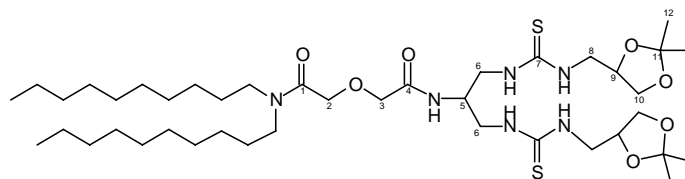
**CLHP** : 14.90 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 213$  nm et 246 nm,  $m/z = 887$  (M+H)<sup>+</sup>, 886 (M+H)<sup>-</sup>, 934 (M+Cl)<sup>-</sup>, 91%

**Analyse élémentaire** :

Calculé	C = 60.91 ; H = 9.77 ; N = 9.47 ; S = 7.23
Trouvé	C = 61.05 ; H = 10.21 ; N = 9.81 ; S = 6.93

➤ **2-({2-[3-(2,2-Diméthyl-1,2-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyle}-méthoxy)-N,N-didécylacétamide (**56**)**

$\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$   
 $M = 831.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'amine **54** (0,24 g, 0,50 mmol) et de DIPEA (0,87 mL, 5,0 mmol) dans 4 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (0,22 g, 1,25 mmol). Le mélange est agité pendant 12 heures à t.a. puis évaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice (gradient de l'heptane à l'acétate d'éthyle à l'acétone) pour obtenir 0,37 mg d'huile jaune (89%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-10'), 1.23 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.30 (s, 3H, H-12), 1.39 (s, 3H, H-12), 1.49 (m, 4H, H-2'), 3.06 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 3.27 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 3.68 (m, 8H, H-6 et H-8), 4.04 (m, 6H, H-3 et H-10), 4.25 (m, 7H, H-2, H-5, H-9)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.12 (C-10'), 22.70 (C-9'), 25.39 et 26.95 (C-12), 26.95 (C-3'), 27.72 (C-2'), 29.57 (C-4'-C-7'), 31.91 (C-8'), 40.02 (C-6 et C-8), 46.64 et 47.11 (C-1'), 51.30 (C-5), 66.92 (C-10), 69.95 (C-2), 71.89 (C-3), 74.43 (C-9), 109.55 (C-11), 168.56 (C-1) 171.05 (C-4), 182.78 (C-7)

**CLHP** : 12.61 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 211$ nm et 245 nm,  $m/z = 829$  (M-H)<sup>-</sup>, 831 (M+H)<sup>+</sup>, 853 (M+Na)<sup>+</sup>, 81%

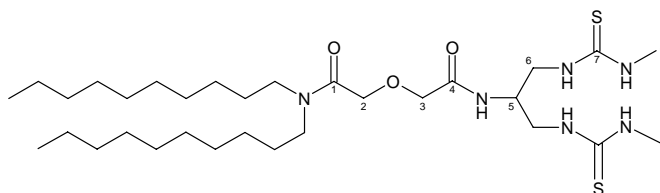
**Analyse élémentaire** :

Calculé	C = 59.24 ; H = 9.46 ; N = 10.11 ; S = 7.71
Trouvé	C = 58.97 ; H = 9.47 ; N = 10.03 ; S = 7.24

➤ **N,N-Bis-décyl-2-({2-(3-méthyl-thiouréido)-1-[(3-méthyl-thiouréido)-méthyl]-éthylcarbamoyl}-méthoxy)-acétamide (57)**

$C_{31}H_{62}N_6O_3S_2$

$M = 631.01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'amine **54** (2,0 mg, 4,13 mmol) et de triéthylamine (0,58 mL, 4,13 mmol) est agité pendant 15 minutes avant l'ajout de dichlorométhane anhydre (41 mL) et du méthylisothiocyanate (0,71 mL, 10,33 mmol). Le mélange est agité à t.a. pendant une nuit puis la triéthylamine est évaporée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 2,35 g d'huile (90%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.25 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.52 (m, 4H, H-2'), 3.01 (s, 6H, H-8), 3.08 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 3.29 (m, 3H, H-1'), 3.40 (m, 1H, H-5), 3.51-3.98 (m, 4H, H-6), 4.13 (s, 2H, H-3), 4.30 (s, 2H, H-2), 7.60 (m, 1H, NH), 8.54 (m, 4H, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 14.88 (C-10'), 22.79 (C-9'), 27.22 (C-3'), 27.80 (C-7'), 29.07 (C-6'), 29.44 (C-4' et C-5'), 29.66 (C-2'), 32.01 (C-8' et C-8), 41.39 (C-6), 46.63 et 47.15 (C-1'), 50.96 (C-5), 69.89 (C-2), 71.97 (C-3), 168.73 (C-1), 171.54 (C-4), 184.00 (C-7)

**CLHP (1):** 10.58 min, gradient W3, colonne C4 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm.

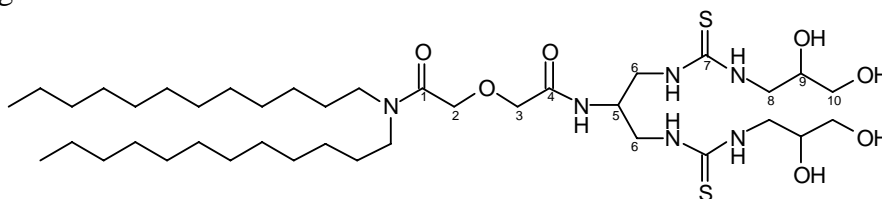
**CLHP (2):** 12.51 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 240$  nm,  $m/z = 631$  (M+H)<sup>+</sup>, 666 (M+Cl)<sup>-</sup>, 676 (M+HCOO)<sup>-</sup>, 98%

<b>Analyse élémentaire :</b>	Calculé	C = 59.01 ; H = 9.90 ; N = 13.32 ; S = 10.13
	Trouvé	C = 59.85 ; H = 9.79 ; N = 13.13 ; S = 8.58

➤ **2-({2-[3-(2,3-Dihydroxy-propyl)-thiouréido]-1-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl}-méthoxy)-N,N-ditétradécylacétamide (58)**

$C_{39}H_{78}N_6O_7S_2$

$M = 807.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution de thiourée **55** (80 mg, 0,09 mmol) dans 0,5 mL de THF est traitée par 0,5 mL d'acide chlorhydrique 1N. La réaction est suivie par HPLC analytique, et arrêtée après 2 heures et demie d'hydrolyse. Après évaporation à froid, le milieu est lyophilisé pour donner 80 mg d'huile claire (73%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-12'), 1.26 (m, 36H, H-3'-H-11'), 1.53 (m, 4H, H-2'), 3.10 (m, 2H, H-1'), 3.29 (m, 2H, H-1'), 3.62 (m, 8H, H-6 et H-8), 3.92 (m, 1H,

H-5), 4.17 (m, 6H, H-3 et H-10), 4.34 (m, 6H, H-2, H-9), 4.72 (m, 4H, OH), 7.60 (m, 4H, NH)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.17 (C-12'), 22.76 (C-11'), 27.70 (C-3'), 28.91 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-9'), 32.00 (C-10'), 40.61 (C-6 et C-8), 46.79 et 47.36 (C-1'), 49.94 (C-5), 63.92 (C-10), 69.32 (C-2), 71.13 (C-3, C-9), 169.05 (C-1) 171.70 (C-4), 182.85 (C-7)

CLHP : 13.10 min, gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}}$  : 219nm et 243 nm,  $m/z = 807$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 843 ( $\text{M}+\text{Cl}$ )<sup>-</sup>, 99%

Analyse élémentaire : Calculé (+H<sub>2</sub>O) C = 56.83 ; H = 9.66 ; N = 10.20 ; S = 7.78

Trouvé C = 56.13 ; H = 9.95 ; N = 9.50 ; S = 6.33

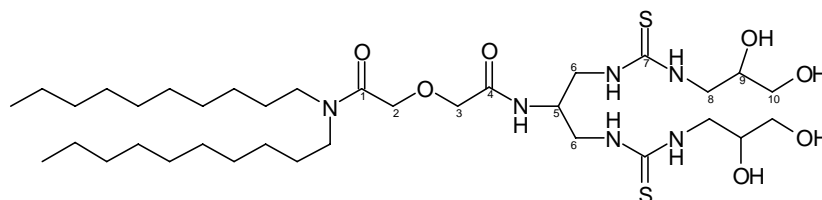
HR-ESMS : Calculé (C<sub>43</sub>H<sub>86</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>NaS<sub>2</sub>)  $m/z = 829.5271$

Trouvé  $m/z = 829.5245$

➤ 2-({2-[3-(2,3-Dihydroxy-propyl)-thiouréido]-1-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl}-méthoxy)-N,N-didécylacétamide (**59**)

C<sub>35</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>

M = 751.11 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution de thiourée **56** (0,19 g, 0,23 mmol) dans 2,1 mL de THF est traitée par 2,1 mL d'acide chlorhydrique 1N. La réaction est suivie par HPLC analytique, et arrêtée après 3 heures d'hydrolyse. Après évaporation à froid puis le milieu est lyophilisé pour donner 0,17 g d'huile claire (96%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.23 (m, 28H, H-3'-H-9'), 1.54 (m, 4H, H-2'), 2.14 (s, 4H, OH), 3.09 (m, 2H, H-1'), 3.30 (m, 2H, H-1'), 3.63 (m, 8H, H-6 et H-8), 3.92 (m, 1H, H-5), 4.13 (m, 6H, H-3 et H-10), 4.31 (m, 7H, H-2, H-9), 7.50 (m, 5H, NH)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.18 (C-10'), 22.76 (C-9'), 27.02 (C-3'), 27.70 (C-2'), 29.45 (C-4'-C-7'), 31.98 (C-8'), 40.36 (C-6 et C-8), 46.83 et 47.32 (C-1'), 51.00 (C-5), 63.98 (C-10), 69.52 (C-2), 71.16 (C-3, C-9), 169.28 (C-1) 171.92 (C-4), 183.38 (C-7)

CLHP : 11.81 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 213$  nm et 245 nm,  $m/z = 751$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 787 ( $\text{M}+\text{Cl}$ )<sup>-</sup>, 796 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ )<sup>-</sup>, 96%

Analyse élémentaire : Calculé C = 55.97 ; H = 9.39 ; N = 11.19 ; S = 8.54

Trouvé C = 56.63 ; H = 9.59 ; N = 9.66 ; S = 5.94

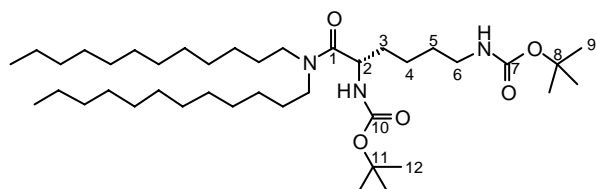
HR-ESMS : Calculé (C<sub>35</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>NaS<sub>2</sub>)  $m/z = 773.4645$

Trouvé  $m/z = 773.4652$

➤ (S)-[1-(bis-dodécyl-carbamoyl)-5-tert-butyloxyaminopentyl]-carbamate de tert-butyle (**60**)

C<sub>40</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

M = 682.09 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution d'acide **39** (0,71 g, 2,05 mmol), de N-hydroxysuccinimide (0,24 g, 2,05 mmol), et de DCC (1,06 g, 5,1 mmol) dans 60 mL de THF anhydre est agitée pendant 2 heures avant l'addition de la didodécylamine **48** (0,61 g, 1,72 mmol), et l'agitation est maintenue pendant 20 heures à t.a. Le milieu est alors lavé à l'eau, séché sur  $\text{MgSO}_4$ , et évaporé. La dicyclohexylurée formée est précipitée dans l'éther, le filtrat est concentré puis purifié sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 95:5). On obtient 0,65 g d'huile (46%).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.84 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-12'), 1.22 (m, 38H, H-3'-H-11' et H-4), 1.39 (s, 9H, H-9 et H-12), 1.49 (m, 2H, H-5), 1.54 (m, 6H, H-3 et H-2'), 3.06 (m, 2H, H-1'), 3.22 (m, 2H, H-6), 3.45 (m, 2H, H-1'), 4.49 (m, 1H, H-2), 4.68 (m, 1H, NH), 5.36 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, NH)

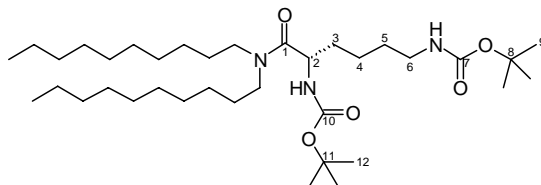
$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.09 (C-12'), 22.65 (C-4 et C-11'), 26.99 (C-3'), 27.63 (C-2'), 28.42 (C-9, C-12), 29.38 (C-5), 29.62 (C-4'-C-11'), 31.93 (C-10'), 33.81 (C-3), 40.43 (C-6), 46.07 et 47.83 (C-1'), 49.89 (C-2), 78.95 (C-8), 79.39 (C-11), 155.56 (C-7), 156.03 (C-10), 171.92 (C-1)

**CLHP** : 24.22 min, Gradient S2, colonne C8 VYDAC,  $\lambda_{\text{max}} = 190$  nm,  $m/z = 682$  (M+H)<sup>+</sup>, 704 (M+Na)<sup>+</sup>

➤ **(S)-[1-(didécyl-carbamoyl)-5-tert-butyloxyaminopentyl]-carbamate de tert-butyle (**61**)**

$\text{C}_{36}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_5$

$M = 625.98 \cdot \text{mol}^{-1}$



Une solution d'acide **39** (0,28 g, 0,81 mmol), de N-hydroxysuccinimide (93 mg, 0,81 mmol), et de DCC (0,42 g, 2,03 mmol) dans 30 mL de THF fraîchement distillé est agitée pendant une heure à t.a. avant l'addition de la didécylamine (0,20 g, 0,68 mmol). L'agitation est maintenue pendant 17 heures. Le milieu est alors concentré puis dilué au dichlorométhane (30 mL), lavé à l'eau, séché sur  $\text{MgSO}_4$ , et évaporé. Après purification sur cartouche de silice puis sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 9/1), on obtient 0,32 g d'huile (63%).

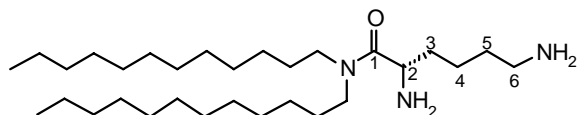
$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.26 (m, 30H, H-3'-H-9' et H-4), 1.43 (s, 9H, H-9 et H-12), 1.45 (m, 2H, H-5), 1.55 (m, 4H, H-2'), 1.80 (m, 2H, H-3), 3.11 (m, 2H, H-1'), 3.25 (m, 2H, H-6), 3.47 (m, 2H, H-1'), 4.52 (m, 1H, H-2), 4.54 (m, 1H, NH), 5.35 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH).

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.11 (C-10'), 22.73 (C-4 et C-9'), 27.05 (C-3'), 27.67 (C-2'), 28.45 (C-9 et C-12), 29.62 (C-5, C-4'-C-7'), 31.95 (C-8'), 33.09 (C-3), 40.51 (C-6), 46.10 et 47.86 (C-1'), 49.92 (C-2), 79.18 (C-8), 79.80 (C-11), 155.94 (C-7 et C-10), 156.31 (C-10), 171.52 (C-1)

➤ (S)- 2,7-diamino-N,N-didodécyl-heptanamide (**62**)

C<sub>30</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O

M = 481.86 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution d'amide **60** (0,65 g, 0,95 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane est traitée par 8 mL de TFA (75% en volume). Le mélange est agité pendant 3 heures puis il est versé sur un lit de NaHCO<sub>3</sub>. Après filtration, le milieu est extrait au dichlorométhane (2 fois 15 mL). La phase aqueuse est traitée par NaOH 2N jusqu'à pH 9 puis extraite à nouveau au dichlorométhane (3 fois 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées, pour donner 0,5 g d'huile jaune (quantitatif).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.86 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz, H-12'), 1.23 (m, 38H, H-4, et H-3'-H11'), 1.49 (m, 6H, H-3, H-5, H-2'), 2.94 (m, 2H, H-6), 3.11 (m, 4H, H-1'), 3.80 (m, 2H, H-2), 6.24 (m, 4H, NH).

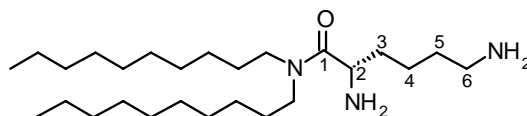
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.09 (C-12'), 21.89 (C-4), 22.71 (C-13'), 27.12 (C-3'), 27.51 (C-2'), 29.70 (C-5, C-4'-C-9'), 31.96 (C-10'), 33.94 (C-3), 39.16 (C-6), 46.50 et 47.72 (C-1'), 50.73 (C-2), 173.10 (C-1)

CLHP : 9.31 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 198 nm, *m/z* = 483 (M+H)<sup>+</sup>, 262 ((M+2H+2Na)/2)<sup>+</sup>, 88%

➤ (S)- 2,7-diamino-N,N-didécyl-heptanamide (**63**)

C<sub>26</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O

M = 425.75.mol<sup>-1</sup>



Une solution d'amide **61** (1,31 g, 2,1 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane est traitée par 8 mL de TFA (75% en volume). Le mélange est agité 24 heures puis il est versé sur un lit de NaHCO<sub>3</sub>. Après filtration, le milieu est extrait au dichlorométhane (2 fois 30 mL). La phase aqueuse est traitée par NaOH 2N jusqu'à pH 9 puis extraite à nouveau au dichlorométhane (3 fois 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées, pour donner 0,9 g d'huile jaune (rendement quantitatif)

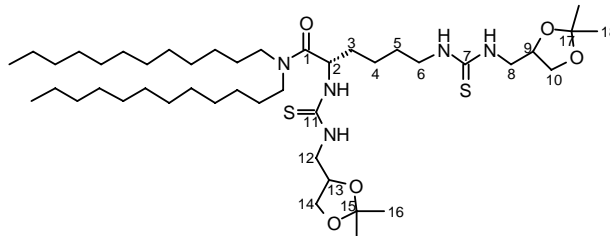
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz, H-10'), 1.26 (m, 30H, H-3'-H9' et H-4), 1.55 (m, 6H, H-2' et H-5), 1.65 (m, 2H, H-3), 2.03 (m, 4H, NH), 2.72 (m, 2H, H-6), 3.11 (m, 2H, H-1'), 3.24 (m, 2H, H-1'), 3.52 (m, 2H, H-2), 5.40 (m, 1H, NH).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.13 (C-10'), 22.74 (C-9'), 23.22 (C-4), 27.08 (C-3'), 27.78 (C-2'), 29.62 (C-5, C-4'-C-7'), 31.94 (C-8'), 33.06 (C-3), 41.74 (C-6), 46.28 et 47.55 (C-1'), 51.17 (C-2), 173.05 (C-1)



➤ (S)-N,N-didodécyl-2,6-bis[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-méthyl]-thiouréido-pentanamide (**64**)

C<sub>44</sub>H<sub>85</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>  
M = 828.33 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'amine **62** (0,24 g, 0,50 mmol), et de DIPEA (0,44 mL, 2,5 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (95 mg, 0,55 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit, puis est évaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 227 mg d'huile claire (55%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, J = 6.0 Hz, H-12'), 1.25 (m, 40H, H-4, H-5 et H-3'-H-11'), 1.32 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.34 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.44 (m, 4H, H-2'), 1.68 (m, 2H, H-3), 3.21 (m, 4H, H-6 et H-1'), 3.47 (m, 2H, H-1') 3.70 (m, 4H, H-8 et H-12), 4.05 (m, 4H, H-10 et H-14), 4.29 (m, 4H, H-9, H-13), 5.59 (m, 1H, H-2), (m, 2H, NH), 7.86 (m, 2H, NH)

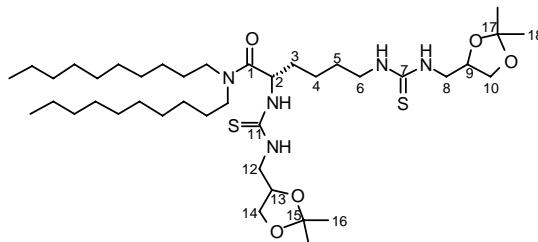
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.13 (C-12'), 22.73 (C-11', C-4), 25.27 et 26.87 (C-16 et C-18), 27.71 (C-3'), 28.71 (C-5), 29.07 (C-2'), 29.68 (C-4'-C-9'), 31.98 (C-10'), 33.68 (C-3), 44.58 (C-6), 46.76 (C-1', C-8, C-12), 48.63 (C-1'), 53.77 (C-2), 66.63 (C-10, C-14), 75.01 (C-9 et C-13), 109.62 (C-15 et C-17), 172.76 (C-1), 183.23 (C-7 et C-11)

CLHP : 14.87 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech, λ<sub>max</sub> = 223 nm et 242 nm, m/z = 850 (M+Na)<sup>+</sup>, 828 (M-H)<sup>-</sup>, 100%

Analyse élémentaire :	Calculé	C = 63.80 ; H = 10.34 ; N = 8.45 ; S = 7.74
	Trouvé	C = 63.94 ; H = 10.51 ; N = 7.80 ; S = 7.46

➤ (S)-N,N-didécyl-2,6-bis[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-méthyl]-thiouréido-pentanamide (**65**)

C<sub>40</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>  
M = 772.22 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'amine **63** (0,21 g, 0,5 mmol), et de DIPEA (0,87 mL, 5,0 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de 4-l'isothiocyanate **26** (0,22 g, 1,3 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit, puis évaporé à

sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice (gradient de 100% d'heptane à 100% AcOEt puis à 100% d'acétone), pour obtenir 0,32 g d'huile incolore (83%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.86 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-10'), 1.24 (m, 32H, H-4, H-5 et H-3'-H-9'), 1.31 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.33 (s, 6H, H-16 et H-18), 1.43 (m, 4H, H-2'), 1.66 (m, 2H, H-3), 3.20 (m, 4H, H-6 et H-1'), 3.45 (m, 2H, H-1') 3.68 (m, 4H, H-8 et H-12), 4.01 (m, 4H, H-10 et H-14), 4.27 (m, 4H, H-9, H-13), 5.55 (m, 1H, H-2), 6.85 (m, 2H, NH), 7.85 (m, 2H, NH)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 13.98 (C-10'), 22.72 (C-9'), 23.40 (C-4), 25.30 et 27.05 (C-16 et C-18), 27.71 (C-3'), 28.76 (C-5), 29.38 (C-2'), 29.66 (C-4'-C-7'), 31.95 (C-8'), 33.70 (C-3), 44.58 (C-6), 46.78 (C-8 et C-12), 46.78 et 48.70 (C-1'), 53.77 (C-2), 68.67 (C-10 et C-14), 75.05 (C-9 et C-13), 109.50 (C-15 et C-17), 172.91 (C-1), 183.26 (C-7 et C-11)

**CLHP** : 13.51 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 211$  et 241 nm,  $m/z = 794$  (M+Na) $^+$ , 770 (M-H) $^-$ , 808 (M+Cl) $^-$ , 99%

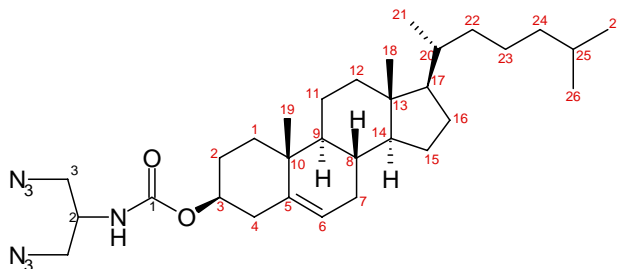
**Analyse élémentaire :**

Calculé	C = 62.22 ; H = 10.05 ; N = 9.07 ; S = 6.30
Trouvé	C = 62.17 ; H = 10.17 ; N = 8.94 ; S = 7.07

### ➤ (2-Azido-1-azidométhyl-éthyl)-carbamate de cholestéryle (**66**)

$\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_2$

$M = 553.80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Le cholestérylchloroformate (1,43 g, 3,2 mmol) fraîchement recristallisé est additionné à une solution d'amine **17** (0,3 g, 2,1 mmol) et de triéthylamine (0,44 mL, 3,2 mmol) dans 50 mL de THF anhydre. Le mélange est agité à t.a. pendant 19 heures avant évaporation à sec. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 9:1) pour obtenir 0,84 g de solide clair (71%).

**PF** = 119°C

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.67 (s, 3H, H-18), 0.86 (d, 6H,  $J = 6.0$  Hz, H-26, H-27), 0.91 (d, 3H,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 1.01 (s, 3H, H-19), 1.10-1.58 et 1.77-2.02 (m, 25H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-22, H-23, H-24, H-25), 2.30 (m, 2H, H-4), 3.37 (dd, 2H,  $J_1 = 5.7$  Hz,  $J_2 = 12.0$  Hz, H-3), 3.54 (dd, 2H,  $J_1 = 4.0$  Hz,  $J_2 = 12.0$  Hz, H-3), 3.90 (m, 1H, H-2), 4.50 (m, 1H, H-3), 4.98 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH), 5.37 (m, 1H, H-6)

$^{13}\text{C RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 11.93 (C-18), 18.80 (C-21), 19.38 (C-19), 21.14 (C-11), 22.64 et 22.88 (C-26, C-27), 23.94 (C-23), 24.37 (C-15), 28.20 (C-2, C-16, C-25), 31.97 (C-7, C-8), 35.88 (C-20), 36.29 (C-22), 36.64 (C-10), 37.04 (C-1), 38.52 (C-4), 39.61 (C-24), 39.84 (C-12), 42.41 (C-13), 49.84 (C-2), 50.11 (C-9), 51.79 (C-3), 56.26 (C-17), 56.78 (C-14), 75.21 (C-3), 122.79 (C-6), 139.65 (C-5), 155.34 (C-1)

**CLHP** : 15.00 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 197$  nm,  $m/z = 589$  (M+Cl) $^-$ , 599 (M+HCOO) $^-$ , 99%

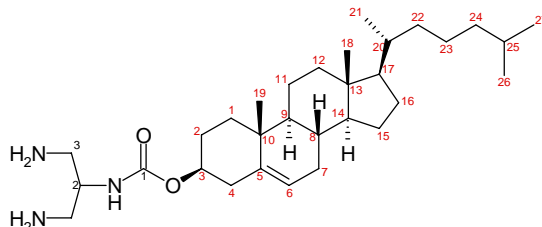
**Analyse élémentaire :**

Calculé	C = 67.23 ; H = 9.28 ; N = 17.70
---------	----------------------------------

Trouvé C = 67.51 ; H = 9.18 ; N = 17.56

➤ (2-Amino-1-aminométhyl-éthyl)-carbamate de cholestéryle (**67**)

C<sub>31</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
M = 499.83 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'azide **66** (0,4 g, 0,72 mmol) et de palladium sur charbon (50 mg) dans 15 mL de THF non anhydre est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité à t.a. pendant 15 heures. Le milieu est filtré sur célite et concentré pour obtenir 0,32 g de solide blanc (88%).

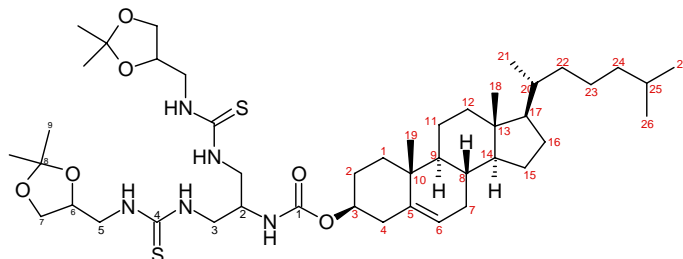
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.67 (s, 3H, H-18), 0.86 (d, 6H, J = 6.0 Hz, H-26, H-27), 0.91 (d, 3H, J = 6.0 Hz, H-21), 1.01 (s, 3H, H-19), 1.07-1.58 et 1.82-2.02 (m, 25H, H-1, H-2, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-22, H-23, H-24, H-25), 2.30 (m, 2H, H-4), 2.80 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 5.4 Hz, J<sub>2</sub> = 13.2 Hz, H-2'), 3.17 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 2.5 Hz, J<sub>2</sub> = 13.2 Hz, H-2'), 3.45 (m, 1H, H-1'), 4.50 (m, 1H, H-3), 5.26 (m, 1H, NH), 5.36 (m, 1H, H-6)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 11.97 (C-19), 18.83 (C-21), 19.45 (C-19), 21.16 (C-11), 22.67 et 22.88 (C-26, C-27), 23.93 (C-23), 24.38 (C-15), 28.31 (C-2, C-16, C-25), 31.99 (C-7, C-8), 35.89 (C-20), 36.28 (C-22), 36.65 (C-10), 37.12 (C-1), 38.71 (C-4), 39.63 (C-24), 39.85 (C-12), 42.41 (C-13), 45.14 (C-3), 45.83 (C-2), 50.13 (C-9), 56.26 (C-17), 56.80 (C-14), 74.49 (C-3), 122.63 (C-6), 139.65 (C-5), 155.34 (C-1)

Analyse élémentaire :      Calculé      C = 74.30 ; H = 11.05 ; N = 8.37  
   Trouvé      C = 74.73 ; H = 11.33 ; N = 7.04

➤ {2-[3-(2,2-Diméthyl-[1,3]-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]-dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthyl}-carbamate de cholestéryle (**68**)

C<sub>45</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>  
M = 848.27 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'amine **69** (0,10 g, 0,20 mmol) et de DIPEA (0,35 mL, 2,0 mmol) dans 2 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (87 mg, 0,50 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit à t.a., puis évaporé à sec. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 87 mg d'huile claire (51%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.67 (s, 3H, H-18), 0.86 (d, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-26, H-27), 0.91 (d, 3H,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 1.01-1.55 et 1.82-1.98 (m, 25H, H-1, H-2, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-22, H-23, H-24, H-25), 1.34 (s, 6H, H-9), 1.44 (s, 6H, H-9), 2.32 (m, 2H, H-4), 3.46-3.80 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 4.06 (t, 4H,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 4.32 (m, 2H, H-6), 4.45 (m, 1H, H-2, H-3), 5.35 (m, 1H, H-6), 6.59 (m, 1H, NH), 7.28 (m, 4H, NH)

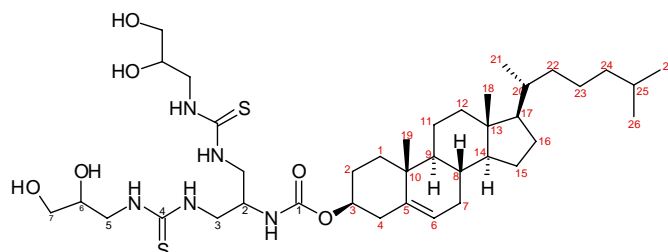
$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 11.93 (C-18), 18.81 (C-21), 19.39 (C-18), 21.14 (C-11), 22.62 et 22.81 (C-26, C-27), 23.93 (C-23), 24.36 (C-15), 25.32 et 26.90 (C-9), 28.26 (C-2, C-16, C-25), 31.99 (C-7, C-8), 35.86 (C-20), 36.29 (C-22), 36.68 (C-10), 37.08 (C-1), 38.58 (C-4), 39.61 (C-24), 39.85 (C-12), 42.42 (C-13), 45.13 (C-3), 45.83 (C-5), 50.17 (C-9), 53.07 (C-2), 56.20 (C-17), 56.82 (C-14), 66.77 (C-7), 74.52 (C-6), 75.22 (C-3), 109.83 (C-8), 122.70 (C-6), 139.89 (C-5), 155.34 (C-1), 183.51 (C-4)

CLHP : 14.25 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 246$  nm,  $m/z = 848$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 895 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ )<sup>-</sup>, 97%

Analyse élémentaire :      Calculé      C = 63.72 ; H = 9.15 ; N = 8.26 ; S = 7.56  
    Trouvé      C = 63.36 ; H = 9.23 ; N = 7.52 ; S = 7.61

➤ {2-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréido]-1-[3-(2,3-dihydroxy-propyl)-thiouréidométhyl]-éthyl}-carbamate de cholestéryle (**69**)

$\text{C}_{39}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$   
 $M = 768.14$  g.mol<sup>-1</sup>



Une solution de thiourée (**68**) (0,11 g, 0,13 mmol) dans 1,3 mL de THF est traitée par 1,3 mL d'acide chlorhydrique 1N. La réaction est suivie par HPLC analytique, et arrêtée après 3 heures et demie d'hydrolyse. Après évaporation à froid, le milieu est lyophilisé pour donner 110 mg de solide clair (quantitatif).

PF = 110°C

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.66-2.21 (massif, 45H, H-1, H-2, H-4, H-7-H-27), 3.52 (m, H-3, H-5), 3.87 (H-2, H-7), 4.41 (H-6, H-3), 5.35 (H-6)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 12.09 (C-18), 18.93 (C-21), 19.58 (C-19, C-11), 22.70 et 22.93 (C-26), 24.23 (C-23, C-15), 28.15 (C-2, C-16, C-25), 32.01 (C-7, C-8), 36.15 (C-20), 36.42 (C-22), 36.75 (C-10), 37.10 (C-1), 38.46 (C-4), 39.69 (C-24, C-12), 42.52 (C-13), 47.01 (C-3), 49.63 (C-5), 50.20 (C-9), 50.46 (C-2), 56.54 (C-17), 56.76 (C-14), 63.91 (C-7), 70.96 (C-6), 75.82 (C-3), 122.70 (C-6), 139.90 (C-5), 157.01 (C-1), 183.04 (C-4)

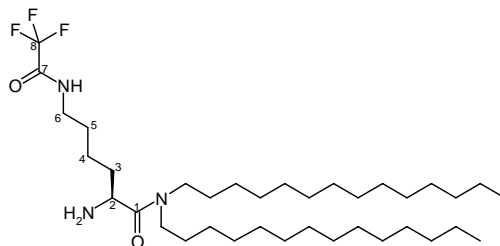
CLHP : 12.12 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 241$  nm,  $m/z = 768$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 814 ( $\text{M}+\text{Cl}$ )<sup>-</sup>, 97%

Analyse élémentaire :      Calculé      C = 60.98 ; H = 9.05 ; N = 9.12 ; S = 8.35  
    Trouvé      C = 58.25 ; H = 8.90 ; N = 8.30 ; S = 7.72

HR-ESMS : Calculé ( $\text{C}_{39}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_6\text{NaS}_2$ )  $m/z = 790.4587$   
    Trouvé       $m/z = 790.4572$

➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-2-amino-6-(2,2,2-trifluoro-acétylamino)-hexanoïque (70)**

$C_{36}H_{70}F_3N_3O_2$   
 $M = 633.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



L'acide 2-*tert*-butoxycarbonylamino-6-(2,2,2-trifluoro-acétylamino)-hexanoïque est synthétisé selon le protocole décrit dans la littérature<sup>199</sup>. Puis l'isobutylchloroformate (0,14 mL, 1,05 mmol) est additionné à -40°C sur un mélange de cet acide (0,34 g, 1,0 mmol) et de N-méthylmorpholine (0,12 mL, 1,05 mmol) dans 10 mL de dichlorométhane anhydre. La température est maintenue pendant une heure avant l'ajout d'une solution de ditétradécylamine **2** (0,41 g, 1,0 mmol) et de N-méthylmorpholine (0,12 mL, 1,05 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. Le milieu est agité pendant 24 heures à t.a. puis lavé par une solution aqueuse de HCl 0,5N, séché sur MgSO<sub>4</sub> et concentré. Le brut est purifié sur colonne de silice (éluant heptane/AcOEt 9:1) puis recristallisé dans l'oxyde d'isopropyle, pour obtenir un solide clair (220 mg, 35%, F=78°C). Ce dernier est traité par une solution de 5 mL d'HCl 6N dans l'isopropanol et agité pendant 6 heures d'être concentré. Le produit brut est recristallisé dans l'éther éthylique pour obtenir 190 mg un solide clair (30%).

**PF** = 79°C

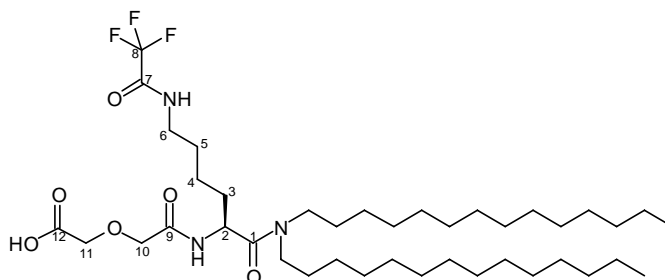
**<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , H-14'), 1.25 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.54 (m, 2H, H-2'), 1.61 (m, 2H, H-5), 1.89 (m, 2H, H-3), 3.01 (m, 2H, H-6), 3.12 (m, 2H, H'1), 3.39 (m, 2H, H-1'), 3.55 (m, 1H, H-2), 4.32 (m, 2H, NH).

**<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) 14.45 (C-14'), 21.20 (C-4), 22.70 (C-13'), 27.01 (C-3'), 28.71 (C-2'), 29.68 (C-5, C-4'-C-11'), 31.97 (C-12', C-3), 39.50 (C-6), 46.51 et 48.01 (C-1'), 56.70 (C-2), 72.12 (C-8), 168.23 (C-7), 171.03 (C-1)

**CLHP** : 11.71 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 197 \text{ nm}$ ,  $m/z = 635 \text{ (M+H)}^+$ , 633 (M-H)<sup>-</sup>, 100%

➤ **Acide (S)-{[1-ditétradécylcarbamoyl-5-(2,2,2-trifluoroacétylamino)-pentylcarbamoyl]-méthoxy}-acétique (71)**

$C_{40}H_{74}F_3N_3O_6$   
 $M = 750,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Une solution d'amine **70** (0,32 g, 0,50 mmol), d'anhydride diglycolique préalablement déshydraté (0,29 g, 2,5 mmol) et de DMAP (31mg, 0,25 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane anhydre est agitée à t.a. pendant 18 heures. Le milieu réactionnel est dilué par 50 mL de dichlorométhane, lavé trois fois par HCl 1N, trois fois par une solution saturée de NaCl, et séché (MgSO<sub>4</sub>). Après évaporation du solvant, on obtient 0,35 g d'une huile jaune (93%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz, H-14'), 1.25 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.54 (m, 4H, H-2', H-5), 1.75 (m, 2H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-6), 3.34 (m, 5H, H'1, H-6), 4.08 (m, 2H, H-10), 4.18 (m, 2H, H-11), 4.92 (m, 1H, H-2), 7.34 (m, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH).

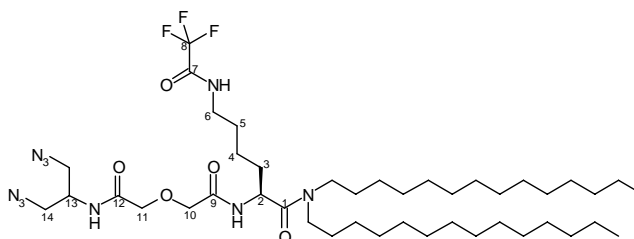
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.21 (C-14'), 22.51 (C-4), 22.81 (C-13'), 27.07 (C-3'), 29.46 (C-2'), 29.68 (C-5, C-4'-C-11'), 32.07 (C-12', C-3), 39.53 (C-6), 46.96 (C-1'), 48.48 (C-1', C-2), 68.84 (C-11), 70.87 (C-10), 169.60 (C-9), 169.70 (C-12), 171.93 (C-1), 172.07 (C-7).

LC-MS: 28,49 min, Gradient S2, colonne C8, Alltech, λ<sub>max</sub> = 195 nm, *m/z* = 750 (M+H)<sup>+</sup>, 772 (M+Na)<sup>+</sup>, 89%

➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-2-{2[(2-azido-1-azidométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-acétylamino}-6-(2,2,2-trifluoro-acétylamino)-hexanoïque (**72**)**

C<sub>43</sub>H<sub>79</sub>F<sub>3</sub>N<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

M = 873.17 g.mol<sup>-1</sup>



Un mélange d'acide **73** (31 mg, 0,04 mmol), de NHS (5 mg, 0,04 mmol) et de DCC (21 mg, 0,1 mmol) dans 2 mL de THF anhydre est agité une heure à t.a. avant l'addition de l'amine **17** (5 mg, 0,04 mmol) et l'agitation est maintenue pendant la nuit. Le milieu réactionnel est alors dilué dans l'eau et l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour obtenir 16 mg d'huile (46%)

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.84 (t, 6H, *J* = 6.5 Hz, H-14'), 1.22 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.55 (m, 4H, H-2', H-5), 1.69 (m, 2H, H-3), 3.03 (m, 1H, H-6), 3.15 (m, 3H, H-6, H-1'), 3.34 (m, 2H, H'-1), 3.52 (dd, 2H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 17.1 Hz, H-14), 3.60 (dd, 2H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 17.1 Hz, H-14), 3.97 (s, 4H, H-10, H-11), 4.24 (m, 1H, H-13), 4.83 (m, 1H, H-2), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.10 (C-14'), 22.22 (C-4), 22.71 (C-13'), 27.03 (C-3'), 29.68 (C-5, C-2', C-4'-C-11'), 31.94 (C-12'), 32.94 (C-3), 39.49 (C-6), 46.25 (C-1'), 47.82 (C-2), 48.31 (C-1'), 51.40 (C-14), 55.79 (C-13), 71.01 (C-10, C-11), 168.46 (C-9), 168.79 (C-10), 170.86 (C-1), 172.02 (C-7).

**Analyse élémentaire :**

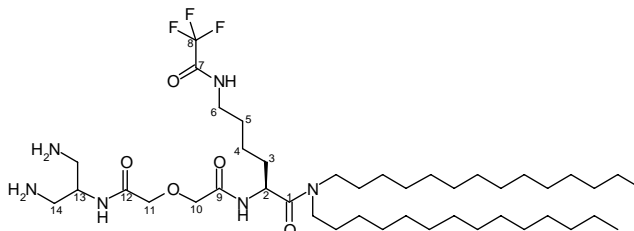
Calculé	C = 59.15 ; H = 9.12 ; N = 16.04
Trouvé	C = 60.89 ; H = 9.42 ; N = 14.77

**LC-MS:** 21,67 min, Gradient S2, colonne C8, Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 195 \text{ nm}$ ,  $m/z = 873 \text{ (M+H)}^+$ , 895  $\text{(M+Na)}^+$

➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-2-{2[(2-Amino-1-aminométhyl-éthylcarbamoyl)-méthoxy]-acétylamino}-6-(2,2,2-trifluoro-acétylamino)-hexanoïque (**73**)**

$\text{C}_{43}\text{H}_{83}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_5$

$M = 821.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'azide **74** (0,18 g, 0,20 mmol) et de palladium sur charbon activé (50 mg) dans 6 mL d'éthanol absolu est placé sous atmosphère d'hydrogène, puis agité pendant une nuit à t.a. Le mélange réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré. Le produit brut est purifié sur cartouche en phase inverse C8 (éluant : H<sub>2</sub>O puis CH<sub>3</sub>CN puis MeOH) pour obtenir une huile claire (71 mg, 43%).

**<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 0.86 (t, 6H,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , H-14'), 1.24 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.58 (m, 4H, H-2', H-5), 1.67 (m, 2H, H-3), 2.33 (m, 4H, NH), 3.06 (m, 1H, H-6), 3.21 (m, 4H, H-1', H-14), 3.34 (m, 5H, H'1, H-6, H-14), 3.97 (s, 4H, H-10, H-11), 4.28 (m, 1H, H-13), 4.88 (m, 1H, H-2), 7.26 (d, 1H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , NH), 7.54 (d, 1H,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ , NH).

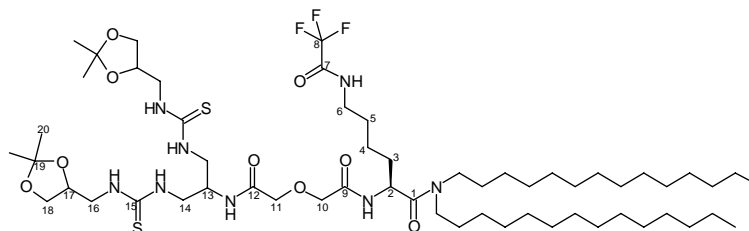
**<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 14.18 (C-14'), 22.41 (C-4), 22.77 (C-13'), 27.10 (C-3'), 29.68 (C-5, C-2', C-4'-C-11'), 32.02 (C-12'), 32.92 (C-3), 39.58 (C-6), 42.75 (C-14), 46.41 (C-1'), 47.27 (C-2), 48.02 (C-1'), 48.19 (C-13), 70.95 (C-10, C-11), 168.58 (C-9), 168.93 (C-10), 170.86 (C-1), 171.17 (C-7).

**LC-MS:** 9,60 min, Gradient S1, colonne C8, Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 195 \text{ nm}$ ,  $m/z = 821 \text{ (M+H)}^+$ , 843  $\text{(M+Na)}^+$ , 821 (M-H)<sup>-</sup>, 867  $\text{(M+HCOO)}^-$

➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-2-[2-({2-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl)-méthoxy)-acétylamino]-6-(2,2,2-trifluoro-acétylamino)-hexanoïque (**74**)**

$\text{C}_{57}\text{H}_{105}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_2$

$M = 1167.64 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Un mélange d'amine **73** (71 mg, 0,09 mmol) et de DIPEA (75  $\mu\text{L}$ , 0,45 mmol) dans 1 mL de dichlorométhane anhydre est agité dix minutes avant l'ajout, sous atmosphère d'azote, de l'isothiocyanate **26** (16 mg, 0,1 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit puis évaporé à

sec. Le produit brut est purifié sur cartouche en phase inverse C8 (gradient de H<sub>2</sub>O à CH<sub>3</sub>CN puis MeOH), pour obtenir 47 mg d'huile (45%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, H-14'), 1.25 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.33 (s, 6H, H-20), 1.41 (s, 6H, H-20), 1.60 (m, 4H, H-2', H-5), 1.68 (m, 2H, H-3), 3.06 (m, 1H, H-6), 3.21 (m, 2H, H-1'), 3.36 (m, 3H, H'1, H-6), 3.70 (m, 8H, H-14, H-16), 4.03 (m, 8H, H-10, H-11, H-18), 4.29 (m, 3H, H-13, H-17), 4.89 (m, 1H, H-2), 7.13 (m, 3H, NH), 7.26 (m, 3H, NH), 7.54 (m, 1H, NH).

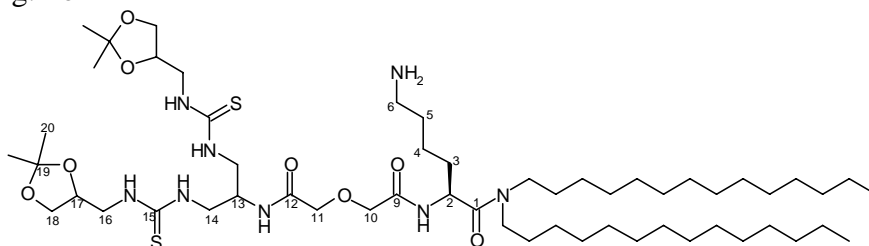
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.19 (C-14'), 22.45 (C-4), 22.78 (C-13'), 25.39 (C-20), 27.03 (C-20, C-3'), 29.68 (C-5, C-2', C-4'-C-11'), 32.03 (C-12'), 32.44 (C-3), 39.52 (C-6), 45.50 (C-14), 46.44 (C-1'), 46.83 (C-16), 48.02 (C-1'), 48.38 (C-2), 50.64 (C-13), 66.86 (C-18), 71.02 (C-10, C-11), 74.56 (C-17), 109.77 (C-19), 168.51 (C-9), 169.49 (C-12), 171.11 (C-1), 171.66 (C-7), 183.39 (C-15).

LC-MS: 15.97 min, Gradient S1, colonne C8, Alltech, λ<sub>max</sub> = 195 nm et 245 nm, *m/z* = 1168 (M+H)<sup>+</sup>, 100%

➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-6-amino-2-[2-({2-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl)-méthoxy)-acétylamino]-hexanoïque (75)**

C<sub>55</sub>H<sub>106</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

M = 1071.73 g.mol<sup>-1</sup>



Une solution de thiourée **74** (11mg, 0,011 mmol) dans un mélange de 0,64 mL de MeOH et 40 μL d'eau, est traitée par le carbonate de potassium (6 mg, 0,05 mmol). Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 4 heures puis concentré. Le résidu est repris dans l'éthanol puis filtré et concentré pour obtenir 19 mg d'huile (quantitatif) engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.87 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, H-14'), 1.25 (m, 46H, H-3'-H-13', H-4), 1.33 (s, 6H, H-20), 1.43 (s, 6H, H-20), 1.60 (m, 4H, H-2', H-5), 1.68 (m, 2H, H-3), 3.21 (m, 2H, H-1'), 3.36 (m, 2H, H'1), 3.48 (m, 2H, H-6), 3.70 (m, 8H, H-14, H-16), 4.01 (m, 8H, H-10, H-11, H-18), 4.30 (m, 3H, H-13, H-17), 4.89 (m, 1H, H-2), 7.08 (m, 3H, NH), 7.21 (m, 3H, NH), 7.35 (m, 2H, NH), 7.43 (m, 1H, NH).

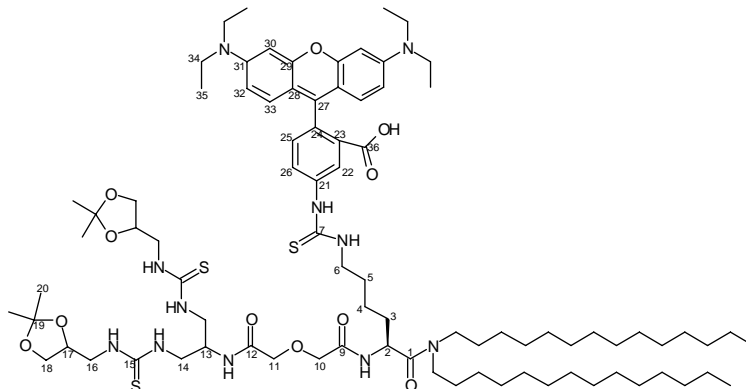
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 14.25 (C-14'), 22.38 (C-4), 22.83 (C-13'), 25.45 (C-20), 27.07 (C-20, C-3'), 29.52 (C-2'), 29.68 (C-5, C-4'-C-11'), 32.08 (C-12'), 33.08 (C-3), 39.52 (C-6), 45.50 (C-14), 46.38 (C-1'), 46.84 (C-16), 48.24 (C-1'), 48.38 (C-2), 49.37 (C-13), 66.95 (C-18), 70.99 (C-10, C-11), 74.67 (C-17), 109.77 (C-19), 168.51 (C-9), 169.49 (C-12), 171.11 (C-1), 171.66 (C-7), 183.39 (C-15).



➤ **Ditétradécylamide de l'acide (S)-2-[2-({2-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréido]-1-[3-(2,2-diméthyl-[1,3]dioxolan-4-ylméthyl)-thiouréidométhyl]-éthylcarbamoyl)-méthoxy)-acétylamino]-6-(3-rhodaminyl-thiouréido)-hexanoïque (**76**)**

$C_{84}H_{137}N_{11}O_{11}S_3$

$M = 1573.29 \text{ g.mol}^{-1}$



La rhodamine-B-isothiocyanate (6 mg, 0,011 mmol) est additionnée à une solution d'amine **75** (11mg, 0,01 mmol) et de triéthylamine (3  $\mu\text{L}$ , 0,02 mmol) dans 1 mL de dichlorométhane anhydre. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 jours puis concentré. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice, pour obtenir finalement 13 mg d'huile rouge (75%).

$^1\text{H RMN (CDCl}_3)$   $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 6H,  $J = 6.6$  Hz, H-14'), 1.15-1.68 (m, 76H, H-2'-H-13', H-3-H-5, H-20, H-35), 3.10 (m, 2H, H-1'), 3.26 (m, 2H, H'1), 3.49 (m, 6H, H-6, H-14), 3.56 (m, 12H, H-16, H-34), 4.00 (m, 8H, H-10, H-11, H-18), 4.22 (m, 3H, H-13, H-17), 4.86 6.30-6.90 (m, 6H, H-30-H-33), 7.54 (m, 1H, H-25), 7.72 (m, 2H, H-22, H-26).

**LC-MS:** 12.20 min, Gradient S1, colonne C8 Alltech,  $\lambda_{\text{max}} = 195 \text{ nm}, 245\text{nm}, 556 \text{ nm}$ ,  $m/z = 786 ((M+2H)/2)^+$ , 86%



## VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Avery O. T., McLeod C. M., McCarthy M. (1944) Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, 79, 137-158.
2. Watson J. D., Crick F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171, 737-738.
3. Lederberg J. (1963) Molecular biology, eugenics and euphenics, *Nature*, 198, 428-429.
4. Mulligan R. C. (1993) The basic science of gene therapy, *Science*, 260, 926-932.
5. Ledley F. D. (1995) Nonviral gene therapy : the promise of genes as pharmaceuticals products, *Hum. Gene Ther.*, 6, 1129-1144.
6. Anderson W. F. (1992) Human gene therapy, *Science*, 256, 808-813.
7. Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., Topalian S. L. (1990) Gene transfer into humans- immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, *New Eng. J. Med.*, 323, 570-578.
8. Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., Edelstein R. M. (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 – and overview, *J. Gene Med.*, 6, 597-602.
10. Raper S. E., Chirmule N., Lee F. S., Wivel N. A., Bagg A., Gao G-P., Wilson J. M., Batshaw M. L. (2003) Fatal systemic inflammatory response in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral transfer, *Mol. Genet. Metab.*, 80, 148-158.
11. Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey-Abina S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J-L., Bouso P., Le Deist F., Fischer A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science*, 288, 669-672.
12. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Leblouch P., Lim A., Osborne C. S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J. I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L. E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T. H., Le Deist F., Fisher A., Cavazzana-Calvo M. (2003) LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients After Gene Therapy for SCID-X1, *Science*, 302, 415-419.
13. Kaiser J. (2005) Panel urges limits on X-SCID trials, *Science*, 307, 1544-1545.
14. Kaji E. H., Leiden J. M. (2001) Gene and Stem Cell Therapies, *JAMA*, 285, 545-560.
15. Somia N., Verma M. (2000) Gene therapy : trials and tribulations, *Nature Rev. Genetics*, 1, 91-99.
17. Anderson W. F. (1998) Des virus bricolés pour transférer des gènes, *La Recherche*, 315, 53-57.
18. Thomas A. E., Ehrhardt A., Kay M. A. (2003) Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy, *Nature Rev. Genetics*, 4, 346-358.
19. Barquerino J., Eixarch H., Perez-Melgosa M. (2004) Retroviral Vectors : New Applications for an Old Tool, *Gene Ther.*, 11, S3-S9.
20. Cone R.D., Mulligan R.C. (1984) High Efficiency Gene Transfer into Mammalian Cells : Generation of Helper-Free Recombinant Retrovirus with Broad Mammalian Host Range, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81, 6349-6353.
21. Uchida N., Sutton R. E., Frieria A. M., He D., Reitsma M. J., Chang W. C., Veres G., Scollay R., Weissman I. L. (1998) HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> human hematopoietic stem cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 11939-11944.
22. Goyenvallé A., Vulin A., Fougérousse F., Leturcq F., Kaplan J-C., Garcia L., Danos O. (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping, *Science*, 306, 1796-1799.

23. Athanasopoulos T., Graham I. R., Foster H., Dickson G. (2004) Recombinants adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), *Gene Ther.*, 11, S109-S121.
24. Bessis N., Garcia Cozar F. J., Boissier M-C. (2004) Immune responses to gene therapy vectors : influence on vector function and effector mechanisms, *Gene Ther.*, 11, S10-S17.
25. Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarthy T., Landers S., Maples P., Romel L., Randlev B., Reid T., Kaye S., Kirn D. (2000) Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer : a phase II trial, *Cancer Res.*, 60, 6359-6366.
26. Kurreck J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.*, 270, 8, 1628-1644.
27. Ryther R. C., Flynt A. S., Phillips III J. A., Patton J. G. (2005) siRNA therapeutics : big potential from small RNAs, *Gene Ther.*, 12, 5-11.
28. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschli T. (2001) Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411, 494-498.
29. Middaugh C. R., Evans R. K., Montgomery D. L., Casimiro D. R. (1998) Analysis of plasmid DNA from a pharmaceutical perspective, *J. Pharm. Sci.*, 87, 2, 130-146.
30. Niidome T., Huang L. (2002) Gene therapy progress and prospects : non viral vectors, *Gene Ther.*, 9, 1647-1652.
31. Soubrier F., Cameron B., Somarriba S., Dubertret C., Jaslin G., Jung G., Le Caer C., Dang D., Mouvault J-M., Scherman D., Mayaux J. F., Crouzet J. (1999) pCor : a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy, *Gene Ther.*, 6, 1482-1488.
32. Herweijer H., Wolff J. A. (2003) Progress and prospects : naked DNA gene transfer and therapy, *Gene Ther.*, 10, 453-458.
33. Perez N., Bigey P., Scherman D., Danos O., Piechaczyk M., Pelegrin M. (2004) Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation, *Gen. Vacc. & Ther.*, 2, 1, 2-6.
34. Source : Niidome T., Huang L. (2002) Gene therapy progress and prospects : nonviral vectors, *Gene Ther.*, 9, 1647-1652.
35. Ohana P., Gofrit O., Ayesh S., Al-Sharef W., Mizrahi A., Birman T., Schneider T., Matouk I., de Groot N., Tavdy E., Sidi A. A., Hochberg A. (2004) Regulatory sequences of the H19 gene in DNA-based therapy of bladder cancer, *Gene Ther. & Mol. Biol.*, 8, 181-192.
36. Lui V. W. Y., Falo L. D., Huang L. (2001) Systemic production of IL-12 naked DNA mediated gene transfer : toxicity and attenuation of transgene expression, *J. Gene Med.*, 3, 384-393.
37. Liu F., Song Y. K., Liu D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther.*, 6, 1258-1266.
38. O'Brien J., Lummis S. C. R. (2004) Biolistic and diolistic transfection : using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells, *Methods*, 33, 121-125.
39. Sawamura D., Ina S., Itai K., Meng X., Kon A., Tamai K., Hanada K., Hashimoto I. (1999) In vivo gene introduction into keratinocytes using jet injection, *Gene Ther.*, 6, 1785-1787.
40. Walther W., Stein U., Fichtner I., Malcherek L., Lemm M., Schlag P. M. (2001) Non viral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet injection technology, *Gene Ther.*, 8, 173-180.
41. Potter H., Weir L., Leder P. (1984) Enhanced-dependent expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7161-7165.
42. Bloquel C., Fabre E., Bureau M. F., Scherman D. (2004) Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression : new methodological developments and applications, *J. Gene Med.*, 6, S11-S23.
43. Mir L. M., Bureau M. F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J-M., Delaere P., Branellec D., Schwartz B., Scherman D. (1999) High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4262-4267.
44. Aihara H., Miyazaki J-I. (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo, *Nature Biotechnology*, 16, 867-870.

45. André F., Mir L. M. (2004) DNA Electrotransfer : its principles and an updated review of its therapeutic applications, *Gene Ther.*, 11, S33-S42.
46. Dean D. A., Machado-Aranda D., Blair-Parks K., Yelandi A. V., Young J. L. (2003) Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung, *Gene Ther.*, 10, 1608-1615.
47. Pavselj N., Pr at V. (2005) DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high and one low-voltage pulse, *J. Controlled Release*, 106, 407-415.
48. Prud'homme G. (2005) DNA vaccination against tumors, *J. Gene Med.*, 7, 3-17.
49. Wells D. J. (2004) Gene therapy progress and prospects : Electroporation and other physical methods, *Gene Ther.*, 11, 1363-1369.
50. Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Aoki M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R. (2002) Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound : enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle, *Gene Ther.*, 9, 372-380.
51. Zeira E., Manevitch A., Khatchatourians A., Pappo O., Hyam E., Darash-Yahana M., Tavor E., Honigam A., Lewis A., Galun E. (2003) Femtosecond infrared laser – An efficient and safe *in vivo* gene delivery system for prolonged expression, *Molecular Therapy*, 8, 2, 342-350.
52. Scherer F., Anton M., Schilinger U., Henke J., Bergemann C., Kr ger A., G nsbacher B., Planck C. (2002) Magnetofection : enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.*, 9, 102-109.
53. Zuber G., Dauty E., Nothisen M., Belguise P., Behr J-P. (2001) Towards synthetic viruses, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 245-253.
54. Nabel G. J., Nabel E. G., Yang Z-Y., Fox B. A., Plautz G. E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D., Chang A. E. (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma : expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11307-11311.
55. Brooks H., Lebleu B., Vives E. (2005) Tat peptide-mediated cellular delivery : back to basics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 559-577.
56. Csaba N., Caamano P., Sanchez A., Dominguez F., Alonso M-J. (2005) PLGA :poloxamer and PLGA :poloxamine blend nanoparticles : new carriers for gene delivery, *Biomacromolecules*, 6, 271-278.
57. Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987) Lipofection : a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417.
58. Sen J., Chaudhuri A. (2005) Gene transfer efficacies of novel cationic amphiphiles with alanine,  $\beta$ -alanine, and serine headgroups : a structure-activity investigation, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 903-912.
59. Sen J., Chaudhuri A. (2004) Design, synthesis and transfection biology of novel non-cholesterol-based guanidinylated cationic lipids, *J. Med. Chem.*, 48, 3, 812-820.
60. Van Der Woude I., Wagenaar A., Meekel A. A., Ter Beest M. B., Ruiters M. H., Engberts J. B., Hoekstra D. (1997) Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic *in vitro* gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1160, 1165.
61. Kabanov A.V., Kabanov V.A. (1995) DNA Complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells, *Bioconjugate Chem.*, 6, 7-20.
62. Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D. (1998) Synthesis, activity and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer, *J. Med. Chem.*, 41, 224-235.
63. Massing U., Kley J. T., Gürtesch L., Fankhaenel S. (2000) A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids, *Chemistry and Physics of Lipids*, 105, 189-190.
64. Gao X., Huang L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 179, 1, 280-285.
65. Vigneron J.P., Oudrhiri N., Fauquet M., Vergely L., Bradley J-C., Basseville M., Lehn P., Lehn J-M. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids : efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9682-9686.

66. Radler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposomes complexes : DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, *Science*, 275, 5301, 810-814.
67. Felgner P. L., Barenholz Y., Behr J-P., Cheng S. H., Cullis P., Huang L., Jessee J. A., Seymour L., Szoka F., Thierry A. R., Wagner E., Wu G. (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene Ther.*, 8, 5, 511-512.
68. Rädler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C.R. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes : DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packaging regimes, *Science*, 275, 5301, 810-814.
69. Safinya C. R. (2001) Structure of lipid-DNA complexes : supramolecular assembly and gene delivery, *Curr. Op. Str. Biol.*, 11, 440-448.
70. Galanis E., Hersch E. M., Stopeck A. T., Gonzalez R., Burch P., Spier C., Akporiaye E. T., Rinehart J. J., Edmonson J., Sobol R. E., Forscher C., Sondak V. K., Lewis B. D., Unger E. C., O'Driscoll M., Selk L., Rubin J. (1999) Immunotherapy of advanced malignancy by direct gene transfer of an interleukin-2 DNA/DMRIE/DOPE lipid complex : phase I/II experience, *J. Clinic. Oncol.*, 17, 10, 3313-3323.
71. Zhdanov R. I., Podobed O. V., Vlassov V. V. (2002) Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes – for gene transfer and therapy, *Bioelectrochemistry*, 58, 53-64.
72. Zhou X. H., Klibanov A.L., Huang L. (1991) Lipophilic polylysine mediate efficient DNA transfection in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1065 (1), 8-14.
73. Zhou X. H., Huang L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine : characterisation and mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1189, 195-203.
74. Turumen M.P., Hiltunen M.O., Ruponen M., Virkamäki L., Szoka Jr F.C., Urtti A., Ylä-Herttuala (1999) Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes, *Gene Ther.*, 6, 6-11.
75. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., behr J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : Polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7297-7301.
76. Akinc A., Thomas M., Klibanov A. M., Langer R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.*, 7, 657-663.
77. Bragonzi A., Dina A., Calori G., Biffi A., Bordignon C., Assael B.M., Conese M. (2000) Biodistribution and transgene expression with non viral cationic vector/DNA complexes in the lungs, *Gene Ther.*, 7, 1753-1760.
78. Neu M., Fischer D., Kissel T. (2005) Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene Med.*, 7, 992-1009.
79. Godbey W.T., Mikos A.G. (2001) Recent progress in gene delivery using non viral gene transfer complexes, *J. Controlled Release*, 72, 115-125.
80. Köping Höggard M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Varum K.M., Artursson P. (2001) Chitosan as a non viral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*, *Gene Ther.*, 8, 1108-1121.
81. Köping Höggard M., Varum K.M., Issa M., Danielsen S., Christensen B.E., Stokke B.T., Artursson P. (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers, *Gene Ther.*, 11, 1441-1452.
82. Gonzalez H., Hwang S.J., Davis M. E. (1999) New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics, *Bioconjugate Chem*, 10, 1068-1074.
83. Shuai X., Merdan T., Unger F., Kissel T. (2005) Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility, *Bioconjugate Chem.*, 16, 322-329.
84. Pack D. W., Hoffman A. S., Pun S., Stayton P. S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery, *Nature Rev. Drug Discovery*, 4, 581-593.
85. Agarwal A., Unfer R., Mallapragada S. K. (2005) Novel cationic pentablock copolymers as non viral vectors for gene therapy, *J. Controlled Release*, 103, 245-258.

86. Sun S., Liu W., Cheng N., Zhang B., Cao Z., Yao K., Liang D., Zuo A., Guo G., Zhang J. (2005) A thermoresponsive chitosan-NIPAAm/Vinyl Laurate Copolymer Vector for gene Transfection, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 972-980.
87. Bally M. B., Harvie P. H., Wong F. M., Kong S., Wasan E. K., Reimer D. L. (1999) Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 38, 291-315.
88. Stolnik S., Illum L., Davis S.S. (1995) Long circulating microparticulate drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16, 195-214.
89. Yang J-P., Huang L. (1997) Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ration of cationic liposome to DNA, *Gene Ther.*, 4, 950-960.
90. Simberg D., Weisman S., Talmon Y., Faerman A., Tzipora S., Barenholz Y. (2003) The role of organ vascularisation and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection, *J. Biol. Chem.*, 278, 41, 39858-39865.
91. Labat-Moleur F., Steffan A-M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberlong F., Brambilla E., Behr J-P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines, *Gene Ther.*, 3, 1010-1017.
92. Ruponen M., Honkakoski P., Rönkkö S., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A (2003) Extracellular and intracellular barriers in nonviral gene delivery, *J. Controlled Release*, 93, 213-217.
93. Medina-Kauwe L. K., Xie J., Hamm-Alvarez S. (2005) Intracellular trafficking of non viral vectors, *Gene Ther.*, 11, 1-18.
94. Wu G.Y., Wu C.H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, 263, 14621-14624.
95. Hofland H. E., Masson C., Iginla S., Osetinsky I., Reddy J. A., Leamon C. P., Scherman D., Bessodes M., Wils P. (2002) Folate-targeted gene transfer *in vivo*, *Mol. Ther.*, 5, 6, 739-744.
96. Merdan T., Kopecek J., Kissel T. (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 715-758.
97. Labat-Moleur F., Steffan A-M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberlong F., Brambilla E., Behr J-P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines, *Gene Ther.*, 3, 1010-1017.
98. Lechardeur D., Verkman A. S., Lukacs G. L. (2005) Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 755-767.
99. Behr J.P. (1997) The proton sponge : a trick to enter cells the viruses did not exploit, *Chimia*, 51, 34-36.
101. Xu Y. Szoka F. C. Jr (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry*, 35, 5616-5623.
102. Zelphati O., Szoka F. C. Jr (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11493-11498.
104. Simoes S., Moreira J. N., Fonseca C., Düzgünes N., Pedrosa de Lima M. (2004) On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 947-965.
105. Lukacs G. L., haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N., Verkman A. S. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J. Biol. Chem.*, 275, 3, 1625-1629.
106. Dean D. A., Strong D. D., Zimmer W. E. (2005) Nuclear entry of nonviral vectors, *Gene Ther.*, 12, 881-890.
107. Brunner S., Sauer T., Carotta S., Cotten M., Saltik M., Wagner E. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus, *Gene Ther.*, 7, 401-407.
108. Escriou V., Carrière M., Scherman D., Wils P. (2003) NLS bioconjugates for targeting therapeutics genes to the nucleus, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 295-306.
110. Patil S. D., Rhodes D. G. (2000) Conformation of oligodeoxynucleotides associated with anionic liposomes, *Nucleic Acid Research*, 28, 21, 4125-4129.
111. Guo W., Lee R. J. (2000) Efficient gene delivery using anionic liposomes-complexes polyplexes (LPDII), *Bioscience Reports*, 20, 5, 419-432.

112. Mady M. M., Ghannam M. M., Khalil W. A., Repp R., Markus M., Rascher W., Müller R., Fahr A. (2004) Efficient gene delivery with serum into human cancer cells using targeted anionic liposomes, *J. Drug Targeting*, 12, 1, 11-18.
113. Patil S. D., Rhodes D. G., Burgess D. J. (2005) Biophysical characterization of anionic lipoplexes, *Biochem. Biophys. Acta*, 1711, 1-11.
114. Lorenzi G. L., Lee K-D. (2005) Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation, *J. Gene Med.*, 7, 1077-1085.
115. Gabizon A., Papahadjopoulos D. (1992) The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1103, 1, 94-100.
116. Escriou V., Ciolina C., Lacroix F., Byk G., Scherman D. Wils P. (1998) Cationic lipid-mediated gene transfer : effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1368, 2, 276-288.
117. Lee J. H., Lim Y-B, Choi J. S., Kim T., Kim H. J., Yoon J. K., Kim K., Park J. (2003) Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency, *Bioconjugate Chem.*, 14, 1214-1221.
118. Thompson B., Mignet N., Hofland H., Lamons D., Seguin J., Nicolazzi C., de la Figuera N., Kuen R. L., Meng X. Y., Scherman D., Bessodes M. (2005) Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery, *Bioconjugate Chem.*, 16, 608-614.
119. Bettinger T., Remy J-S., Erbacher P. (1999) Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes, *Bioconjugate Chem.*, 10, 558-561.
120. Simões S., Slepishkin V., Gaspar R., Pedroso de Lima M. C., Düzgünes N. (1998) Gene delivery by negatively charged ternary complexed of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusogenic peptides, *Gene Ther.*, 5, 955-964.
121. Papahadjopoulos D., Allen T. M., Bagizon A., Mayhew E., Matthey K., Huang S. K., Lee K-D., Woodle M. C., Lasic D. D., Redemann C., Martin F. J. (1991) Sterically stabilized liposomes : improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11460-11464.
122. Tam P., Monck M., Lee D., Ludkovski O., Leng E.C., Clow K., Stark H., Scherrer P., Graham R. W., Cullis P. R. (2000) Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy, *Gene Ther.*, 7, 1867-1874.
123. Bromberg L., Deshmukh S., Temchenko M., Iourtchenko L. Alakhov V., Alvarez-Lorenzo C., Barreiro-Iglesias R., Concheiro A., Hatton T. A. (2005) Polycationic block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) for cell transfection, *Bioconjugate Chem*, 16, 3, 626-633.
124. Harvie P., Wong F. M. P., Bally M. B. (2000) Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles, *J. Pharm. Sci.*, 89, 5, 652-663.
125. Song L. Y., Ahkong Q. F., Rong Q., Wang Z., Ansell S., Hope M. J., Mui B. (2002) Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1558, 1-13.
126. Shi F., Wasingu L., Nomoden A., Stuart M. C. A., Polushkin E., Engberts J. B., Hoekstra D. (2002) Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides ; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions, *Biochem. J.*, 366, 333-341.
127. Nicolazzi C., Mignet N., de la Figuera N., cadet M., Torero Ibad R., Seguin J., Scherman D., Bessodes M. (2003) Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmic circulation time, *J. Controlled Release*, 88, 429-443.
129. Faneca H., Simões S., Pedroso de Lima M. C. (2004) Association of albumin or protamine to lipoplexes : enhancement of transfection and resistance to serum, *J. Gene Med.*, 6, 681-692.
130. Blessing T., Remy J-S., Behr J-P. (1998) Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1427-1431.
131. Chittimalla C. Zammuto-Italiano L., Zuber G., Behr J-P. (2005) Monomolecular DNA nanoparticles for intravenous delivery of genes, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 32, 11436-11441.
132. Dauty E., Remy J-S., Zuber G., Behr J-P. (2002) Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor, *Bioconjugate Chem.*, 13, 831-839.



- 133.** Mannino R. J., Allebach E. S., Strohl W. A. (1979) Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles, *FEBS Lett.*, 101, 2, 229-232.
- 134.** Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells, *J. Biol. Chem.*, 255, 21, 10431-10435.
- 135.** Perrie Y., Gregoriadis G. (2000) Liposome-entrapped plasmid DNA : characterisation studies, *Biochem. Biophys. Acta*, 1475, 125-132.
- 136.** Bailey A., Sullivan S. M. (2000) Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium, *Biochim. Biophys. Acta*, 1468, 239-252.
- 137.** Pott T., Roux D. (2002) DNA intercalation in neutral multilamellar membranes, *FEBS Lett.*, 511, 150-154.
- 138.** Mignet N., Brun A., Degert C., Delord B., Roux D., Hélène C., Laversanne R., François J-C. (2000) The spherulites : a promising carrier for oligonucleotides delivery, *Nucleic Acid Res.*, 28, 16, 3134-3142.
- 139.** Freunf O., Mahy P., Amedee J., Roux D., Laversanne R. (2000) Encapsulation of DNA in new multilamellar vesicles prepared by shearing a lyotropic lamellar phase, *J. Microencapsulation*, 17, 2, 157-168.
- 140.** Roux D. Chenevier D. Pott T., Navailles L., Regev O., Mondain Monval O. (2004) Conception and realization of a non-viral and non-cationic DNA vector, *Curr. Med. Chem.*, 11, 2, 169-177.
- 141.** Moreau L., Barthélémy P., El Maataoui M., Grinstaff M. W. (2004) Supramolecular assemblies of nucleoside phosphocholine amphiphiles, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 7533-7539.
- 142.** Arignon J., Prat C. A., Grinstaff M. W., Barthélémy P. (2005) Nucleic acid complexing glycosyl nucleoside-based amphiphile, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 864-872.
- 143.** Aoyama Y., Kanamori T., Nakai T., Sasaki T., Horiuchi S., Shinsuke S., Niidome T. (2003) Artificial viruses and their application to gene delivery. Size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3455-3457.
- 144.** Soto J., Bessodes M., Pitard B., Mailhe P., Scherman P., Byk G. (2000) Non electrostatic complexes with DNA : towards novel synthetic gene delivery systems, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 10, 911-914.
- 145.** Fong S., Heath T., Fong P., Liggitt D., Debs R. J. (2004) Membrane-permeant, DNA-binding agents alter intracellular trafficking and increase the transfection efficiency of complexed plasmid DNA, *Mol. Ther.*, 10, 4, 706-718.
- 146.** Ziegler-Skylakakis K., Nill S., Pan J. F., Andrae U. (1998) S-Oxygenation of thiourea results in the formation of genotoxic products, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31, 362-373.
- 147.** Zhu B-Z., Antholine W. E., Frei B. (2002) Thiourea protects against copper-induced oxidative damage by formation of a redox-inactive thiourea-copper complex, *Free radical Biology & Medicine*, 32, 12, 1333-1338.
- 148.** Custelcean R., Gorbunova M. G., Bonnesen V. (2005) Steric control over hydrogen bonding in crystalline organic solids : a structural study of N,N-dialkylthioureas, *Chem. Eur. J.*, 11, 1459-1466.
- 149.** George M., Tan G., John V. T., Weiss R. G. (2005) Urea and thiourea derivatives as low molecular-mass organogelators, *Chem. Eur. J.*, 11, 3243-3254.
- 150.** Cucumano M., Di Pietro M-L., Giannetto A., Vainiglia P-A. (2005) The intercalation to DNA of bipyridyl complexes of platinum(II) with thioureas, *J. Inorg. Biochem.*, 99, 560-565.
- 151.** Challa H., Bruice T. C. (2001) Incorporation of positively charged deoxynucleic S-methylthiourea linkages into oligodeoxyribonucleotides, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 2423-2427.
- 152.** Bordwell F. G., Algrim D. J., Harrelson J. A. (1988) The relative ease of removing a proton, a hydrogen atom, or an electron from carboxamides versus thiocarboxamides, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5903-5904.
- 153.** Scheerder J., Engbersen J. F., Casnati A., Ungaro R., Reinhoudt D. N. (1995) Complexation of halide anions and tricarboxylate anions by neutral urea-derivatized p-tert-butylcalix[6]arenes, *J. Org. Chem.*, 60, 6448-6454.
- 154.** Kato R., Nishizawa S., Hayashita T., Teramae N. (2001) A thiourea-based chromoionophore for selective binding and sensing of acetate, *Tet. Lett.*, 42, 30, 5053-5056.

155. Gomez D. E., Fabbriizzi L., Licchelli M., Monzani E. (2005) Urea vs. Thiourea in anion recognition, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 1495-1500.
156. Beer P. D., Gale P. A. (2001) Anion recognition and sensing : the state of the art and future perspectives, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 486-516.
157. Benito J. M., Gomez-Marcia M., Jimenez Blanco J. L., Ortiz Mellet C., Garcia Fernandez J. M. (2001) Carbohydrate-based receptors with multiple thiourea binding sites. Multipoint hydrogen bond recognition of dicarboxylates and monosaccharides, *J. Org. Chem.*, 66, 1366-1372.
158. Wilcox C. S., Kim E-I., Romano D., Kuo L. H., Burt A. L., Curran D. P. (1995) Experimental and theoretical studies of substituent effects in hydrogen bond based molecular recognition of a zwitterion by substituted arylureas, *Tetrahedron*, 51, 2, 621-634.
159. Bühlmann P., Nishizawa S., Xiao K. P., Umezawa Y. (1997) Strong hydrogen bond-mediated complexation of H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> by neutral bis-thiourea hosts, *Tetrahedron*, 53, 5, 1647-1654.
160. Nishizawa S., Bühlmann P., Iwao M., Umezawa Y. (1995) Anion recognition by urea and thiourea groups : remarkably simple neutral receptors for dihydrogenphosphate, *Tet. Lett.*, 36, 36, 6483-6486.
161. Sasaki S-I., Mizuno M., Naemura K., Tobe Y. (1999) Synthesis and anion-selective complexation of cyclophane-based cyclic thioureas, *J. Org. Chem.*, 65, 2, 275-283.
162. Lee D. H., Lee K. H., Hong J-I. (2001) An azophenol-based chromogenic anion sensor, *Org. Lett.*, 3, 1, 5-8.
163. Jubian V., Dixon R. P., Hamilton A. D. (1992) Molecular recognition and catalysis. Acceleration of phosphodiester cleavage by simple hydrogen-bonding receptor, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1120-1121.
164. Girard C., Tranchant I., Gorteau V., Potey L., Herscovici J. (2004) Development of a DNA interaction test with small molecules still grafted on solid phase, *J. Comb. Chem.*, 6, 275-278.
165. Tranchant I., Mignet N., Crozat E., Leblond J., Girard C., Scherman D., Herscovici J. (2004) DNA complexing lipopolythiourea, *Bioconjugate Chem.*, 15, 1342-1348.
166. Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D. (1998) Synthesis, activity and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer, *J. Med. Chem.*, 41, 224-235.
167. Tranchant I. (2002) Conception et synthèse de vecteurs non cationiques pour le transfert de gènes, *Thèse de doctorat de l'université Paris VI*.
169. Herscovici J., Scherman D., Tranchant I., Mignet N., Girard C., Aventis Pharma S.A. (14/05/2001) Polythiourea lipid derivatives, *Patent* WO02092558, WO2002FR01626, FR20010006330, US20010297482P.
170. Marshall J., Nietupski J., Lee E., Siegel C., Rafter P., Rudginsky S., Chang C., Eastma, S., Harris D., Scheule R., Cheng S. (2000) Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung, *J. Drug. Target.*, 7, 453-469.
171. Sen J., Chaudhuri A. (2005) Gene transfer efficacies of novel cationic amphiphiles with alanine, β-alanine, and serine headgroups : a structure-activity investigation, *Bioconjugate Chem.*, 16, 4, 903-912.
172. Felgner J. H., Kumar R., sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. Y., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.*, 269, 4, 2550-2561.
173. Heyes J. A., Niculescu-Duvaz D., Cooper R. G., Springer C. J. (2002) Synthesis of novel cationic lipids : effect of structural modification on the efficiency of gene transfer, *J. Med. Chem.*, 45, 99-114.
174. Fichert T., Regelin A., Massing U. (2000) Synthesis and transfection properties of novel non-toxic monocationic lipids. Variations of lipid anchor, spacer and head group structure, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 787-791.
175. Remy J-S., Sirlin C., Vierling P., Behr J-P. (1994) gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules, *Bioconjugate Chem.*, 5, 647-654.
176. Majeti B. K., Karmali P. P., Reddy B. S., Chaudhuri A. (2005) In vitro gene transfer efficacies of N,N-dialkylpyrrolidinium chlorides : a structure-activity investigation, *J. Med. Chem.*, 48, 11, 3784-3795.

177. Narang A. S., Thoma L., Miller D. D., Mahato R. I. (2004) Cationic lipids with increased DNA binding affinity for non viral gene transfer in dividing and non dividing cells, *Bioconjugate Chem.*, 16, 1, 156-168.
178. Mahidar Y. V., Rajesh M., Madhavendra S. S. , Chaudhuri A. (2004) Distance of hydroxyl functionality from the quaternized center influence DNA binding and in vitro gene delivery of cationic lipids with hydroxyalkyl headgroups, *J. Med. Chem.*, 47, 23, 5712-5728.
179. Buchardt O., Ehrbar U., Larsen C., Moller J., Nielsen P. E., Thomsen T., Wätjen F., Hansen J. B. (1984) Designing photoaffinity labelling reagents for chromatin studies, *J. Org. Chem.*, 49, 4123-4127.
180. Herges R., Dikmans A., Jana U., Köhler F., Jones P. G., Dix I., Fricke T., König B. (2002) Design of a neutral macrocyclic ionophore : synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions, *Eur. J. Org. Chem.*, 17, 3004-3014.
181. Williams A., Ibrahim I. T. (1981) A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide EDC, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 7090-7095.
182. Herr R. J., Kuhler J. L., Meckler H., Opalka C. J. (2000) A convenient method for the preparation of primary and symmetrical N,N'-disubstituted thioureas, *Synthesis*, 11, 1569-1574.
183. Tommasino M. L., Casalta M., Breuzard J. A., Lemaire M. (2000) Asymmetric hydrogenation of enamides with catalysts containing chiral thiourea ligands, *Tetrahedron Asymmetry*, 11, 4835-4841.
184. Linton B. R., Carr A. C., Orner B. P., Hamilton A. D. (2000) A versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates, *J. Org. Chem.*, 65, 1566-1568.
185. Tournaire-Arellano C., Younes-El Hage S., Valès P., Caujolle R., Sanon A., Bories C., Loiseau P. (1998) Synthesis and biological evaluation of ureido and thioureido derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and related aminoalcohols as N-acetyl-β-D-hexosaminidase inhibitors, *Carbohydrate Research*, 314, 47-63.
186. Kneeland D., Ariga K., Lynch V., Huang C-Y., Anslyn E. (1993) Bis(alkylguanidinium) receptors for phosphodiesterases : effect of counterions, solvent mixtures, and cavity flexibility on complexation, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10042-10055.
187. Stephensen H., Zaragoza F. (1997) Resin-bound isothiocyanates and their synthetic equivalents as intermediates for the solid-phase synthesis of substituted thiophenes, *J. Org. Chem.*, 62, 6096-6097.
188. Park S., Hayes B. L., Marankan F., Mulhearn D. C., Wanna L., Mesecar A. D., Santarsiero B. D., Johnson M. E., Venton D. L. (2003) Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents, *J. Med. Chem.*, 46, 6, 936-953.
189. Lee J., Lee J., Kang M., Shin M., Kim J-M., Kang S-U., Lim J-O., Choi H-H., Suh Y-G., Park H-G., Oh U., Kim H-D., Park Y-H., Ha H-J., Kim Y-H., Wang Y., Tran R., Pearce L., Lundberg D., Blumberg P. (2003) N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues : novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor, *J. Med. Chem.*, 46, 3116-3126.
190. Le V-D., Wong C-H. (2000) Synthesis of 2-substituted polyhydroxytetrahydropyrimidines (N-hydroxy cyclic guanidino-sugars) : transition-state mimics of enzymatic glycosidic cleavage, *J. Org. Chem.*, 65, 2399-2409.
191. Roe, E. T., Scalan, J. T., Swern, D. (1949) Fatty acid amines. Preparation of amides of oleic and the dihydroxystearic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2215-2218.
192. Sommerdijk N. A., Hoeks T. H., Synak M., Feiters M. C., Nolte R. J., Zwanenborg B. (1997) Stereodependent fusion of vesicles : calcium binding of synthetic gemini phospholipids containing two phosphate groups, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 4338-4344.
193. Star A., Goldberg I., Lemcoff N. G., Fuchs B. (1999) New supramolecular hosts systems. The stereoisomeric diaminobutanediol and dioxadiazadecalin systems : synthesis, structure, stereoelectronics, and conformation – Theory vs. Experiment, *Eur. J. Org. Chem.*, 2033-2044.
194. White J. D., Bolton G. L.M., Dantanarayana A. P., Fox C. M., Hiner R. N., Jackson R. W., Sakuma K., Warrier U. S. (1995) Total synthesis of the antiparasitic agent avermectin B1a, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 7, 1908-1939.
195. Sharma S. K., Tandon M., Lown J. W. (2000) Synthesis of geometrically constrained unsymmetrical bis(polyamides) related to the antiviral dystamycin, *Eur. J. Org. Chem.*, 11, 2095-2103.

196. Harada T., Nakamura T., Kinusaga M., Oku A. (1999) Mechanism of chiral lewis acid mediated enantiotopic group-selective ring cleavage of cyclic acetals derived from meso-1,2-diols, *J. Org. Chem.*, 64, 7594-7600.
197. Kim D.-K., Kim G., Gam J., Cho Y.-B., Kim H.-T., Tai J.-H., Kim K. H., Hong W.-S., Park J.-G. (1994) Synthesis and antitumor activity of a series of [2-substituted-4,5-bis(aminomethyl)-1,3-dioxolane]platinum(II) complexes, *J. Med. Chem.*, 37, 1471-1485.
198. Sun M., Deng Y., Batyreva E., Sha W., Salomon R. (2002) Novel bioactive phospholipids : practical total synthesis of products from oxidation of arachidonic and linoleic esters of 2-Lysophosphatidylcholine, *J. Org. Chem.*, 67, 3575-3584.
199. Wender P. A., Jessop T. C., Pattabiraman K., Pelkey E. T., VanDeusen C. L. (2001) Efficient, Scalable synthesis of the novel Molecular transporter Octa-Arginine, *Org. Lett.*, 3, 21, 3229-3232.
200. Meunier S. J., Wu Q., Wang S.-N., Roy R. (1997) Synthesis of hyperbranched glycodendrimers incorporating  $\alpha$ -thiosialosides bases on a gallic acid core, *Can. J. Chem.*, 75, 1472-1482.
202. Benoist E., Loussouarn A., Remaud P., Chatal J.-F., Geston J.-F. (1998) Convenient and simplified approaches to N-monoprotected triaminopropane derivatives : key intermediates for bifunctional chelating agent synthesis, *Synthesis*, 1113-1118.
203. Sainlos M. Belmont P., Vigneron J.-P., Lehn P., Lehn J.-M. (2003) Aminoglycoside derived cationic lipids for gene transfection : Synthesis of kanamycin A derivatives, *Eur. J. Org. Chem.*, 2767-2774.
204. Schlesinger P. H., Ferdani R., Liu J., Pajewska J., Pajewski R., Saito M., Shabany H., Gokel G. W. (2002) SCMTR : A chloride selective, membrane-anchored peptide channel that exhibits voltage gating, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 9, 1848-1849.
205. Girard C., Tranchant I., Nioré P.-A., Herscovici J. (2000) A convenient method for the synthesis and one-pot reaction of acyl chlorides using a scavenging resin, *Synlett*, 11, 1577-1580.
206. Mikolajczyk M., Kielbasinski P. (1981) Recent developments in the carbodiimide chemistry, *Tetrahedron*, 37, 233-284.
207. Marmillon C., Bompard J., Calas M., Escale R., Bonnet P.-A. (2000) Solution parallel synthesis of cyclic guanidines, *Heterocycles*, 53, 6, 1317-1328.
208. Lewbart M. L., Schneider J. J. (1969) Preparation and properties of steroidal 17,20- and 20,21-acetonides epimeric at C-20. I. Derivatives of 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol, *J. Org. Chem.*, 34, 3505-3512.
209. Martin S. F., Zinke P. W. (1991) The furan approach to oxygenated natural products. Total synthesis of (+)-KDO, *J. Org. Chem.*, 56, 6600-6606.
210. Loiseau F., Hii K., Hill A. (2004) Multigram synthesis of well-defined extended bifunctional polyethylene glycol (PEG) chains, *J. Org. Chem.*, 69, 639-647.
211. Keane J. F., Cuomo J., Lex L., Seyedrezai S. E. (1983) Azoethoxy nitroxide spin-labeled crown ethers and cryptands with the N-O group positioned near the cavity, *J. Org. Chem.*, 48, 2647-2654.
212. Masson C. (2001) Transfert de gènes ciblé vers les tumeurs : conception, synthèse et propriétés de nouveaux vecteurs chimiques de l'ADN pour le ciblage des cellules cancéreuses, *Thèse de doctorat, Université Paris VI*, 204 p.
213. De Mico A., Margarita R., Parlanti L., Vescovi A., Piancatelli G. (1997) A versatile and highly selective hypervalent iodine (III)/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy-mediated oxidation of alcohols to carbonyl compounds, *J. Org. Chem.*, 62, 6974-6977.
214. Miller R. A., Hoerner R. S. (2002) Iodine as a chemoselective reoxidant of TEMPO : application to the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones, *Org. Lett.*, 5, 3, 285-287.
215. De Luca L., Giacomelli G., Masala S., Porcheddu A. (2001) A very mild and chemoselective oxidation of alcohols to carbonyl compound. *Org. Lett.*, 3, 19, 3041-3043.
216. De Luca L., Giacomelli G., Masala S., Porcheddu A. (2003) Trichloroisocyanuric/TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions : a close investigation, *J. Org. Chem.*, 68, 4999-5001.
217. Puigjaner C., Vidal-Ferran A., Moyano A., Pericas M. A., Riera A. (1999) A new family of modular chiral ligands for the catalytic enantioselective reduction of prochiral ketones, *J. Org. Chem.*, 64, 7902-7911.

218. Kim H. S., Moon J., Kim K. S., Choi M. M., Lee J. E., Heo Y., Cho D. H., Jang D. O., Park Y. S. (2004) Gene-transferring efficiencies of novel diamino cationic lipids with varies hydrocarbon chains, *Bioconjugate Chem.*, 15, 5, 1095-1101.
219. Herges R., Dikmans A., Umasish J., Köhler F., Jones P. G., Dix I., Fricke T., König B. (2002) Design a of new macrocyclic ionophore : synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions, *Eur. J. Org. Chem.*, 3004-3014.
221. Mac Kay A. F., Tarlton E. J., Petri S. I., Steyermark P. R., Mosley M. A. (1958) Amino Acids. V. 1,3-di-( $\omega$ -carboxyalkyl)-thioureas and their chemistry, *Can. J. Chem.*, 80, 1510-1517.
222. Boger D. L., Yohannes D. (1989) Total synthesis of K-13, *J. Org. Chem.*, 54, 2498-2502.
224. Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J-R., Schuber F. (1993) Les liposomes. Aspectes technologiques, biologiques et pharmacologiques, *Ed. Inserm*, 265p.
226. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipides, *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252.
227. Smith J. G., Walzem R. L., German J. B. (1993) Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1154, 327-340.
230. Wang Y., Dubin P. L., Zhang H. (2001) Interaction of DNA with actionic micelles : effects of micelle surface charge density, micelle shape, and ionic strength on complexation and DNA collapse, *Langmuir*, 17, 1670-1673.
231. Pitard B., Aguerre O., Airiau M., Lachagès A-M., Boukhnikachvili T., Byk G., Dubertret C., Herviou C., Scherman D., Mayaux J-F., Crouzet J. (1997) Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14412-14417.
232. Miller A. D. (1998) Cationic liposomes for gene therapy, *Angew. Chem. Interaction. Ed.*, 37, 1768-1785.
233. Pedroso de Lima M. C., Simoes S., Pires P., Faneca H., Duzgunes N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery : from biophysics to biological application, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 47, 277-294.
234. Hirsch-Lerner D., Zhang M., Eliyahu H., Ferrari M. E., Wheeler C. J., Barenholz Y. (2005) Effect of « helper lipids » on lipoplex electrostatics, *Biochim. Biophys. Acta*, 1714, 71-84.
235. Regelin A. E., Frankhaenel S., Gürtesch L., Prinz C., von Kiedrowski G., Massing U. (2000) Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs, *Biochim. Biophys. Acta*, 1464, 151-164.
236. Campbell M.J. (1995) Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection method, *Biotechniques*, 18, 1027-1032.
237. Szoka F., Papahadjopoulos D. (1978) Proocedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 9, 4194-4198.
238. Nicolazzi C., Garinot M., Mignet N., Scherman D., Bessodes M. (2003) Cationic lipids for transfection, *Curr. Med. Chem.*, 10, 1263-1277.
239. Ferrari M.E., Nguyen C. M., Zelphati O., Tsai Y., Felgner P. L. (1998) Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes, *Hum. Gene Ther.*, 10, 9, 341-351.
240. Byk G., Wetzer B., Frederic M., Dubertret C., Pitard B., Jaslin G., Scherman D. (2000) Reduction-sensitive lipopolyamines as a novel nonviral gene delivery system for modulated release of DNA with improved transgene expression, *J. Med. Chem.*, 43, 4377-4387.
241. Tranchnt I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., Scherman D. (2004) Physico-chemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids, *J. Gene Med.*, 6, S34-S35.
242. Alfmoti M. R., Harashima H., Shinohara Y., Alfmoti A., Baba Y., Kiwada H. (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery : biophysical study and mechanism of internalization, *Arch. Biochem. Biophys.*, 410, 246-253.
243. Xu Y., hui S-W., Frederik P., Szoka F. (1999) Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes, *Biophys. J.*, 77, 341-353.
244. Harries D., May S., Gelbart W., Ben-Shaul A. (1998) Structure, stability, and thermodynamics of lamellar DNA-lipid complexes, *Biophys. J.*, 75, 159-173.

245. Bandyopadhyay S., Tarek M., Klein M. (1999) Molecular dynamics study of a lipid-DNA complex, *J. Phys. Chem.*, 103, 46, 10075-10080.
246. Choosakoonkriang S., Wiethoff C., Anchordoquy T., Koe G., Smith J., Middaugh R. (2001) Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA, *J. Biol. Chem.*, 276, 11, 8037-8043.
247. Matsui H., Pan S. (2001) Distribution of DNA in cationic liposome complexes probed by Raman microscopy, *Langmuir*, 17, 571-573.
247. Braun C. S., Jas G. S., Choosakoonkriang S., Koe G. S., Smith J G. (2003) The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes, *Biophys. J.*, 84, 1114-1123.
248. Koltover I., Salditt T., Rädler J., Safinya C. (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science*, 281, 78-81.
252. Lenssen K., Jantschke P., von Kiedrowski G., Massing U. (2002) Combinatorial synthesis of new cationic lipids and high-throughput screening of their transfection properties, *ChemBioChem*, 3, 852-858.
253. Regelin A., Fernholz E., Krug H., Massing U. (2001) High Throughput screening method for identification of new lipofection reagents, *J. Biomol. Screening*, 6, 4, 245-254.
254. Greenfield N. J. (2004) Circular dichroism analysis for protein-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, 261, 55-78.
257. Hanlon S. Brudno S., Wu T. T., Wolf B. (1975) Structural transition of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solution. I. Reference spectra of conformational limits, *Biochemistry*, 14, 8, 1648-1660.
256. Serban D., Benevides J. M., Thomas G. J. (2002) DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in Escherichia coli plasmid pUC19, *Biochemistry*, 41, 847-853.
257. Zhang Z., Huang W., Tang J., Wang E., Dong S. (2002) Conformational transition of DNA induced by cationic lipid vesicle in acidic solution : spectroscopy investigation, *Biophys. Chem.*, 97, 7-16.
258. Zuidam N. J., Barenholz Y., Minsky A. (1999) Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposomes assemblies, *FEBS Letters*, 457, 419-422.
259. Prasad T. K., Gopal V., Rao N. M. (2003) Structural changes in DNA mediated by cationic lipids alter in vitro transcriptional activity at low charge ratios, *Biochim. Biophys. Acta*, 1619, 59-69.
260. Zuidam N. J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y. (1999) Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation lipoplexes affect transfection efficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, 1419, 207-220.
261. Choosakoonkriang S., Lobo B. A., Koe G. S., Middaugh R. (2002) Biophysical characterization of PEI/DNA complexes, *J. Pharm. Sci.*, 92, 8, 1710-1722.
263. Bombelli C., Faggioli F., Luciani P., Mancini G., Sacco M-G. (2005) Efficient transfection of DNA by liposomes formulated with cationic gemini amphiphiles, *J. Med. Chem.*, 48, 16, 4378-4382.
264. Lobo B. A., Vetro J., Suichi D. M., Zuckermann R. N., Middaugh C. R. (2002) Structure/function analysis of peptoid/lipoid :DNA complexes, *J. Pharm. Sci.*, 92, 9, 1905-1918.
265. Braun C. S., Vetro J. A., Tomalia D. A., Koe G. S., Koe J. G., Middaugh C. R. (2005) Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles, *J. Pharm. Sci.*, 94, 2, 423-436.
266. Adami R., C., Collard W. T., Gupta S. A., Kwok K. Y., Bonadio J., Rice K. G. (1998) Stability of peptid-condensed DNA formulations, *J. Pharm. Sci.*, 87, 6, 678-683.
271. Chen X., Plasencia C., Hou Y., Neamati N. (2004) Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD-peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery, *J. Med. Chem.*, 48, 4, 1098-1106.
274. Abramson H. A. (1932) Electrokinetic phenomena. VI. Relationship between electric mobility, charge and titration of proteins, *J. General Physiology*, 15, 575-603.
277. Zarif L. (2005) Drug delivery by lipid cochleates, *Methods. Enz.*, 391-314-329.
278. Petit L., Joubert L., Tranchant I., Herscovici J., Adamo C. (2005) Theoretical study of the interaction between a lipopolythiourea and DNA, *article soumis*.
280. Siskind L. J., Kolesnick R. N., Colombini M. (2002) Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins, *J. Biol. Chem.*, 277, 26796-26803.

- 281.** Mounkes L. C., Zhong W., Cipres-Palacin G., Heath T. D., Debs R. J. (1998) Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.*, 273, 167-173.
- 282.** Still W. C., Kahn M., Mitra A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, 43, 14, 2923-2925.