



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Chimie Macromoléculaire et Supramoléculaire*

Présentée et soutenue par *Alexandra PEREZ-ANES*
Le *7 décembre 2010*

Titre : *DENDRIMÈRES PHOSPHORES CATIONIQUES INHIBITEURS DU VIH :
PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET ACTIVITÉ ANTIVIRALE*

JURY

Delphine FELDER-FLESCH, Chargé de recherche CNRS, Strasbourg (Rapporteur)
Raluca STAN, Professeur à l'Université "Politehnica", Bucarest (Rapporteur)
Rémy POUPOT, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse (Examinateur)
Cédric-Olivier TURRIN, Chargé de recherche CNRS, Toulouse (Directeur de thèse)
Muriel BLANZAT, Chargé de recherche CNRS, Toulouse (Directeur de thèse)
Isabelle RICO-LATTES, Directeur de recherche CNRS, Toulouse (Invité)
Anne-Marie CAMINADE, Directeur de recherche CNRS, Toulouse (Invité)

Ecole doctorale : *SCIENCES DE LA MATIÈRE*
Unité de recherche : *Laboratoire de Chimie de Coordination (UPR 8241). Laboratoire des
Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (UMR 5623)*
Directeur(s) de Thèse : *Dr C.-O. TURRIN et Dr M. BLANZAT*
Rapporteurs : *Dr. D. FELDER-FLESCH et Pr. R. STAN*

“Esperando, el nudo se deshace y la fruta madura.”

Federico García Lorca (Poeta español)

“La química es probar, probar y probar.”

José Barluenga Mur (Químico español)

A Phil et Hannah

Avant-propos

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à M. Rémy Poupot, Professeur à l'Université Paul Sabatier (Toulouse), d'avoir présidé le jury de cette thèse, à Mmes Delphine Felder-Flesch, Chargée de recherche CNRS au IPCMS (Strasbourg) et Raluca Stan, Professeur à l'Université Politehnica (Bucarest) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Merci également à Mme Anne-Marie Caminade et M. Jean-Pierre Majoral (Equipe M, LCC) et Mme Isabelle Rico-Lattes (IMRCP) de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail.

J'adresse un grand merci à mes directeurs de thèse, les Docteurs Muriel Blanzat et Cédric-Olivier Turrin, pour m'avoir donné cette opportunité et pour m'avoir transmis une partie de leurs connaissances et leurs savoir-faire. Je serais toujours admirative de votre rigueur scientifique, de votre créativité, de votre efficacité et de votre amour pour la précision. Vous êtes des bûcheurs ! Je tiens également à vous remercier pour la disponibilité, la patience et les conseils savants qui m'ont permis d'avancer dans les moments difficiles, dans la chimie et dans la vie, MERCI !

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est :

Gregory Spataro et Cristina Bololoi qui ont réalisé les travaux précédents à cette thèse et qui m'ont beaucoup aidé et conseillé pour l'élaboration des dendrimères catanioniques.

Yannick Coppel (Service de RMN, LCC), pour son aide. J'ai beaucoup appris sur la RMN grâce à ses grandes compétences.

Serge Mazères (Plateforme imagerie TRI, IPBS), pour l'encadrement des études de fluorescence, pour sa sympathie, son efficacité et sa disponibilité.

Christiane Moog (INSERM, Strasbourg), pour la réalisation des tests biologiques.

Cristina Bololoi et Mme Tiersche, (Max Planck Institut à Golm, Allemagne) pour la réalisation des expériences de cryofracture.

Corinne Routaboul (Service Commun de Spectroscopie IR et Raman, UPS), pour les études par IR.

Fernanda Rodrigues, dont l'aide sur l'étude physico-chimique et les grandes qualités humaines ont permis de mener ces travaux à bon port.

Les documentalistes Marie-Hélène Gulli et Danielle Brunet, pour votre disponibilité et votre bonne humeur. Philippe Eyraud, pour "ton aide efficace et bibliographique", SciFinder et EndNote n'ont pas de secrets pour toi. Pour tous le bon temps passé dans vos bibliothèques.

Christophe Mingotaud, qui m'a permis de participer au projet européen Nanotool qui a financé ces travaux.

Tous les membres de l'équipe M et de l'IMRCP, étudiants et permanents, qui m'ont beaucoup aidé et encouragé au cours de cette thèse.

Je dédie ce travail...

A Muriel et CO, ¡habéis hecho posible, lo imposible! ¡gracias maestros!

A Quique, Victorio, Patri, Ciara, Lore y Romina, con vosotros empezó esta aventura...

Au "Club Nanotool".

Aux très nombreux amis que j'ai rencontré dans les deux laboratoires.

A Marjorie, Aurélien, Laurie, Renée, Pauline et Wael, vous m'avez beaucoup « supporté » dans ce dernier temps.

A la Cavero, tu me enseignaste que la cromatografía es un arte y que "a grandes males, grandes remedios".

A mis chicas españolas (por orden de "aparición") : Anna, Mar, Rosa, Carmen, Sheila, Emma, Eva y Patricia. Gracias niñas. Gracias por vuestro apoyo, vuestra ayuda, vuestra comprensión y vuestro cariño, dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de piso, primero Hugo y luego "mi" Eva, gracias por soportarme 24h/24 non-stop ! Por todos los "apéros scientifiques ou non" en terraza acompañados de "Mahou" y chips lights. Gracias por vuestro buen humor (Alex, ¡peatón!) y cariño. Ha sido un verdadero placer. Y a dos compañeros de piso "ocasionales", Juanjo (gracias por tus croquetas, bizcochos y torrijas) y Laura, mi asturiana favorita.

A Steph et Greg, mes demi-colocs, pour votre sympathie et votre amitié. Vos sourires m'ont toujours encouragé !

A Flippin'Heck, mes punks préférés : Missao, Hugues, Eric et Phil, pour tous les bons moments que nous avons partagés. Vous êtes simplement géniaux !

Aux lyonnais du Club Microfiche et à Faouzi Laadbari, toujours là dans l'urgence.

A la famille Eyraud, Christine (qui a eu le courage de corriger le français de ce manuscrit), Bernard, Benoît et ma petite Hannah, pour votre soutien et votre optimisme, grâce à vous, la vie est plus agréable.

A mi familia, especialmente a mis padres, Jose y Tere, a mi hermana, Lore y a Suso. Gracias por estar siempre ahí, por apoyarme incondicionalmente en mis aciertos y en mis errores. Va por vosotros.

A Phil, ton soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme. Je ne sais pas comme remercier tout ton aide, ton appui, tes conseils, ta compréhension et surtout ta patience infinie. Veux-tu m'épouser ?

Merci à tous.

Sommaire

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	15
CHAPITRE I : DENDRIMERES ET THERAPIES ANTI-VIH.....	21
I.1 INTRODUCTION.....	25
I.2 THERAPIE ANTI-VIH.....	26
I.2.1 Le SIDA.....	26
I.2.2 Le virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).....	27
I.2.2.1 <i>La structure du VIH-1</i>	28
I.2.2.2 <i>Cycle de réplication du VIH</i>	29
I.2.3 Dendrimères et chimiothérapie du VIH-1.....	33
I.2.3.1 <i>Le dendrimère : définition et structure</i>	34
I.2.3.2 <i>Interaction des dendrimères avec les systèmes biologiques</i>	36
I.2.3.2.1 Le concept de multivalence.....	36
I.2.3.2.1.1 <i>Effet cluster glycoside</i>	37
I.2.3.2.1.2 <i>Effet dendritique</i>	37
I.2.3.2.2 Biocompatibilité.....	38
I.2.3.2.2.1 <i>Cytotoxicité in vitro</i>	39
I.2.3.2.2.2 <i>Cytotoxicité in vivo</i>	40
I.2.3.2.2.3 <i>Immunogénicité</i>	42
I.2.3.2.2.4 <i>Biopermabilité</i>	42
I.2.3.3 <i>Inhibiteurs dendrimériques de reconnaissance et/ou fixation</i>	42
I.2.3.3.1 Inhibiteurs de l'entrée du VIH dans les cellules hôtes.....	43
I.2.3.3.1.1 <i>Interaction non spécifique de type électrostatique avec le VIH</i>	43
I.2.3.3.1.2 <i>Interaction spécifique avec le VIH</i>	50
I.2.3.3.1.3 <i>Interaction spécifique avec la cellule cible du VIH</i>	59
I.2.3.3.2 Inhibiteur de fusion.....	68
I.2.3.4 <i>Inhibiteurs du cycle de réplication</i>	69
I.2.3.4.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	69
I.2.3.4.1.1 <i>Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse</i>	69

I.2.3.4.1.2 Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse.....	70
I.2.3.4.1.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	71
I.2.3.4.1.4 Dendrimères comme pro-médicaments inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	72
I.2.3.4.1.5 Vectorisation des inhibiteurs de la transcriptase inverse par les dendrimères.....	74
I.2.3.4.1.6 Dendrimères inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	80
I.2.3.4.2 Inhibiteurs de l'intégrase.....	80
I.2.3.4.3 Inhibiteurs de la transcription.....	81
I.2.3.4.4 Inhibiteurs de la protéase.....	83
I.2.3.5 Thérapie génique anti-VIH.....	86
I.3 CONCLUSION ET BUT DE CETTE THESE.....	87
I.4 BIBLIOGRAPHIE.....	90
CHAPITRE II : DESIGN, SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE NOUVEAUX DENDRIMÈRES PHOSPHORES ANTI-VIH.....	99
I.1 INTRODUCTION.....	103
II.2 CADRE DU SUJET ET PROBLÉMATIQUE.....	103
II.3 OBJECTIFS.....	107
II.4 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	109
II.4.1 Synthèse des squelettes dendritiques PPH.....	109
II.4.2 Fonctionnalisation de la surface des dendrimères PPH.....	111
II.4.3 Formation des amphiphiles catanioniques.....	117
II.5 STRATÉGIE GÉNÉRALE POUR LA SYNTHÈSE DES DENDRIMÈRES PPH.....	119
II.5.1. Greffage de fonction phosphonate en surface.....	119
II.5.2 Transformation des alkyl-phosphonate en acides phosphoniques correspondants...120	
II.5.3 Formation des dendrimères catanioniques.....	121
II.6 RESULTATS.....	122
II.6.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate 1x-G1	122
II.6.1.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate 1a-G1	122
II.6.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 1b-G1	123
II.6.1.3 Synthèse du dendrimère chargé 1c-G1 et de son analogue catanionique 1d-G1	124
II.6.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate 2x-G1 ...125	

II.6.2.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate 2a-G	125
II.6.2.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 2b-G1	126
II.6.2.3 Synthèse du dendrimère sel de sodium 2c-G1 et son analogue catanionique 2d-G1	127
II.6.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate 3x-G1 , 4x-G1 et 5x-G1	127
II.6.3.1 Généralités.....	127
II.6.3.2 Synthèse de phénols : Série α -alkylphosphonate 3a , 4a et 5a	128
II.6.3.3 Synthèse des dendrimères à terminaisons diméthylphosphonate 3a-G1 , 4a-G1 et 5a-G1 ...130	
II.6.3.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 3b-G1 , 4b-G1 et 5b-G1	131
II.6.3.5 Synthèse des dendrimères sel de sodium, 3c-G1 , 4c-G1 et 5c-G1	132
II.6.3.6 Analyse structurelle par spectroscopie de RMN 2D de 4c-G1 et 5c-G1	132
II.6.3.7 Synthèse des dendrimères catanioniques 3d-G1 , 4d-G1 et 5d-G1	136
II.7 COMPILATION DES DONNEES RMN	137
II.8 PROPRIETES BIOLOGIQUES DE NOUVEAUX CATANIONIQUES DENDRITIQUES ANALOGUES DU GALCER ET DE LEURS PRECURSEURS POLY-ANIONIQUES	138
II.8.1 Définitions.....	138
II.8.2 Lignée cellulaire et souche virale.....	138
II.8.3 Méthode utilisée.....	139
II.8.4 Activité anti-VIH et viabilité cellulaire.....	139
II.8.4.1 Sel de sodium Nc-G1	139
II.8.4.2 Dérivés catanioniques Nd-G1	142
II.9 CONCLUSIONS	144
II.10 BIBLIOGRAPHIE	146
CHAPITRE III : ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DES DENDRIMERES CATANIONIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS	153
III.1 INTRODUCTION	156
III.2 RAPPEL SUR L'AGREGATION DES TENSIOACTIFS EN SOLUTION	156
III.2.1 Les tensioactifs catanioniques.....	159
III.3 AGREGATION DANS L'EAU DES DERIVES CATANIONIQUES DENDRITIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS	165

III.3.1 Sels de sodium des dendrimères PPH à terminaisons acide.....	165
III.3.1.1 Concentration d'agrégation critique.....	166
III.3.1.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface.....	166
III.3.1.1.2 Influence de la nature de la branche terminale.....	169
III.3.1.2 Taille et forme des objets.....	170
III.3.2 Dendrimères PPH catanionique.....	170
III.3.2.1 Concentration d'agrégation critique.....	170
III.3.2.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface.....	171
III.3.2.1.2 Influence de la chaîne alkyle latérale.....	172
III.3.2.2 Corrélation des propriétés d'agrégations et des propriétés biologiques des catanioniques Nd-G1	174
III.3.2.3 Taille et forme des objets.....	177
III.3.2.3.1 Etude de la distribution de la taille des agrégats.....	177
III.3.2.3.2 Etude par microscopie électronique.....	179
III.3.2.3.3 Etude des objets par cryofracture.....	180
III.4 CONCLUSIONS.....	182
III.5 BIBLIOGRAPHIE.....	185
CHAPITRE IV : ETUDE DE LA STABILITE PAR FLUORESCENCE.187	
IV.1 INTRODUCTION.....	190
IV.2 RAPPELS SUR LES DENDRIMERES DE TYPE PPH FLUORESCENTS ET SOLUBLES DANS L'EAU.....	191
IV.2.1 Exemple d'utilisation d'un dendrimère PPH fluorescent pour la colocalisation de récepteur par FRET.....	192
IV.2.2 Exemple d'un dendrimère PPH fluorescent utilisé pour la cytométrie en flux.....	194
IV.3 RAPPELS SUR LES DERIVES DE SUCRE FLUORESCENTS.....	196
IV.4 RAPPELS SUR LES SYSTEMES CATANIONIQUES FLUORESCENTS.....	198
IV.5 STRATEGIE POUR LA MESURE DE LA STABILITE DES PAIRES D'IONS.....	204
IV.6 SYNTHESE DES MARQUEURS FLUORESCENTS.....	206
IV.6.1 Synthèse du dendrimère fluorescent à cœur julolidine 11-Df	206
IV.6.2 Synthèse de l'aminosucres fluorescent 18 ou Lf	212
IV.6.3 Synthèse des assemblages fluorescents 25-(Df(Na)₁₀) , 26-(Df(L16)₁₀) , 27-(Df(L8)(L16)₉) et 28-(Df(Lf)(L16)₉)	216

IV.7 ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ASSEMBLAGES CATIONIQUES FLUORESCENTS..	219
IV.7.1 Etude par tensiométrie.....	219
IV.7.2 Etude de la taille et de la forme des objets supramoléculaires fluorescents.....	222
IV.8 ETUDE DE LA STABILITE DES COMPLEXES D'ASSOCIATION DES ASSEMBLAGES CATIONIQUES PAR FLUOROMETRIE.....	224
IV.8.1 Etude de la stabilité de la paire d'ions par FRET.....	224
IV.8.2 Détermination des constantes de dissociation par fluorimétrie.....	225
IV.9 CONCLUSIONS.....	229
IV.10 BIBLIOGRAPHIE.....	231
CONCLUSION GENERALE.....	235
PARTIE EXPERIMENTALE.....	241
A METHODES GENERALES.....	245
A.1 Conditions de travail, solvants et réactifs.....	245
A.2 Techniques de caractérisation structurale.....	245
A.3 Produits déjà décrits.....	246
B SYNTHÈSE.....	246
B.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate.....	246
B.1.1 Synthèse du dendrimère diméthylephosphonate 1a-G1	246
B.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 1b-G1	247
B.1.3 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 1c-G1	248
B.1.4 Synthèse du dendrimère vinylphosphonique cationique analogue du GalCer.....	249
B.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate.....	250
B.2.1 Synthèse du dendrimère cationique analogue du GalCer 2d-G1	250
B.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate.....	251
B.3.1 Synthèse de la série C0 (sans chaîne alkyle).....	251
B.3.1.1 Synthèse de l'acide carboxylique 6	251
B.3.1.2 Synthèse du phénol 3a	252
B.3.1.3 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 3a-G1	253
B.3.1.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 3b-G1	253

B.3.1.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 3c-G1	254
B.3.1.6 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 3d-G1	255
B.3.2 Synthèse de la série C3 (avec une chaîne alkyle à 3 atomes de carbone).....	256
B.3.2.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 9	256
B.3.2.2 Synthèse de l'acide carboxylique 7	257
B.3.2.3 Synthèse du phénol 4b	257
B.3.2.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 4a-G1	258
B.3.2.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 4b-G1	259
B.3.2.6 Synthèse du dendrimère à terminaison monosodium phosphonique 4c-G1	260
B.3.2.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 4d-G1	261
B.3.3 Synthèse de la série C10 (avec une chaîne alkyle à 10 atomes de carbone).....	262
B.3.3.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 10	262
B.3.3.2 Synthèse de l'acide carboxylique 8	263
B.3.3.3 Synthèse du phénol 5a	263
B.3.3.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 5a-G1	264
B.3.3.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 5b-G1	265
B.3.3.6 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 5c-G1	266
B.3.3.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 5d-G1	267
B.4 Synthèse des dendrimères fluorescents.....	268
B.4.1 Synthèse du phénol 13	268
B.4.2 Synthèse du dendrimère 17	269
B.4.3 Synthèse du phénol 16	269
B.4.4 Synthèse du dendrimère 15	270
B.4.5 Synthèse du dendrimère fluorescent 14	271
B.4.6 Synthèse du dendrimère fluorescent 11-Df	272
B.4.7 Synthèse du dendrimère fluorescent 25-Df(Na)₁₀	273
B.4.8 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 26-Df(L16)₁₀	274
B.4.9 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 27-Df(L8)(L16)₉	275
B.4.10 Synthèse du composé 22	276
B.4.11 Synthèse du composé 23	277
B.4.12 Synthèse du composé 24	278
B.4.13 Synthèse du composé 18-Lf	278
B.4.14 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 28-Df(Lf)(L16)₉	280

C TESTS BIOLOGIQUES.....	281
C.1 Conditions expérimentales d'infection des cellules CEM-SS et MT4.....	281
C.2 Evaluation de l'activité anti-VIH.....	282
C.3 Evaluation de la cytotoxicité.....	283
D TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	284
D.1 Préparation des solutions des composés catanioniques et leurs précurseurs anioniques.....	284
D.2 Mesure de tension de surface.....	284
D.3 Détermination des liaisons hydrogène intermoléculaires par infrarouge.....	284
D.4 Diffusion quasi-élastique de la lumière.....	285
D.5 Microscopie électronique par transmission.....	285
D.6 Cryofracture.....	286
E SPECTROFLUORIMETRIE.....	286
F BIBLIOGRAPHIE.....	288
ANNEXES.....	289

Liste des abréviations

- 12-DAN-ADA** : 12-(N-dansyl)aminododecanate de sodium
- 15C5** : éther 15-couronne-5
- 2D** : deux dimensions
- 3TC** : lamivudine
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AOT** : dioctylsufosuccinate de sodium
- Ar-** : groupe aryle
- ARN** : acide ribonucléique
- ARNi** : acide ribonucléique interférence
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- azoTAB** : bromure de azobenzènetriméthylammonium
- AZT** : zidovudine
- BD** : basse densité
- BHA** : diphénylméthanamine
- Boc** : groupe tert-butyloxy-carbonyle
- C10** : chaîne alkyle à 10 atomes de carbone
- C₁₂Et₃** : bromure de dodecyltriéthylammonium
- C2-V3** : région de la gp120
- C3** : chaîne alkyle à 3 atomes de carbone
- C60** : fullerène
- CAC** : Concentration d'agrégation critique
- CBS** : carbosilane
- CC₅₀** : concentration cytotoxique à 50%
- CCR5** : récepteur de chimiokine CC de type 5
- CD4** : cluster de différenciation 4
- CEM-SS** : cellules humaines lymphoblastoïdes T4 ; « SS » : syncitial sensitivity
- CI₅₀** : concentration inhibitrice à 50%
- CMC** : Concentration micellaire critique
- CMV** : Cytomegalovirus
- CRD** : domaine de reconnaissance carbohydre à l'extrémité C
- CTAB** : bromure de cetyltriméthylammonium
- CTAOH** : hydroxyde de cetyltriméthylammonium
- CXCR4** : récepteur chimiokine CXC de type 4

- DAB** : poly(propylèneimine) à cœur diaminobutane
- DC** : cellules dendritiques
- DCC** : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
- DCM** : dichlorométhane
- DC-SIGN**: dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin
- DDAB ou DODAB** : bromure de didodécyltriméthylammonium
- DIPEA** : N,N-Diisopropyléthylamine
- DLS** : diffusion light scattering
- DMF** : diméthylformamide
- DOT** : (-)- β -D-(2R,4R)-dioxolanéthymine
- DPH**: 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
- DPPC** : dipalmitoylphosphatidylcholine
- DS** : sulfate de dextrine
- DTAB** : bromure de dodécyltriméthylammonium
- E. Coli** : Escherichia coli
- EDAC** : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)
- EFV** : Efavirenz
- ESFF** : Extensible Systematic Forcefield
- Et-** : groupe éthyle
- F2FITC** : Oregon Green 488 isothiocyanate
- FAB** : Fast atom bombardment
- Fc-DC-SIGN** : portion extracellulaire C-terminale de DC-SIGN fusionnée avec un fragment de l'immunoglobuline humaine IgG1-Fc
- FDA** : American Food and Drugs Administration
- FRAP** : Fluorescence Recovery After Photobleaching
- FRET**: Förster Resonance Energy Transfer
- GalCer** : galactosylcéramide
- gp** : glycoprotéine
- GSL** : glycosphingolipide
- GX** : génération X
- h** : heure
- HAART** : Highly Active Antiretroviral Treatment
- HD** : haute densité
- HepG2** : cellules hépatome humaine
- HOBt** : hydroxybenzotriazole

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
HR1 et HR2 : domaines protéiques du peptide de fusion
HSMA : anhydride maléique-styrène
HT-29 : cellules cancéreuses du colon humaine
HUS : Syndrome hémolytique et urémique
Hz : hertz
IC : ionisation chimique
If : intensité de fluorescence
IMRCP : Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique
IN : intégrase
INNTI : inhibiteurs non-nucléosidiques
INTI : inhibiteurs nucléosidiques
INtTI : inhibiteurs nucléotidiques
IR : infrarouge
IRRAS : Spectroscopie Infrarouge de Réfexion-Absorption
IT : index thérapeutique
K_D : constante de dissociation
L16 : N-hexadécylamino-1-déoxylactitol
L8 : N-octamino-1-déoxylactitol
LCC : Laboratoire de Chimie de Coordination
m : masse
Me- : groupe méthyle
mer : nombre de groupes à la surface
MET : Microscopie électronique à transmission
MGCA : chlorure de monoglycerylcethyl diméthylammonium
min : minutes
Mo/Mac : macrophages monocyte
MPPI : dendrimère PPI à terminaisons mannose
MT2 : cellules humaines T de type 2
MT4 : cellules humaines T de type 4
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
N : nombre de sites actifs
N₃P₃ : cyclotriphosphazène
NaBH₄ : borohydrure de sodium
NaSO₃ : Sulfate de sodium
NBD-PE : N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole phosphatidyléthanolamine

NBS C₁₂-HPC : 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)dodecanoyl-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

NHS : N-hydroxysuccinimide

nm : nanomètre

NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

°C : degrees Celsius

p : protéine

p/p : poids/poids (rapport massique)

PAMAM : polyamidoamine

PBMC : cellule mononucléaire de sang périphérique

PBS : phosphonate buffer solution

PE : phycoérythrine

PEG : poly(éthylène glycol)

PEI : poly(éthylène imine)

PGSE : Pulse Gradient Spin-Echo

PPH : poly(phosphorhydrazone)

PPI : poly(propylène imine)

ppm : partie par million

PR : protéase

PS : thiophosphoryle

PTA : 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane

QCM : Quartz Cristal Microbalance

R- : substituent R

R₀ : rayon de Förster R₀

RCI₅₀ : concentration inhibitrice normalisée

rgp : glycoprotéine recombinée

Rh-PE : rhodamine- phosphatidyléthanolamine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SANS : Small Angle Neutron Scattering

SDBS : dodécylbenzènesulfonate de sodium

SDS : dodécylsulfate de sodium

SGalCer : galactosylcéramide -3'-sulfate

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SLT : toxine de type Shiga

S_N2 : substitution nucléophile de type 2

SOS : octylsulfate de sodium

t. a. : température ambiante

TBTU : O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium tetrafluoroborate

TEA : triéthylamine

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TI : transcriptase inverse

TLR2 : toll-like receptor 2

TMS : triméthylsilane

TNS : 2-(*p*-toluidino)naphtalène-6-sulfonate

TP : deux photons

TPPI : dendrimère PPI à terminaisons t-Boc-glycine

TriCat : tensioactif catanionique tricaténaire

Ts : tension de surface

TuPPI : dendrimère poly(propylène imine) avec des groupements tuftsine conjugués

UV : ultraviolet

VHS : Virus de l'herpès

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

VIS : Virus d'Immunodéficience du Singe

z : charge

Introduction générale

Introduction générale

Parmi les nombreuses maladies provoquées par les virus, certaines sont catastrophiques pour l'Humanité. Ainsi, le *Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquis* (SIDA) est devenu l'une des épidémies les plus dévastatrices de l'histoire. Depuis que le VIH (Virus de l'Immunodéfiance Humaine) a été identifié en 1983,⁽¹⁾ plus de 40 millions de personnes ont été infectées dans le monde entier. L'Afrique subsaharienne reste la région la plus touchée : 67% des personnes affectées y vivent et parmi elles une majorité de femmes.⁽²⁾

Dans le but de prévenir les infections provoquées par les virus, la vaccination est une solution peu coûteuse et efficace. L'utilisation des vaccins a permis une grande diminution de la morbidité (rapport entre le nombre des malades et celui d'une population) et de la mortalité associées à des infections virales comme les poliomyélites, la rougeole et la rubéole.⁽³⁾ La variole a quant à elle été éradiquée en 1980.⁽⁴⁾ A ce jour, on dispose de vaccins pour prévenir plus de 13 infections virales chez les humains.⁽⁵⁾

Un vaccin serait aussi l'option la plus convaincante contre la propagation du VIH/SIDA. Cependant, après plus de 25 ans de recherche, le développement d'un vaccin s'est révélé infructueux à cause de la complexité des défis scientifiques. Cependant de nouveaux espoirs apparaissent : une équipe américaine a récemment identifié une nouvelle cible sur le VIH, un talon d'Achille qui pourrait permettre une avancée dans l'élaboration d'un vaccin.⁽⁶⁾ Leur travail porte sur des anticorps neutralisants (PG9 et PG16) capables d'inhiber de nombreux types de VIH plus particulièrement répandus dans les pays en développement. Ce travail ouvre des perspectives de mise au point d'un vaccin visant à produire des anticorps de ce type. De plus, le pouvoir neutralisant de ces anticorps est suffisamment fort pour envisager que même un vaccin ayant un pouvoir immunogène à 30% d'efficacité pourrait suffire à induire une protection contre le VIH.

En attendant des vaccins anti-VIH, le développement de nouvelles méthodes alternatives pour stopper la propagation de la maladie et surtout soigner les personnes infectées est un besoin impérieux.

Pendant les deux dernières décennies, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des médicaments antiviraux, particulièrement contre le VIH. A ce jour, on dénombre 25 composés autorisés⁽⁷⁾ par la FDA (American Food and Drug Administration) pour le traitement de l'infection au VIH. Ces traitements nommés polythérapies consistent en l'utilisation combinée d'au moins trois principes actifs qui agissent à différentes étapes du cycle de réplication du VIH. Par contre, l'émergence de souches de VIH résistantes à ces médicaments et l'apparition d'effets secondaires

incitent à la recherche d'autres agents antiviraux avec de nouveaux mécanismes d'action plus spécifiques et plus puissants que ceux utilisés couramment en thérapie.

Cet arsenal de produits de première génération bloquant l'activité des enzymes virales sera vraisemblablement complété par les inhibiteurs d'entrée mettant en jeu des interactions complexes entre macromolécules.

En matière de nouvelles classes d'inhibiteurs d'entrée, une des premières approches a consisté à masquer les récepteurs cellulaires CD4 avec des anticorps anti-CD4.⁽⁸⁾ L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD4 (mAbs) a conduit à des résultats prometteurs. De la même façon, on peut envisager une stratégie similaire en bloquant les récepteurs cellulaires alternatifs GalCer. Les analogues synthétiques solubles du GalCer sont capables de bloquer spécifiquement les glycoprotéines virales gp120 qui sont aussi reconnues par les récepteurs cellulaires CD4. De cette manière, les analogues du GalCer peuvent empêcher le virus de pénétrer et d'infecter les cellules humaines. De ce fait, ce type de composés fonctionne comme leurres du VIH.

Par ailleurs, les interactions peuvent être non spécifiques. Il est connu que l'interaction des polyanions avec la surface virale peut bloquer l'infection par interactions du polyanion avec la boucle V3 de la gp120 qui est chargée positivement. Les médicaments antiviraux poly-anioniques concourent donc avec la surface cellulaire pour s'attacher au virus, en conséquence le taux d'infection est diminué. Certains de ces composés se trouvent dans les dernières étapes des tests cliniques en tant que microbicides pour la prévention de la transmission sexuelle du VIH.⁽⁹⁻¹¹⁾

Parmi les types de macromolécules capables d'inhiber ces interactions, les dendrimères apparaissent comme une bonne alternative grâce à leur caractère multivalent et à la possibilité de les fonctionnaliser avec des fragments spécifiques pour interagir avec le virus ou avec les cellules ciblées par le VIH. De plus, ils peuvent être adaptés pour l'utilisation en milieu biologique, notamment comme agents antiviraux, comme nous verrons dans le Chapitre I.

Une de ces approches a été développée au sein de nos laboratoires. Deux familles de dendrimères catanioniques analogues du GalCer ont été synthétisées. Ces analogues multivalents du GalCer ont une activité de l'ordre du submicromolaire qui dépend fortement de la structure du cœur⁽¹²⁾ mais ils montrent aussi une toxicité cellulaire non-négligeable.

Les travaux de cette thèse sont dirigés vers : (1) la diminution de la toxicité cellulaire par modification chimique de l'entité catanionique et la comparaison avec leurs précurseurs anioniques et (2) la rationalisation et la quantification de la stabilité de la paire d'ions catanionique.

La diminution de la cytotoxicité et l'étude de l'influence de la périphérie du dendrimère sur son activité et sur sa toxicité impliquera des modifications structurales au sein de l'association catanionique afin de renforcer l'effet hydrophobe entre les éléments constitutifs pour éviter une

possible dissociation de la paire d'ions du catanionique. Cette dissociation conduirait à la libération d'un aminosucre à longue chaîne (N-hexadécylaminolactitol) et elle pourrait en effet être responsable de la cytotoxicité de ces composés. Pour cela, nous avons conçu une série de nouveaux systèmes catanioniques multivalents constitués par des dendrimères de première génération à terminaison acide phosphonique et des unités de N-hexadécylaminolactitol. Les mêmes squelettes dendritiques sous forme de sels de sodium permettront de comparer directement leur relation structure/activité avec celle des assemblages catanioniques.

Concernant la synthèse de ces nouveaux analogues catanioniques du GalCer, la méthode utilisée doit conduire à des dendrimères catanioniques par simple réaction acido-basique entre des N-alkylamino-1-déoxylactitols (composés comportant les sites actifs) et des dendrimères acides à chaînes alkyles. Les chaînes alkyles sont supposées participer à la consolidation de l'entité catanionique ainsi qu'au renforcement de l'affinité avec le VIH.

Pour déterminer l'origine de la cytotoxicité élevée de ces dendrimères catanioniques analogues du GalCer, deux types d'études ont été mises au point. Dans un premier temps, une étude physico-chimique de ces systèmes a été réalisée pour connaître les propriétés des systèmes en solution. Dans un deuxième temps, des études par spectrofluorimétrie ont été accomplies pour rationaliser et quantifier la stabilité de la paire d'ions.

Les études physicochimiques visent à déterminer les concentrations d'agrégation critiques, les modes d'autoorganisation et donc la forme et la taille des objets formés. Nous explorerons ainsi les aptitudes de ces familles de tensioactifs dendritiques à former des objets à des concentrations pour lesquelles elles sont biologiquement actives. Cela sera nécessaire pour vérifier que la cytotoxicité n'est pas due à un phénomène d'agrégation.

Nous avons ensuite vérifié une deuxième hypothèse qui propose que l'origine de cette toxicité soit liée au manque de stabilité de la paire d'ions, responsable de la libération de l'aminolactitol qui a des propriétés détergentes à une concentration de 10^{-4} M.⁽¹³⁾ Pour cela, nous avons mis en œuvre deux méthodes pour évaluer la stabilité de la paire d'ions par spectrofluorimétrie. Des analogues fluorescents des dendrimères catanioniques ont été synthétisés pour tenter de mesurer les constantes d'association par spectrofluorimétrie.

Bibliographie

- (1) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axlerblin, C.; Vezinetbrun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., *Science* **1983**, *220*, 868.
- (2) UNASIDA, *Report on the global AIDS epidemic* **2008**, 32.
- (3) Asaria, P.; MacMahon, E., *Br. Med. J.* **2006**, *333*, 890.
- (4) Broder, S.; Collins, J. M.; Markham, P. D.; Redfield, R. R.; Hoth, D. F.; Groopman, J. E.; Gallo, R. C.; Yarchoan, R.; Lane, H. C.; Klecker, R. W.; Mitsuya, H.; Gelmann, E.; Resnick, L.; Myers, C. E.; Fauci, A. S., *Lancet* **1985**, *2*, 627.
- (5) Arvin, A. M.; Greenberg, H. B., *Virology* **2006**, *344*, 240.
- (6) Walker, L. M.; Phogat, S. K.; Chan-Hui, P. Y.; Wagner, D.; Phung, P.; Goss, J. L.; Wrin, T.; Simek, M. D.; Fling, S.; Mitcham, J. L.; Lehrman, J. K.; Priddy, F. H.; Olsen, O. A.; Frey, S. M.; Hammond, P. W.; Kaminsky, S.; Zamb, T.; Moyle, M.; Koff, W. C.; Poignard, P.; Burton, D. R.; Protocol, G. P. I., *Science* **2009**, *326*, 285.
- (7) Sosnik, A.; Chiappetta, D. A.; Carcaboso, A. M., *J. Control. Release* **2009**, *138*, 2.
- (8) Shearer, M. H., *J. Infect. Dis.* **1998**, *177*, 1727.
- (9) Stone, A., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 977.
- (10) Balzarini, J.; Van Damme, L., *Lancet* **2007**, *369*, 787.
- (11) Fletcher, P.; Wallace, G.; Mesquita, P.; Shattock, R., *Retrovirology* **2006**, *3*, 46.
- (12) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2207.
- (13) Rico-Lattes, I.; Garrigues, J. C.; Perez, E.; Andre-Barres, C.; Madelaine-Dupuich, C.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1995**, *19*, 341.

Chapitre I : Dendrimères et Thérapies Anti-VIH

CHAPITRE I : DENDRIMERES ET THERAPIES ANTI-VIH.....	21
I.1 INTRODUCTION	25
I.2 THERAPIE ANTI-VIH.....	26
I.2.1 Le SIDA.....	26
I.2.2 Le virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).....	27
I.2.2.1 La structure du VIH-1	28
I.2.2.2 Cycle de réplication du VIH.....	29
I.2.3 Dendrimères et chimiothérapie du VIH-1	33
I.2.3.1 Le dendrimère : définition et structure.....	34
I.2.3.2 Interaction des dendrimères avec les systèmes biologiques	36
I.2.3.2.1 Le concept de multivalence	36
I.2.3.2.1.1 Effet cluster glycoside.....	37
I.2.3.2.1.2 Effet dendritique.....	37
I.2.3.2.2 Biocompatibilité	38
I.2.3.2.2.1 Cytotoxicité in vitro.....	39
I.2.3.2.2.2 Cytotoxicité in vivo	40
I.2.3.2.2.3 Immunogénicité.....	42
I.2.3.2.2.4 Biopermabilité.....	42
I.2.3.3 Inhibiteurs dendrimériques de reconnaissance et/ou fixation.....	42
I.2.3.3.1 Inhibiteurs de l'entrée du VIH dans les cellules hôtes.....	43
I.2.3.3.1.1 Interaction non spécifique de type électrostatique avec le VIH.....	43
I.2.3.3.1.2 Interaction spécifique avec le VIH.....	50
I.2.3.3.1.3 Interaction spécifique avec la cellule cible du VIH.....	59
I.2.3.3.2 Inhibiteur de fusion	68
I.2.3.4 Inhibiteurs du cycle de réplication.....	69
I.2.3.4.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	69
I.2.3.4.1.1 Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	69

<i>I.2.3.4.1.2 Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse.....</i>	<i>70</i>
<i>I.2.3.4.1.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse.....</i>	<i>71</i>
<i>I.2.3.4.1.4 Dendrimères comme pro-médicaments inhibiteurs de la transcriptase inverse.....</i>	<i>72</i>
<i>I.2.3.4.1.5 Vectorisation des inhibiteurs de la transcriptase inverse par les dendrimères.....</i>	<i>74</i>
<i>I.2.3.4.1.6 Dendrimères inhibiteurs de la transcriptase inverse.....</i>	<i>80</i>
<i>I.2.3.4.2 Inhibiteurs de l'intégrase</i>	<i>80</i>
<i>I.2.3.4.3 Inhibiteurs de la transcription</i>	<i>81</i>
<i>I.2.3.4.4 Inhibiteurs de la protéase.....</i>	<i>83</i>
<i>I.2.3.5 Thérapie génique anti-VIH.....</i>	<i>86</i>
I.3 CONCLUSION ET BUT DE CETTE THESE	87
I.4 BIBLIOGRAPHIE	90

I.1 Introduction

Le VIH s'attache à la surface de la cellule hôte (adhésion), puis il pénètre dans la cellule qu'il utilise pour la réplication de son ADN et la synthèse de ses protéines. Une façon de stopper l'infection consiste à bloquer un de ces processus.

Les stratégies antivirales sont généralement dirigées vers: (1) le mécanisme d'interaction entre le virus et leurs cellules cibles, (2) le cycle de réplication et (3) la désactivation de gènes du virus.

Parmi les nouvelles molécules en cours de développement, les dendrimères, 10 à 100 fois plus petits que la plupart des virus, peuvent être conçus pour interférer dans les processus d'adhésion virus-cellule hôte et inhiber l'infection dans l'étape d'entrée virale. Dans ce cas, trois mécanismes d'action sont mis en jeu : (1) le dendrimère interagit avec le virus de manière non spécifique, (2) le dendrimère s'attache spécifiquement à des composants viraux et, (3) le dendrimère s'attache aux récepteurs cellulaires spécifiques.

D'autres stratégies antivirales emploient les dendrimères en tant qu'inhibiteurs d'enzymes virales et visent directement les étapes du cycle de réplication. Dans ce cas, les dendrimères sont utilisés comme agents de transport, soit avec le principe actif attaché à lui (promédicament), soit en encapsulant le principe actif à leur intérieur. Cette utilisation du dendrimère améliore l'efficacité et diminue la toxicité du principe actif. Enfin, il existe d'autres approches thérapeutiques qui utilisent les dendrimères pour la thérapie génique.⁽¹⁻⁴⁾



Figure I.1 Stratégies de la thérapie anti-VIH

I.2 Thérapie anti-VIH

I.2.1 Le SIDA

Le SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquisée) est une maladie infectieuse, virale et chronique caractérisée par la diminution des moyens de défense de l'organisme. Cela entraîne l'apparition de maladies opportunistes qui sont appelées ainsi car elles se développent en profitant de l'incapacité du système immunitaire d'une personne malade à se défendre. Ces maladies sont généralement infectieuses ou cancéreuses, elles affaibliront encore plus l'organisme atteint.

En 1983, F. Barré-Sinoussi et L. Montagnier,⁽⁵⁾ découvrent et isolent l'agent responsable de cette maladie : le VIH (Virus de l'Immunodéficiency Humaine). Ce virus attaque principalement les cellules T CD4(+) (les lymphocytes T4 et les macrophages) du système immunitaire humain et l'affaiblit en quelques années. Il est transmis par plusieurs fluides corporels : le sang, les sécrétions vaginales, le sperme ou le lait maternel.⁽⁶⁾ Le SIDA est aujourd'hui considéré comme une pandémie.

Depuis le début de l'épidémie,⁽⁷⁾ près de 60 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 25 millions de personnes sont décédées de causes liées au VIH.

En 2008, on dénombre 33,4 millions de personnes vivant avec le VIH, 2,7 millions de nouvelles infections et 2 millions de décès liés au SIDA. Environ 430.000 enfants sont nés avec le VIH, ce qui porte à 2,1 millions le nombre total d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH.

Les jeunes représentent environ 40% de l'ensemble des infections par le VIH dans le monde.

L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée et abrite 67% de l'ensemble des personnes vivant avec le VIH dans le monde et 91% du total des nouvelles infections chez l'enfant. Le nombre de nouvelles infections par le VIH continue à devancer le nombre de personnes sous traitement. Pour deux personnes entamant un traitement, cinq sont infectées par le virus.

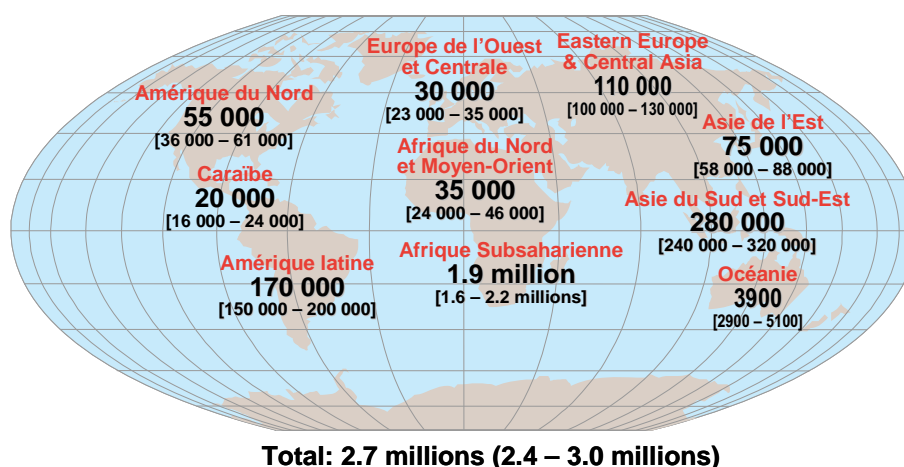


Figure I.2 Nombre estimé des nouvelles infections chez les adultes et chez les enfants par le VIH, 2008

(www.unaids.org)

Actuellement, aucun vaccin n'est disponible pour se protéger du VIH. Bien qu'ayant une certaine efficacité, les traitements antiviraux employés ne permettent que de ralentir la prolifération du virus.

I.2.2 Le virus d'Immunodéficience Humaine (VIH)

Le VIH est un rétrovirus à ARN de la famille *Retroviridae*, genre *lentivirus* qui se caractérise par une longue période d'incubation et donc par une évolution lente de la maladie.

Il existe deux espèces de VIH: le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-2, également isolé par le groupe du Professeur Montagnier en 1986, a seulement 40% d'homologie avec le VIH-1 en se différenciant surtout par son enveloppe externe. Il est plus proche du virus de l'immunodéficience du singe (VIS) que du VIH-1.⁽⁸⁾ Il est principalement localisé en Afrique de l'Ouest.

D'autre part, les souches de type VIH-1 sont classées en deux grands groupes : M et O. Le groupe M est divisé à la fois en 9 sous-types qui peuvent être corrélés à des zones géographiques : A, B, C, D, E, F, G, H et NT (Figure I.3). Cette variabilité énorme du VIH-1 est due au manque de fidélité de la transcriptase inverse. Elle produit des erreurs pour chaque 2000-5000 nucléotides polymérisés.⁽⁹⁾ La plupart des mutations se produisent dans la région C2-V3 de la glycoprotéine virale et dans les protéines de la capside. De plus, le taux de réplication du virus est d'environ 10^{10} particules virales par jour.^(10, 11) Pour ces raisons, la transcriptase inverse (TI) est une des principales cibles thérapeutiques anti-VIH.

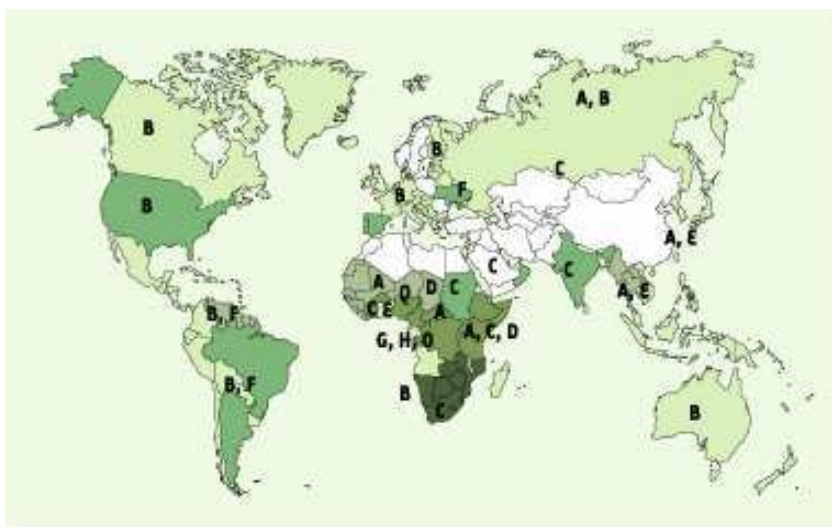


Figure I.3 Répartition géographique mondiale des sous-types du VIH-1 (www.edk.fr)

I.2.2.1 La structure du VIH-1

Pour envisager et développer des stratégies thérapeutiques, il est nécessaire tout d'abord de comprendre la complexité structurale du VIH et sa pathogenèse. Gelderblom *et al.* ont été les premiers à établir la morphologie et la structure du VIH-1 par microscopie électronique (Figure I.4).⁽¹²⁾

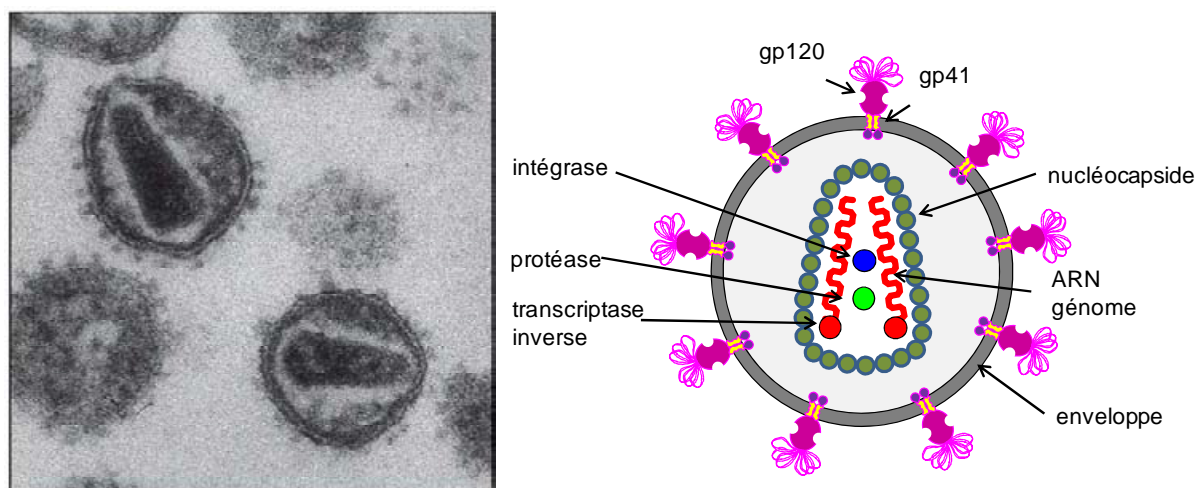


Figure I.4 Structure du VIH

Le virus mature du VIH-1 a un aspect sphérique d'un diamètre d'environ 90 à 120 nm. Il comporte une enveloppe membranaire composée des restes de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée. Cette enveloppe est recouverte de deux types de glycoprotéines : la gp41 ou glycoprotéine transmembranaire (partie interne) et la gp120 (partie externe). La protéine gp41 est liée de façon non-covalente à la glycoprotéine gp120 extérieure.⁽¹²⁾ Le complexe gp120/gp41 apparaît à la surface comme un hétérotrimère. La gp120 et la gp41 sont des cibles importantes pour les stratégies thérapeutiques. En effet, la gp120 participe à la reconnaissance et à l'ancrage du virus dans la cellule hôte et la gp41 a un rôle clef dans le processus de fusion entre le virus et les cellules cibles.⁽¹³⁾

A l'intérieur de l'enveloppe se trouve une matrice composée de protéines p17, et la capsid virale qui est composée par des protéines p24. La nucléocapside en forme de cône tronqué est formée, quant à elle, de protéines p6 et p7.

Finalement, le génome du VIH contenu dans la nucléocapside est constitué d'un simple brin d'ARN en double exemplaire, accompagné d'enzymes qui :

- transcrivent l'ARN viral en ADN viral (transcriptase inverse, TI)
- intègrent l'ADN viral à l'ADN cellulaire (intégrase, IN)

- participent à l'assemblage du virus (protéase, PR).

Ces trois enzymes sont des cibles potentielles pour la chimiothérapie antirétrovirale.

Le génome viral est composé de neuf gènes. Les trois principaux sont des gènes structurels communs à tous les rétrovirus : *gag* (code pour les protéines structurales de la matrice, de la capsid, de la nucléocapsid), *pol* (pour POLymérase, code pour les enzymes virales : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase) et *env* (pour ENVeloppe, code pour les protéines d'enveloppe, les glycoprotéines transmembranaires et de surface). Ces gènes produisent des précurseurs sous la forme de poly-protéines qui deviennent fonctionnelles grâce à l'action de la protéase.^(14, 15) Les six autres gènes sont *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*, qui codent des protéines régulatrices.

I.2.2.2 Cycle de réplication du VIH

Le VIH a besoin de pénétrer la cellule hôte pour pouvoir se répliquer. Le mécanisme de réplication du VIH peut être résumé en six étapes principales (Figure I.5). Chaque étape constitue donc une cible potentielle pour développer des stratégies thérapeutiques.

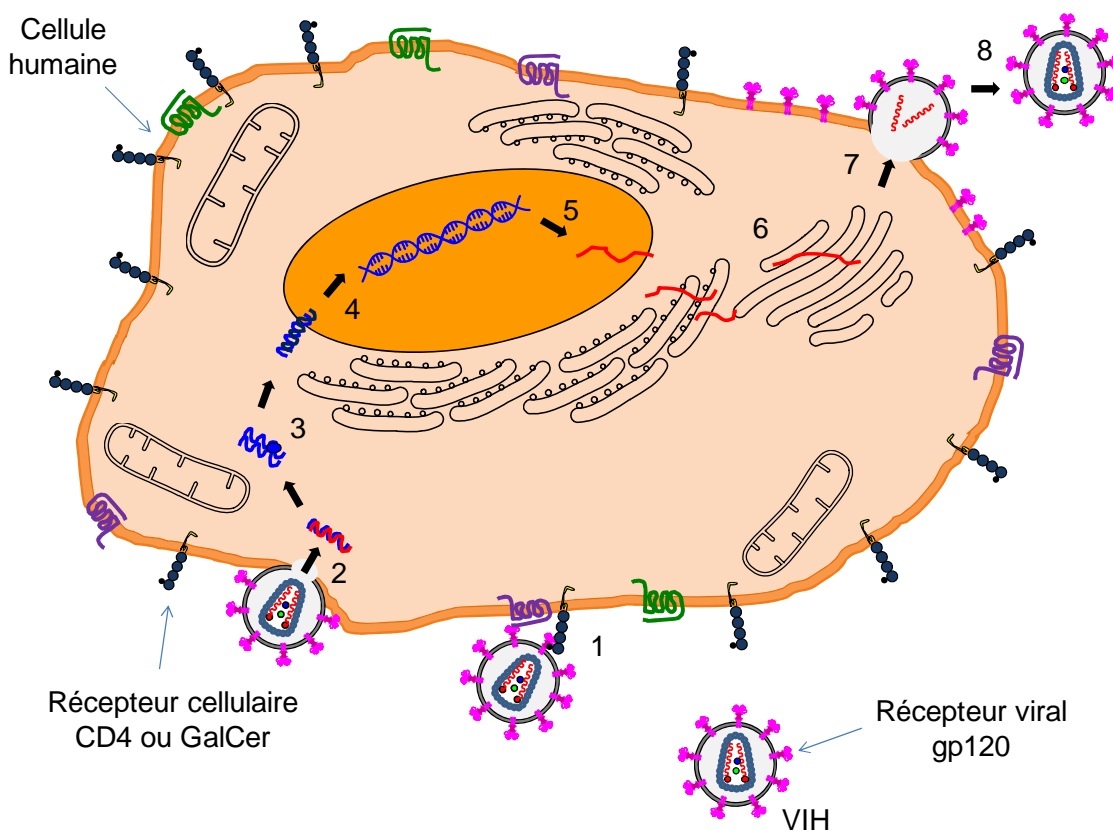
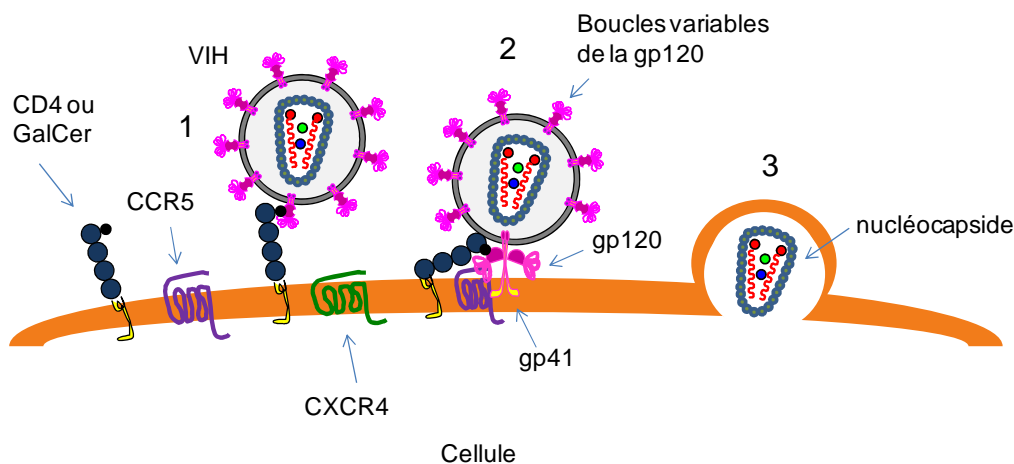


Figure I.5 Cycle de réplication du VIH

1. L'entrée virale

L'entrée virale est un processus complexe qui se déroule en plusieurs sous-étapes : (1) la fixation de la gp120 au récepteur CD4, (2) l'interaction des corécepteurs et (3) la fusion (Figure I.6).



(1) Fixation de la gp120 au récepteur CD4. (2) Fixation d'une boucle variable de la gp120 au corécepteur et fixation de la gp41 sur la membrane cellulaire. (3) Pénétration dans la cellule

Figure I.6 Processus d'attachement du VIH

Le VIH-1 cible particulièrement les lymphocytes T CD4(+), les macrophages et des cellules du système nerveux (les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales).⁽¹⁶⁾ Ainsi, la réplication virale a lieu dans plusieurs tissus.

Cette étape repose sur une reconnaissance entre la glycoprotéine de surface virale, gp120, et les récepteurs présents sur la cellule cible.⁽¹⁷⁾

Les récepteurs et corécepteurs cellulaires les plus courants sont :

(1) le CD4, présent sur la membrane cellulaire des lymphocytes T4 et des macrophages.⁽¹⁶⁾ Le CD4 interagit tout d'abord avec la gp120 où la boucle V3 a un rôle clef dans ce processus de reconnaissance.⁽¹⁸⁾

(2) des récepteurs de chimiokine, le CXCR4 et le CCR5, qui favorisent l'entrée du VIH-1 dans les lymphocytes, les monocytes et les macrophages.⁽¹⁹⁾ Ces corécepteurs vont également interagir avec la gp120 au niveau de la boucle V3 afin de renforcer l'interaction virus-cellule après fixation de la gp120 sur le CD4.

(3) le galactosylcéramide (GalCer), présent à la surface des cellules nerveuses, des cellules épithéliales du colon et des fibroblastes.⁽²⁰⁾ Ce récepteur glycosphingolipidique a aussi une affinité très prononcée pour la boucle V3 de la gp120.⁽²¹⁾

La stratégie antivirale développée dans ces travaux de thèse repose sur la conception d'analogues synthétiques du GalCer. En effet, ces analogues vont reconnaître et saturer la boucle V3 de la gp120. En conséquence, la boucle V3 ainsi bloquée ne peut pas interagir avec le récepteur cellulaire GalCer ni avec le récepteur CD4. De cette façon, cette stratégie permet de stopper l'infection par le VIH sur des cellules GalCer(+) et CD4(+) (Figure I.7).

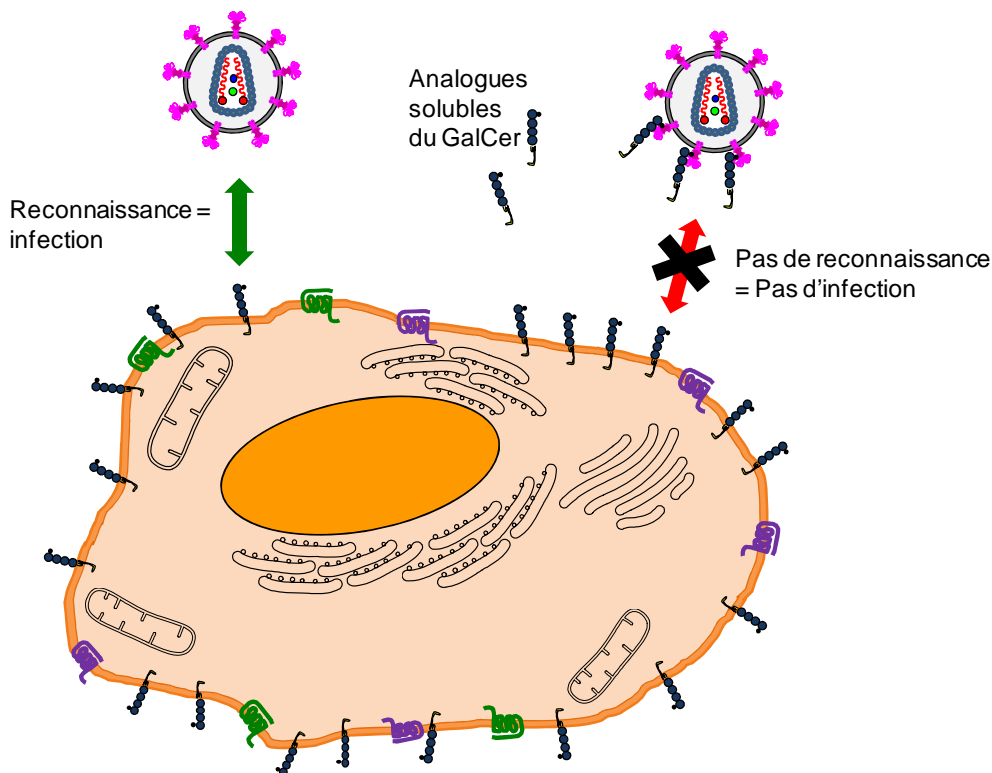


Figure I.7 Stratégie anti-VIH en employant des analogues solubles du GalCer

Après l'union avec un récepteur viral, la gp120 change de conformation et est attirée vers un corécepteur. Cette union libère la glycoprotéine gp41 qui se fixe sur la membrane plasmique. Puis la gp41 se replie sur elle-même et attire l'enveloppe virale vers la membrane plasmique en provoquant la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire grâce à un peptide de fusion présent dans la gp41. La nucléocapside virale pénètre alors à l'intérieur de la cellule hôte et les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contenait se libèrent par décapsidation.

2. Rétrotranscription

Cette étape est spécifique aux rétrovirus qui ont pour génome l'ARN. L'ARN viral doit donc être converti en ADN viral car seul l'ADN peut être intégré dans le génome de la cellule cible. Cette opération est réalisée par la transcriptase inverse (TI). Puis la TI synthétise le second brin d'ADN, le brin(+), en utilisant l'ADN brin(-) comme matrice. L'ADN final est une molécule bicaténaire aussi dénommée ADN à double-brins.

3. Intégration

À ce moment du cycle, l'ADN double-brins forme un complexe de pré-intégration avec l'intégrase et d'autres composants protéiques viraux et cellulaires. Ce complexe interagit avec la membrane nucléaire, pour la traverser et accéder à la chromatine cellulaire. L'ADN s'intègre ensuite au hasard dans le génome de la cellule cible grâce à l'action de l'intégrase.

4. Transcription

L'ARN polymérase écarte localement les deux brins d'ADN de la cellule. L'ARNm (messager) est ensuite synthétisé sous forme d'une chaîne monobrin par la polymérisation des bases azotées libres du noyau qui viennent former la séquence complémentaire. Cet ARNm est hétérogène puisqu'il est constitué d'une succession d'introns (parties non codantes) et d'exons (partie codantes). Cet ARNm doit donc subir une maturation pour pouvoir être lu par les ribosomes. Les introns sont donc éliminés par excision pour ne laisser que les exons.

5. Traduction

L'ARNm sort du noyau par les pores nucléaires puis est lu par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux. Pour cela, il se glisse entre les deux sous-unités du ribosome. Le ribosome attribue un acide aminé à chaque codon (groupe de trois nucléotides) de l'ARNm. De cette façon a lieu la synthèse des éléments viraux comme les poly-protéines *gag*, *gag-pol* et *env* et les protéines fonctionnelles *tat*, *nef* et *rev*. Ces polypeptides ainsi formés ne sont pas encore opérationnels. Ils doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi.

6, 7, 8. Assemblage, maturation et bourgeonnement

Lorsque les poly-protéines sortent de l'appareil de Golgi, l'ARN viral et les protéines virales *gag* et *gag-pol* sont assemblés dans des particules virales immatures au niveau de la membrane cellulaire et partiellement libérés par bourgeonnement. Ces particules vont subir un processus de maturation et vont devenir infectieuses grâce à l'action de la **protéase**. Elle doit couper les liens qui unissent les différentes protéines de structure *gag* et *gag-pol* qui elles-mêmes vont être transformées dans la matrice, la capsid et la nucléocapsid.

La maturation se produit durant l'assemblage des composants viraux à la surface de la membrane cellulaire humaine et/ou après le bourgeonnement des particules virales dans le milieu extracellulaire.

D'autre part, il existe un autre processus associé au VIH qui permet la propagation de l'infection de cellule à cellule. En effet, les cellules humaines infectées par le VIH expriment les glycoprotéines virales à leur surface. En conséquence, ces cellules ont de l'affinité pour les cellules saines qui comportent des récepteurs CD4. Puis elles fusionnent en formant des cellules géantes à plusieurs noyaux nommées *syncytia*.⁽¹³⁵⁾

I.2.3 Dendrimères et chimiothérapie du VIH-1

Pour empêcher l'infection par le VIH il est nécessaire de bloquer au moins une de ces étapes. Les premiers antirétroviraux développés ont eu pour cibles la transcriptase inverse et la protéase.⁽²²⁾ Ces médicaments ont été employés en monothérapie (un seul principe actif). Malheureusement, ce traitement a provoqué l'apparition de résistances du virus aux principes actifs et ⁽²³⁾ a été remplacé par des polythérapies (HAART, Highly Active Antiretroviral Treatment) qui consistent en l'administration de plusieurs principes actifs appartenant à plusieurs classes d'antirétroviraux.

A ce jour, la polythérapie est la meilleure méthode pour lutter contre le VIH. Cette stratégie a permis de diminuer le nombre de morts causés par le VIH et d'augmenter l'espérance de vie des personnes infectées.⁽²⁴⁾

Par contre, de nombreux inconvénients sont associés à cette thérapie : les traitements sont sévères et toxiques, d'importants effets secondaires apparaissent et la résistance du virus aux médicaments augmente à cause de l'élimination incomplète du VIH.⁽²⁵⁾ C'est pourquoi d'autres cibles thérapeutiques sont aujourd'hui à l'étude comme les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs de fusion et même les inhibiteurs de maturation.

Nous allons maintenant présenter une mise au point bibliographique sur le rôle des dendrimères pour les thérapies anti-VIH et sur quelques principes actifs utilisés actuellement en polythérapie. Ces composés seront présentés en suivant chaque étape du cycle de réplication du VIH.

Quelques paramètres biologiques sont nécessaires pour caractériser l'activité antivirale *in vitro* :

- **CI_{50} concentration inhibitrice à 50%** est la concentration minimale en composé nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'un marqueur du virus (par exemple, la transcriptase inverse). *Plus la valeur de la CI_{50} est faible, plus le composé est actif.*

- **RCI_{50} , concentration inhibitrice normalisée** est la concentration inhibitrice minimale en composé multivalent nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'un marqueur viral multipliée par le nombre de sites actifs de ce composé, N . $RCI_{50} = N \times CI_{50}$.
- **CC_{50} , concentration cytotoxique à 50%** est la concentration létale en composé pour 50% des cellules non infectées par le virus. *Plus la valeur de la CC_{50} est élevée, moins le composé est toxique.*
- **IT , indice thérapeutique** est le rapport entre la toxicité et l'activité inhibitrice (CC_{50}/CI_{50}). *Plus la valeur d' IT est élevée, plus le produit est efficace et sélectif.*

I.2.3.1 Le dendrimère : définition et structure

Les dendrimères sont des macromolécules à caractéristiques structurales et topologiques uniques,^(26, 27) avec une architecture tridimensionnelle multibranchée, parfaitement définie et une fonctionnalité élevée.

Les six paramètres structuraux qui caractérisent la structure dendritique sont (Figure I.8) : le cœur, les motifs connecteurs, les points de divergence, la génération, les groupes terminaux et la périphérie.

Le cœur est le point focal des motifs connecteurs. Des points de divergence sont associés à chaque couche pour incrémenter la génération du dendrimère. Le nombre de groupes terminaux localisés à la périphérie du dendrimère dépend de la multivalence du cœur et des points de divergence (nommés respectivement N_c et N_d). Il dépend aussi du nombre de génération (G) et est égal à $N_c N_d^G$. La périphérie est l'espace entre le dernier point de divergence et la surface.

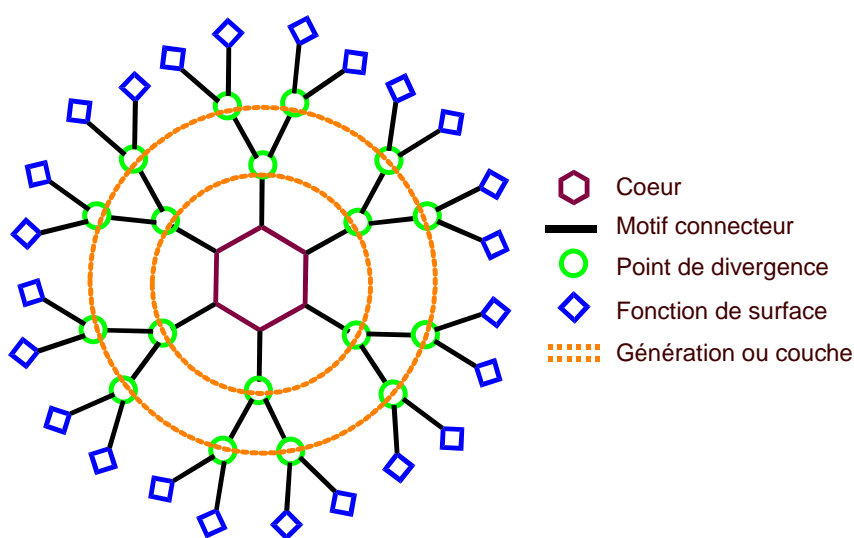


Figure I.8 Structure dendritique

Par ailleurs, on peut trouver trois parties topologiques d'intérêt :

(1) Un *cœur central*, constitué par des atomes, des petites ou même de grandes molécules organiques (macrocycles) et d'intérêt biologique (carbohydrates, acides aminés et nucléotides). Il possède des propriétés particulières car il est entouré d'un environnement formé par des branches dendritiques.

(2) Le squelette, comprenant plusieurs *générations* ou couches intérieures composées par la répétition des unités pouvant fournir un espace flexible avec des cavités, ce qui permet d'encapsuler des molécules hôtes de taille raisonnable.

(3) La *surface multivalente* qui peut contenir un grand nombre de fonctions capables d'interagir avec l'environnement externe. Elles définissent souvent les propriétés macroscopiques du dendrimère.⁽²⁸⁾

La nature originale des dendrimères n'est pas seulement due à leur morphologie. À hautes générations, l'encombrement stérique des branches à la surface des molécules dendritiques leur permet d'adopter des conformations globulaires.^(29, 30) Les extrémités des branches peuvent s'allonger vers la surface ou se replier à l'intérieur. Ces arrangements sont souvent déterminés par plusieurs facteurs comme la nature du solvant ou la constitution du dendrimère. Quand les extrémités des branches sont placées sur la surface du dendrimère, les modèles moléculaires montrent que le dendrimère contient des cavités et des chenaux.^(31, 32) Malgré la nature dynamique de ces cavités, elles ont un microenvironnement qui leur permet d'être utilisées pour l'encapsulation de molécules hôtes.⁽³³⁾

La première synthèse de dendrimères a été réalisée par Vögtle *et al.*⁽³⁴⁻³⁷⁾ à la fin des années 1970. En 1993, Mülhaupt *et al.*⁽³⁶⁾ et Meijer *et al.*⁽³⁷⁾ ont poursuivi simultanément les travaux commencés par Vögtle, et ont décrit la préparation des dendrimères *poly(propylèneimine)* (PPI) à cœur diaminobutane (aussi nommés dendrimères DAB).⁽³⁸⁾

En 1981, Denkewalter *et al.* ont synthétisé des composés macromoléculaires formés par des unités de lysine sur au moins quatre couches successives. Plus tard, ils seront nommés dendrimères *poly-L-lysine*.⁽³⁹⁾

Le groupe de Tomalia^(26, 40-43) a décrit une voie synthétique afin d'obtenir des macromolécules polyamidoamine (PAMAM) branchées en forme d'étoile, aussi appelées dendrimères *starburst*. Tomalia est le premier à employer le terme « dendrimère » qui vient du mot grec *dendros* = *arbre* et qui est aujourd'hui universellement utilisé pour décrire les composés macromoléculaires monodisperses hautement hyperbranchés.

Parallèlement, Newkome *et al.*⁽²⁹⁾ ont développé une série de composés moléculaires très hautement branchés, où chaque génération a une constitution différente. Ils ont utilisé des atomes

de carbone tétraédriques comme le pentaérythritol pour obtenir des structures compactes de type « arborol » (*arbor* = branche). Ces molécules ont été fonctionnalisées avec des groupes hydroxyles à la surface.

On peut également citer deux avancées importantes : en 1990, Fréchet *et al.* ont introduit un nouveau type de dendrimère avec un squelette polyéther.⁽⁴⁴⁾ Puis en 1994, Caminade et Majoral ont été les premiers à concevoir la synthèse de dendrimères phosphorés neutres.⁽⁴⁵⁾

I.2.3.2 Interaction des dendrimères avec les systèmes biologiques

I.2.3.2.1 Le concept de multivalence

Dans la nature, la plupart des processus de reconnaissance entre systèmes naturels sont multivalents.⁽⁴⁶⁾ Par exemple, des anticorps bivalents s'attachent spécifiquement aux antigènes. De même, le virus influenza adhère aux cellules hôtes pour les infecter par des interactions multivalentes entre l'hémagglutinine trimérique virale et les résidus carbohydrates avec des fonctions acide sialique dans la surface de la cellule hôte.⁽⁴⁶⁾

La nature emploie ces interactions multivalentes quand l'affinité d'un ligand monovalent pour son récepteur est faible. Dans ce cas, l'augmentation des sites de reconnaissance dans un environnement restreint augmente l'affinité du ligand polyvalent avec le récepteur de façon significative.⁽⁴⁷⁾ L'amélioration synergique de l'activité grâce à la multivalence est appelée « effet multivalent » (Figure I.9).

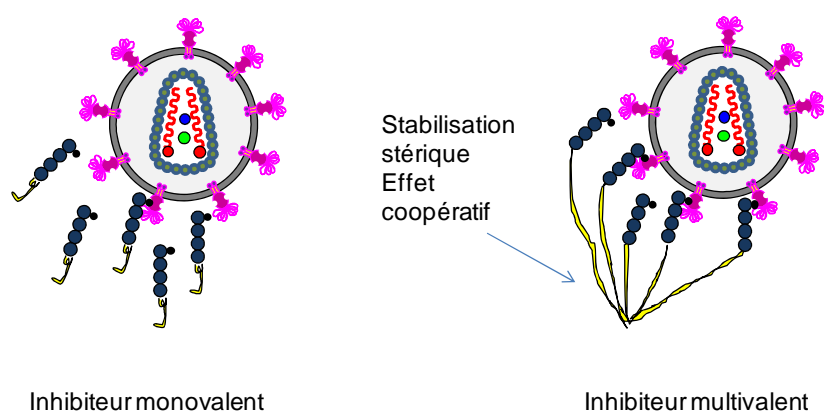


Figure I.9 Effet multivalent des inhibiteurs multivalents

Cela peut être expliqué en termes thermodynamiques.⁽⁴⁸⁾ Quand a lieu la première interaction avec une des branches du ligand bivalent, les degrés de liberté diminuent et l'interaction de la deuxième branche est favorisée thermodynamiquement, grâce à un effet « chélate ».

I.2.3.2.1.1 Effet cluster glycoside

Les reconnaissances spécifiques protéine/carbohydate sont impliquées dans de nombreux événements biologiques, par exemple, les interactions virus/cellule et bactérie/cellule. La surface de la plupart des cellules est recouverte avec des oligosaccharides qui sont liés à des protéines ou à des lipides transmembranaires. D'autre part, les processus biologiques nécessitent des affinités élevées et sélectives et il est bien connu qu'individuellement, l'interaction protéine/sucre possède des constantes d'affinité faibles et une basse sélectivité.⁽⁴⁹⁾

Comme nous venons de le voir, la réponse naturelle à ce problème est l'utilisation des interactions multivalentes.⁽⁴⁶⁾ Pour cela, les sucres sont organisés à la surface cellulaire en réseaux de glycoprotéines ou en plaques de glycolipides. Ces réseaux reconnaissent des complexes protéiques membranaires multi-sites qui sont sur la surface d'une cellule envahissante (virus, bactérie, etc.). Ces interactions individuelles de surface sont renforcées grâce à la multiplication des interactions ce qui induit la clusterisation des récepteurs. Cet effet synergique est appelé « effet cluster glycoside »,⁽⁵⁰⁾ et il est souvent à l'origine de modifications métaboliques.

Les architectures dendritiques offrent le même type d'effet coopératif. Par exemple la toxine de type Shiga (SLT) est une exotoxine d'*E. Coli*. Elle est responsable du syndrome hémolytique et urémique (HUS) qui conduit à un dysfonctionnement rénal. Des études d'interactions entre le système STL et des dendrimères à terminaisons acides sialiques avec une surface hautement multivalente ont montré une très bonne affinité de ces dendrimères multivalents pour la toxine. Ces dendrimères ont un effet thérapeutique potentiel dans le traitement de l'infection provoqué par cette toxine.⁽⁵¹⁾

I.2.3.2.1.2 Effet dendritique

Cet effet est seulement observé avec les systèmes dendritiques, pas avec les systèmes polymériques. Il s'agit de la variation non linéaire d'une propriété en fonction de la génération (et donc du nombre de fonctions de surface). La présence d'un nombre élevé de fonctions de surface sur la structure dendritique peut générer plusieurs effets spatiaux comme des interactions allostériques positives ou négatives. Des effets dendritiques positifs ou négatifs ont aussi été observés avec des catalyseurs dendritiques, mais ils sont plus difficiles à expliquer. Par exemple, la

conversion de l'isomérisation du 1-octen-2-ol en octan-3-one catalysée par un complexe de ruthénium est respectivement de 38% pour le monomère et de 98% pour le dendrimère phosphoré de troisième génération à terminaisons PTA-Ru(*p*-cymène)Cl₂. L'efficacité catalytique augmente avec la génération en provoquant un fort effet dendritique positif.⁽⁵²⁾

La multiplicité des groupes de surface peut aussi améliorer l'affinité de molécules hôtes, par exemple, Astruc *et al.* ont constaté un effet dendritique considérable pour la reconnaissance d'anions chlorure à la surface des dendrimères polyamidoferricinium.⁽⁵³⁾ Le dendrimère de génération 2 a une affinité 10 fois supérieure pour l'anion chlorure que son analogue de génération 1, ce dernier étant 10 fois plus actif que le dendrimère de génération 0. En effet, les études par spectrométrie de RMN montrent que l'environnement plus congestionné du dendrimère de deuxième génération force les branches à adopter une taille de cavité plus optimale pour améliorer la reconnaissance de l'anion chlorure.

Parmi les paramètres qui jouent un rôle important dans les interactions des ligands multivalents, on peut inclure : la forme, l'orientation des sites actifs, la flexibilité, la taille et la valence. Toutes ces propriétés influent dans le mécanisme d'action et dans l'activité biologique du ligand. Ainsi, les dendrimères sont parfaitement adaptés pour offrir de la multivalence synergique dans un espace bien défini.

1.2.3.2.2 Biocompatibilité

Afin d'utiliser les dendrimères dans des applications biomédicales, ils doivent satisfaire à un minimum de conditions à différents niveaux biologiques.⁽⁵⁴⁾ Ils doivent être :

- non toxiques,
- non immunogènes (sauf pour leur utilisation comme vaccins),
- capables de traverser les barrières biologiques comme l'intestin, les barrières sang/tissu, les membranes cellulaires...
- capables de rester le temps de séjour nécessaire pour avoir un effet clinique,
- capables de cibler des structures spécifiques.

Quand les dendrimères sont utilisés comme médicaments ou comme molécules transporteuses de médicaments ou de gènes *in vivo*, ils doivent aussi avoir une biodistribution appropriée et présenter un niveau de perméabilité combiné avec une bonne tolérance à l'attaque enzymatique dans le flux sanguin.

I.2.3.2.2.1 Cytotoxicité *in vitro*

Pour les applications biomédicales, les dendrimères doivent avoir une solubilité élevée en milieu aqueux. La cytotoxicité des dendrimères à court terme est principalement déterminée par la nature des fonctions de surface. Selon les fonctions de surface solubilisantes dans l'eau, les dendrimères peuvent se classer en trois catégories : cationiques, anioniques, et hydrophiles neutres.

Dendrimères cationiques

Les dendrimères à surface cationique, comme la plupart des macromolécules cationiques linéaires, déstabilisent la membrane cellulaire. La cytotoxicité des dendrimères cationiques est proportionnelle à leur capacité à exposer leur surface cationique et au degré de substitution des amines, les amines primaires rendent le dendrimère plus toxique que les amines tertiaires. De plus, la cytotoxicité *in vitro* des dendrimères PAMAM et PPI dépend de la génération et de la dose administrée, c'est-à-dire, de la taille et de la quantité.⁽⁵⁵⁾ Cela est en accord avec le fait que la cytotoxicité des poly-cations dépend de leur poids moléculaire. Par exemple Roberts *et al.* ont étudié la cytotoxicité *in vitro* des dendrimères PAMAM de générations 3, 5 et 7.⁽⁵⁶⁾ Seul le dendrimère de génération 7 est toxique.

Un autre exemple est l'étude de l'effet hémolytique des dendrimères PAMAM à terminaisons amine dans une solution de cellules sanguines de rat. De nouveau, cette étude a montré que la cytotoxicité de ces dendrimères dépend aussi de la génération.⁽⁵⁷⁾ Ces dendrimères sont également cytotoxiques pour les cellules intestinales humaines Caco-2 adenocarcinome.^(58, 59) Cependant, les dendrimères PAMAM avec une surface amine ont une toxicité inférieure aux polymères linéaires fonctionnalisés avec des groupes amines et de même poids moléculaire. Cela est la conséquence probable de la rigidité globulaire des dendrimères qui réduit leur adhésion à la surface de la cellule.⁽⁶⁰⁾

D'autre part, la nature du groupe cationique à la surface du dendrimère modifie aussi sa cytotoxicité. Ainsi, des dendrimères phosphorés de générations 1 à 5 à terminaisons ammonium ont été employés comme agents de transfection. Cette série de dendrimères a un faible effet toxique, inférieur à celui de la lipofectine (un standard utilisé dans les expériences de transfection).⁽⁶¹⁾ De plus, les mesures de cytotoxicité de trois dendrimères phosphorés de génération 4 à terminaisons respectivement pyrrolidine, morpholine et méthylpipérazine sur des cellules humaines saines HUVEC et deux types de cellules cancéreuses HeLa et HEK 293, ont montré que les dérivés pyrrolidine et morpholine ne sont pas toxiques tandis que le dérivé méthylpipérazine est plus toxique sur des cellules saines et favorise la prolifération des cellules cancéreuses.⁽⁶²⁾

Par ailleurs, la cytotoxicité des dendrimères poly-cationiques diminue quand ils sont complexés avec des brins d'ADN ou d'ARN. La charge totale du dendriplexe reste positive mais sa toxicité est

inférieure à celle du dendrimère non complexé. Les brins d'ADN ou d'ARN masquent partiellement la surface chargée positivement du dendrimère.^(55, 63, 64)

Dendrimères anioniques

Contrairement aux dendrimères cationiques, les dendrimères anioniques sont peu ou non toxiques. Par exemple, les dendrimères PAMAM avec des groupes anioniques à leur surface ont une cytotoxicité très inférieure sur les cellules Caco-2 à celle des dendrimères cationiques.⁽⁵⁸⁾ En fait, ces dendrimères n'ont aucune activité hémolytique ni cytotoxique pour une grande gamme de concentrations.⁽⁵⁷⁾

Cependant, certains dendrimères avec des motifs polyéther aromatiques et des groupes carboxylates à la surface présentent une activité hémolytique contre les cellules sanguines de rat. Dans ce cas, le contact hydrophobe entre l'intérieur aromatique du dendrimère et la membrane pourrait causer l'hémolyse. Les dendrimères de générations élevées ont une structure relativement plus ouverte, et donc plus toxique. Cet exemple met en avant que la nature du squelette dendritique peut avoir un effet toxique.⁽⁶⁵⁾

Dendrimères neutres

La surface des dendrimères peut être modifiée pour qu'ils puissent être neutres et solubles dans l'eau. Par exemple, l'introduction de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG), à la surface des dendrimères ioniques réduit leur cytotoxicité car ces chaînes masquent leur surface ionique et de cette façon empêchent les interactions ioniques avec les membranes cellulaires.^(19, 66)

La cytotoxicité des dendrimères PAMAM a été réduite par neutralisation de leur surface. Park *et al.* ont synthétisé des dendrimères PAMAM quaternisés à l'intérieur ayant des groupes hydroxyle à la périphérie. Ces composés sont moins toxiques que les dendrimères PAMAM non modifiés et les dendrimères PEI.⁽⁶⁷⁾

De la même façon, la cytotoxicité des dendrimères PPI est négligeable quand la surface de ces dendrimères est modifiée avec le *t*-Boc-glycine ou le mannose.⁽⁶⁸⁾

I.2.3.2.2 Cytotoxicité *in vivo*

Les profils de toxicité *in vivo* d'un dendrimère sont liés à sa structure, à sa taille et sa génération, à son temps de séjour, à sa biodistribution et à son métabolisme. La toxicité *in vivo* est aussi influencée par la nature des groupes superficiels du dendrimère. Ainsi, les dendrimères cationiques

introduits dans le système sanguin sont capables d'interagir avec les composants du sang, de déstabiliser les membranes et provoquer la lyse des cellules.⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾

La tendance générale de l'augmentation de la cytotoxicité *in vitro* avec la taille du dendrimère est confirmée *in vivo*. Ainsi, Roberts *et al.* ont étudié la toxicité des dendrimères PAMAM cationiques de générations 3, 5 et 7 chez les souris.⁽⁵⁶⁾ Les souris traitées avec les dendrimères de génération 3 et 5 ne montrent pas un comportement anormal ou une perte de poids. Par contre, une souris sur cinq est morte après 24h quand elle est traitée avec 45 mg/kg de dendrimère de génération 7.

D'autre part, Heiden *et al.* ont trouvé que les dendrimères PAMAM de génération 4 à terminaisons amine sont toxiques chez les embryons de danio rerio (petit poisson) en fonction de la dose et du temps de séjour.⁽⁷²⁾ A des concentrations supérieures à 20 μ M, tous les embryons sont morts après 24h. Cependant, les dendrimères PAMAM anioniques de génération 3,5 à terminaisons acide carboxylique ne sont pas toxiques et ils n'affectent pas le développement des embryons. Par ailleurs, le dendrimère PAMAM de génération 4 conjugué au peptide Arg-Gly-Asp est moins toxique que celui non conjugué.

Une autre étude menée par Malik *et al.* montre que des souris porteuses des tumeurs B16F10 traitées avec une dose de 95 mg/kg par jour du dendrimère PAMAM de génération 3,5 à terminaisons acide carboxylique ne souffrent d'aucune anomalie.⁽⁷³⁾

Ces études indiquent que la toxicité *in vivo* du dendrimère dépend fortement de sa génération et de son dosage. S'ils sont élevés, les dendrimères deviennent plus toxiques *in vivo*. La nature des groupes de surface a aussi une grande influence. Par exemple, les dendrimères à terminaisons anioniques sont moins toxiques que ceux à terminaisons cationiques.

Le profil toxicologique d'un dendrimère PPI de génération 5 et de ses dérivés fonctionnalisés avec t-Boc-glycine, mannose ou tuftsine a été évalué chez les rats Wistar. Le dendrimère PPI non modifié provoque de forts dommages dans plusieurs tissus du corps, spécialement dans le foie. Par contre, il n'y a pas de signaux de toxicité chez les animaux traités avec les dendrimères PPI fonctionnalisés. Cela indique que le masquage des charges positives du dendrimère PPI réduit sa toxicité *in vivo* et augmente sa biocompatibilité.⁽⁷⁴⁾

Les dendrimères polyester à terminaisons hydroxyle ou méthoxyle ne sont toxiques ni *in vitro* ni *in vivo*.⁽⁷⁵⁾ Ces motifs dendritiques sont des systèmes de vectorisation prometteurs car ils sont aussi biodégradables. Ils pourraient être dégradés par les enzymes après relargage du médicament. Cependant, la cytotoxicité *in vivo* du dendrimère à long terme peut être causée par ses produits de décomposition.

I.2.3.2.3 Immunogénicité

L'antigénicité d'un composé est son aptitude à être reconnu par le système immunitaire et l'immunogénicité est la capacité d'un antigène à provoquer une réponse immunitaire. Ainsi, l'immunogénicité et l'antigénicité des dendrimères peuvent être réduites par des modifications de leur surface, par exemple les chaînes de PEG⁽⁵⁸⁾ empêchent le dendrimère d'être reconnu par le système immunitaire, ce qui réduit leur antigénicité et augmente le temps de séjour dans le plasma par rapport aux dendrimères PAMAM non modifiés.^(76,77)

Un autre exemple concerne cinq dendrimères PPI de génération 5, un PPI non modifié et des dendrimères PPI fonctionnalisés respectivement avec mannose, lactose, t-Boc-glycine, t-Boc-phénylalanine qui sont injectés à des souris Balb/C. Après 21 jours, des anticorps ne sont pas détectés, ce qui indique que ces dendrimères ne sont pas immunogènes à court terme.⁽⁷⁸⁾

I.2.3.2.4 Biopermabilité

Pour être utilisés comme médicaments ou systèmes de vectorisation, les dendrimères doivent avoir une très bonne biopermabilité au niveau intracellulaire et la capacité de traverser les barrières cellulaires.⁽⁷⁹⁾ Ainsi, le transport de macromolécules à travers la membrane cellulaire a lieu préférentiellement par la formation d'endosomes en évitant la lyse de la cellule. Les endosomes sont des compartiments qui permettent le tri des molécules internalisées. Elles pourront avoir plusieurs devenir : repartir à la membrane plasmique, être dégradées par des systèmes de dégradation intracellulaire ou être redirigées vers d'autres compartiments intracellulaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc.), pour agir ailleurs dans la cellule. Par exemple les dendrimères PAMAM et PPI à terminaisons cationiques complexés avec de l'ADN ou de l'ARN peuvent être transportés dans le noyau cellulaire par endocytose. L'endocytose est favorisée pour les dendrimères de petite taille. A générations élevées, les dendrimères ont tendance à former des pores dans la membrane.

I.2.3.3 Inhibiteurs dendrimériques de reconnaissance et/ou fixation

De nouvelles stratégies visent l'inhibition des processus non catalytiques comme les interactions entre macromolécules. Dans ce contexte, l'entrée du virus dans la cellule offre de nombreuses possibilités car ce processus en trois étapes met en jeu des interactions extrêmement spécifiques entre protéines virales et/ou cellulaires.⁽⁸⁰⁾

Les inhibiteurs de reconnaissance et de fixation interfèrent donc soit avec les récepteurs (CD4 et GalCer) ou les corécepteurs (CCR5 et CXCR4) cellulaires soit avec le récepteur viral (gp120) afin d'empêcher l'entrée du virus dans la cellule. Cette interférence peut être spécifique ou non spécifique.

1.2.3.3.1 Inhibiteurs de l'entrée du VIH dans les cellules hôtes

La principale stratégie antivirale employant des dendrimères en tant qu'inhibiteurs d'entrée consiste en l'interaction du dendrimère de manière spécifique ou non avec le récepteur viral en bloquant ainsi l'infection.

1.2.3.3.1.1 Interaction non spécifique de type électrostatique avec le VIH

Il est bien connu que les composés poly-anioniques comme les poly-sulfates, poly-sulfonates, poly-carboxylates, poly-phosphates, poly-phosphonates, poly-oxometalates, etc. sont des inhibiteurs de la gp120. On peut citer par exemple, la suramine qui a été le premier principe actif utilisé dans le traitement clinique contre le VIH, le carraghénane (Carraguard), le PRO2000, l'analogue de cosalane et le sulfate de dextrine (DS) (Figure I.10).⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾

Ces dérivés poly-anioniques interagissent avec les sites chargés positivement en bloquant la boucle V3 de la gp120 par des interactions électrostatiques.^(18, 85) Les médicaments antiviraux poly-anioniques concourent donc avec la surface cellulaire pour s'attacher au virus, en conséquence le taux d'infection est diminué.

Ces composés se trouvent dans les dernières étapes des tests cliniques en tant que microbicides pour la prévention de la transmission sexuelle du VIH.⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ PRO2000 et DS inhibent l'infection par le VIH-1 de type X4 et R5 pendant l'exposition de la cellule au virus. Néanmoins, PRO2000 et DS requièrent respectivement 10 et 2000 fois plus de produit pour bloquer l'infection par le VIH-1 R5 que par le X4. En fait, cette différence d'activité peut être expliquée par la compétition des poly-anions pour les sites chargés de la boucle V3. Les poly-anions ont une meilleure affinité pour la gp120 X4 qui est plus riche en sites cationiques (au moins 5 charges positives) que pour la gp120 R5 (2 à 5 charges positives).^(88, 89)

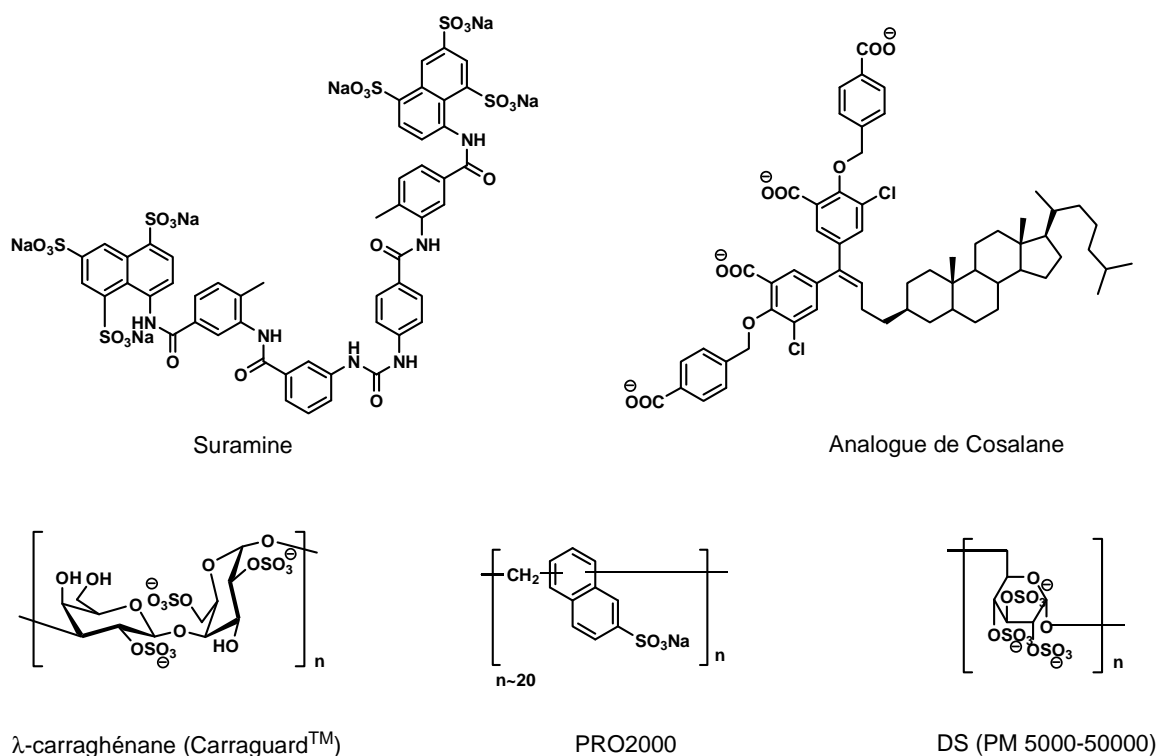


Figure I.10 Exemples d'inhibiteurs poly-anioniques de la gp120

Des poly-anions comme les carbohydrates sulfatés ou les polymères poly-anioniques (par exemple, le poly(styrène sulfonate)) et même les dendrimères poly-anioniques montrent des propriétés antivirales contre le VIH et d'autres virus.⁽⁹⁰⁻⁹²⁾ Cependant la diversité moléculaire des carbohydrates sulfatés est limitée. Les polymères poly-anioniques sont aussi des mélanges complexes à cause de la difficulté d'obtention des espèces moléculaires discrètes. En conséquence, la rationalisation de l'activité biologique avec les composants structurels est difficile. En contrepartie, la synthèse de dendrimères poly-anioniques comme espèces monodisperses permet d'avoir une corrélation entre les propriétés biologiques et la structure.

En 2001, Holan *et al.*⁽⁹³⁾ ont breveté plusieurs dendrimères anioniques et cationiques à propriétés antivirales dont la fonction principale consiste à empêcher l'entrée du virus VIH-1 dans la cellule, mais aussi d'autres virus comme le VIH-2, le CMV (Cytomegalovirus) et le VHS (herpes). Ils ont choisi les dendrimères PAMAM à cœur amine ou éthylène diamine et les dendrimères polylysine à cœur diphenylméthanamine (BHA) comme squelettes dendritiques (Figure I.11). Sur leurs surfaces, différents groupes anioniques ou cationiques (Tableau I.1) sont greffés aux squelettes dendritiques par des liaisons amide ou thio-urée. Ces dendrimères présentent une activité antivirale significative contre le VIH-1 avec des CI₅₀ entre 0,003 et 1,25 μM.

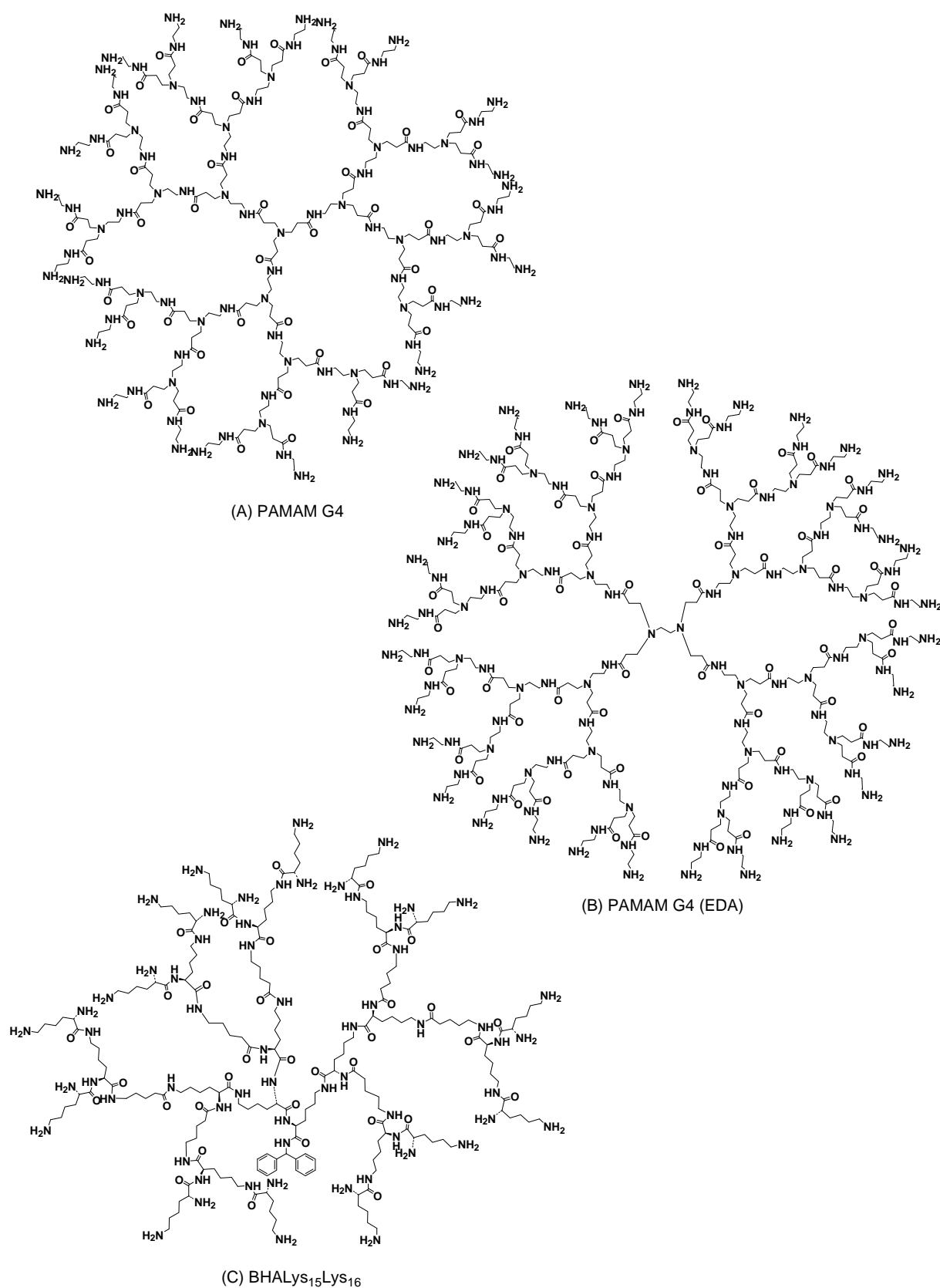
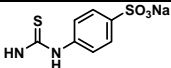
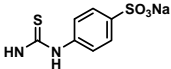
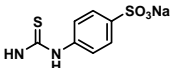
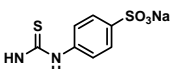
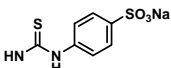
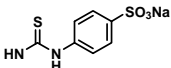
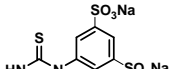
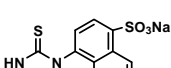
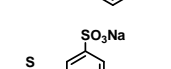
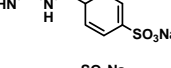
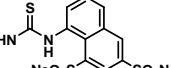
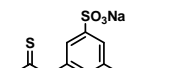
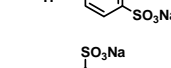
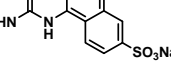
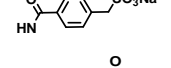
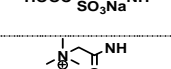
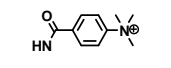


Figure I.11 Squelettes dendritiques utilisés par Holan pour le développement d'inhibiteurs poly-anioniques. (A) Dendrimère PAMAM de génération 4 à cœur amine. (B) Dendrimère PAMAM de génération 4 à cœur éthylène diamine. (C) Dendrimère polylysine à cœur diphénylméthylamine, BHALys₁₅Lys₁₆

Entrée	Dendrimère	Groupe Fonctionnel	N	CI ₅₀ (μM)	RCI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IT
1	PAMAM G4		24	0,0492	1,18	>125	>2543
2	PAMAM G5		48	0,0096	0,46	>11	>1180
3	PAMAM G4 (EDA)		32	0,0142	0,45	>17	>1212
4	BHALys ₁₅ Lys ₁₆		32	0,0126	0,40	100	7991
5	BHALys ₃₁ Lys ₃₂		64	0,0332	2,12	>10	>320
6	BHALys ₆₃ Lys ₆₄		128	0,0530	6,78	>5	>100
7	PAMAM G4		24	0,0030	0,07	>19	>9091
8	PAMAM G4		24	0,0694	1,66	>20	>300
9	PAMAM G4 SPL2923		24	0,0032	0,08	>125	>39000
10	PAMAM G4		24	0,0041	0,10	>14	>3500
11	PAMAM G4 (EDA)		32	0,0051	0,16	>13	>2537
12	BHALys ₁₅ Lys ₁₆		32	0,0088	0,28	>15	>1700
13	PAMAM G4		24	0,0088	0,21	>24	>2737
14	PAMAM G4		24	0,2849	6,84	>25	>88
15	BHALys ₁₅ Lys ₁₆		32	0,0725	2,32	>125	>1720
16	PAMAM G4		24	1,2559	30,14	>25	>20
17	PAMAM G4		24	0,2973	7,13	2,3406	8

$Lys_{15}Lys_{16} = Lys-Lys_2-Lys_4-Lys_8-Lys_{16}$; $Lys_{31}Lys_{32} = Lys-Lys_2-Lys_4-Lys_8-Lys_{16}-Lys_{32}$

$Lys_{63}Lys_{64} = Lys-Lys_2-Lys_4-Lys_8-Lys_{16}-Lys_{32}-Lys_{64}$

Tableau I.1 Valeurs de l'activité antivirale, de la cytotoxicité et des index thérapeutiques des différents dendrimères à groupes anioniques et cationiques développés par Holan

D'autre part, nous constatons que pour le même groupe terminal (Tableau I.1, entrées **1** à **6**), le squelette offre un effet dendritique, c'est-à-dire qu'en augmentant la génération, les RCI_{50} diminuent. Cet effet dendritique n'est pas présent sur le squelette polylysine. Cependant, le dendrimère le plus sélectif est le dendrimère polylysine à 32 groupes terminaux (Tableau I.1, entrée **4**, $IT = 7991$).

Il existe aussi une influence du nombre de groupes $NaSO_3$. Ainsi, le dendrimère avec 2 groupes sulfate (Tableau I.1, entrée **7**) est 16,4 fois plus actif que son analogue avec un groupe sulfate (Tableau I.1, entrée **1**). Pour le même nombre de groupes sulfate, le système aromatique influe sur la sélectivité thérapeutique du dendrimère. Par exemple, le dendrimère avec des naphthalènes (Tableau I.1, entrée **9**) et le dendrimère avec des benzènes à la surface (Tableau I.1, entrée **7**), ont tous deux la même activité ($CI_{50} = 0,003 \mu M$) alors que le premier est 4,3 fois plus sélectif que son analogue à terminaisons benzène. De plus, le groupe aromatique joue un rôle important dans les interactions du poly-anion avec la gp120. Quand on élimine le groupe aromatique (Tableau I.1, entrée **14**), l'activité et la sélectivité chutent. Finalement, les dendrimères à terminaisons cationiques sont en général moins actifs et moins sélectifs (Tableau I.1, entrées **15** à **17**). Ainsi, ces dendrimères à terminaisons triméthylammonium présentent des index thérapeutiques très différents, avec des valeurs entre 8 et 1720 en raison de leur cytotoxicité (CC_{50} entre 2,34 et 125 μM). Cette cytotoxicité est due principalement à la capacité des dendrimères cationiques à interagir avec la membrane cellulaire chargée négativement en provoquant la lyse de la cellule.⁽⁵⁷⁾

On peut en conclure que le dendrimère le plus sélectif est le dendrimère PAMAM de génération 4 à terminaisons acide naphthalène disulfonique (Tableau I.1, entrée **9**), nommé SPL2923 ($IT > 39000$).⁽⁹⁴⁾

Ce dendrimère poly-anionique SPL2923 et son analogue SPL6195 étudiés plus tard par Withvrouw *et al.*⁽⁹⁴⁾ ont un squelette de dendrimère PAMAM de génération 4 respectivement à cœur amine avec 24 terminaisons acide naphthylsulfonique et à cœur éthylène diamine avec 32 terminaisons acide phénylcarboxilique (Figure I.12). Ces terminaisons sont liées aux groupes terminaux amine du dendrimère par une liaison thio-urée, tous les groupes anioniques étant sous forme de sel de sodium.

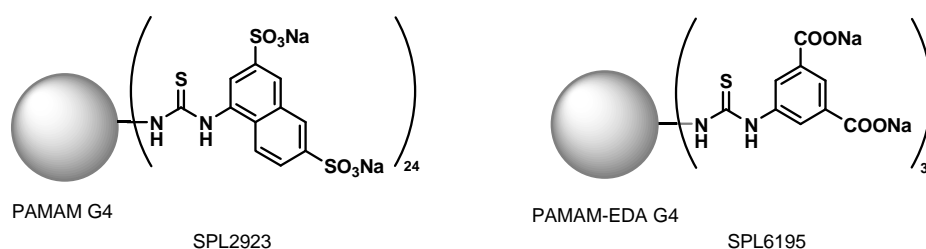


Figure I.12 Dendrimères anioniques SPL2923 et SPL6195

Les dendrimères SPL2923 et SPL6195 inhibent la réplication de différentes souches du VIH-1, du VIH-2, du VIS et de souches spécifiques du VIH-1 résistantes aux inhibiteurs de la transcriptase inverse sur différents types de cellules à des valeurs de CI_{50} comprises entre 0,60 nM et 2,12 nM. Ces composés ne sont pas toxiques jusqu'à des concentrations supérieures à 16 nM sur cellules MT4 et PBMC, cela se traduit par des index de sélectivité supérieurs à 28000.

L'intérêt de ce type d'inhibiteurs est qu'ils empêchent l'infection virale en bloquant l'entrée du virus. Pour cette raison, Starpharma a sélectionné le dendrimère SPL7013 (Figure I.13) pour le développement clinique d'un microbicide.^(95, 96) Un microbicide est un composé qui s'applique localement (vagin, rectum) comme protection contre des maladies de transmission sexuelle comme le SIDA.

Ce microbicide dendritique de Starpharma a été préparé à partir d'un dendrimère à squelette poly-L-lysine SPL7013 à la différence des dendrimères SPL2923 et SPL6195 qui possèdent un squelette polyamidoamine. En effet, la structure de ces dendrimères de type PAMAM peut être dégradée à cause du pH acide de la formulation finale.

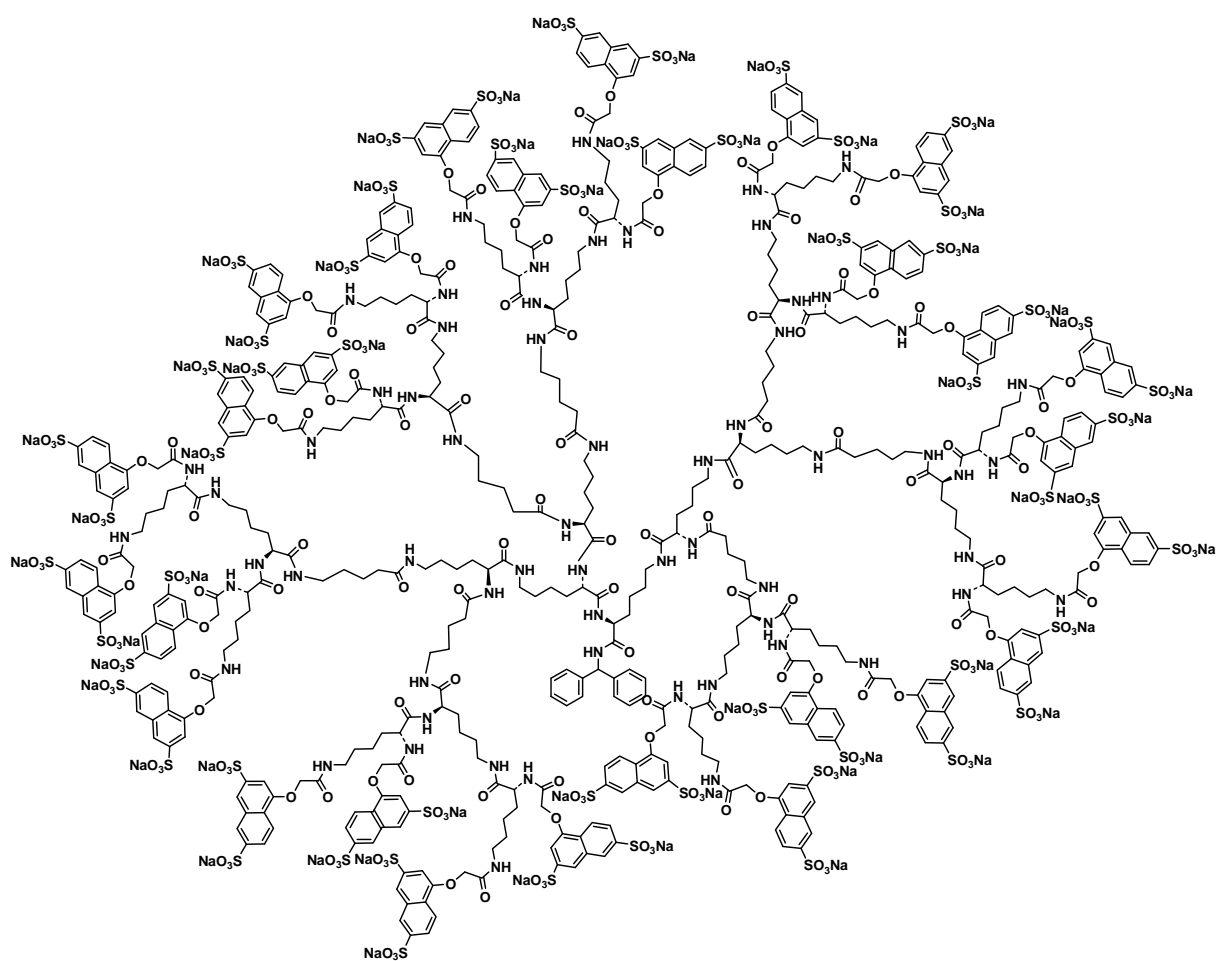


Figure I.13 Structure du SPL7013 principe actif du VivaGelTM

Ce dendrimère SPL7013 est synthétisé à partir d'un cœur divalent, la diphénylméthanamine par des couplages peptidiques de 4 couches de L-lysine. Cela conduit à l'obtention d'un dendrimère de 32 groupes amine à la surface, 16 groupes amine α et 16 groupes amine ϵ . L'étape finale est un couplage peptidique des groupes sodium 1-(carboxyméthoxy)naphthalène-3,6-disulfonate à la surface. De cette façon, on peut produire jusqu'à 100 kg de SPL7013. Le dendrimère SPL7013 est ensuite formulé dans un gel soluble dans l'eau et tamponné à pH physiologique. Le Carbopol est choisi comme gel pour ses propriétés mucoadhésives et il est utilisé dans d'autres formulations microbicides. Il est partiellement efficace contre le VIH-1 *in vitro*.⁽⁹⁷⁾ Le médicament clinique sous forme de gel est nommé VivaGel et a été autorisé par la FDA en juin 2003 pour le début de l'étude clinique phase I. C'est le premier dendrimère en cours de développement comme principe actif.⁽⁹⁸⁾

Le SPL7013 s'attache aux protéines d'enveloppe du virus par des interactions électrostatiques entre la boucle V3 et les corécepteurs CD4. Ces interactions peuvent dépendre du pH et de la charge nette de la boucle V3. En conséquence le SPL7013 peut être un bon inhibiteur des virus CXCR4 et CCR5. Les études *in vitro* ne montrent pas de différence d'activité contre le VIS_{89,6P} CXCR4 ($CI_{50} = 0,23 \mu\text{M}$) et le VIS_{162 P3} CCR5 ($CI_{50} = 0,30 \mu\text{M}$). De plus, le SPL7013 est cytotoxique seulement à des concentrations élevées ($CC_{50} = 1500 \mu\text{M}$ pour des cellules PBMC de macaques ; $CC_{50} > 2250$ pour des cellules humaines de type MT2 et CEM-NKR-CCR5). Il a un index thérapeutique supérieur à 6000 pour les cellules testées. Des études sur des macaques (*Macaca nemestrina*) montrent qu'une seule dose intravaginale de la formulation clinique à 5% p/p de SPL7013 les protège tous de l'infection par le VIS.⁽⁹⁹⁾ De plus, le gel de placebo et le gel composé de SPL7013 ne montrent aucun signal d'irritation ou d'effet secondaire après l'application vaginale. En effet, l'absence d'irritation sur la surface muqueuse ou d'altération dans la flore vaginale ou rectale après l'utilisation répétée du microbicide est souhaitable, dans le cas contraire, le risque d'infection est augmenté.

Récemment, les effets secondaires et la toxicité systémique ont été évalués sur 37 femmes en bonne santé et en abstinence sexuelle qui ont reçu 3,5 g de 0,5% ou 1% ou 3% p/p de gel de SPL7013 ou gel placebo appliqué directement sur le vagin une fois par jour pendant 7 jours.^(100, 101) Les effets secondaires liés au médicament ne sont pas significatifs. Seules 5 femmes qui ont reçu le gel de SPL7013 et 2 femmes qui ont appliqué le gel de placebo les présentent. Elles ont eu une douleur abdominale sans présenter de brûlure vaginale ou de mauvaises odeurs. La coloscopie ne révèle pas d'inflammation ni de la disruption épithéliale. La flore vaginale récupère son niveau normal après le traitement chez la plupart des femmes. Finalement, il n'y a pas d'absorption du SPL7013 dans la circulation sanguine donc sa toxicité est réduite.

En janvier 2006, VivaGel accède au statut de Fast Track par la FDA, ce qui permet un développement plus rapide du médicament. Actuellement il est au stade clinique de phase II.

En outre, des études récentes réalisées par Tao *et al.*⁽¹⁰²⁾ suggèrent que les poly-anions sont capables d'augmenter la réplication du VIH-1 au seuil des concentrations antivirales. Mais l'évaluation du microbicide SPL7013 montre qu'il n'accroît pas spécifiquement la réplication des souches de VIH-1 CCR5 dans des cellules PBMC.⁽¹⁰³⁾ L'effet d'augmentation de la réplication par les poly-anions peut être lié aux conditions d'essais *in vitro*, mais il n'est pas dû aux propriétés intrinsèques des poly-anions.

I.2.3.3.1.2 Interaction spécifique avec le VIH

Les glycosphingolipides (GSL) sont employés comme récepteurs par plusieurs pathogènes (bactérie et virus). Ainsi, le VIH utilise le galactosylcéramide ou GalCer et son dérivé 3'-sulfate, SGalCer comme des récepteurs alternatifs de la gp120^(20, 104-108) dans les cellules démunies de récepteurs CD4 comme les cellules épithéliales du colon humain^(108, 109) et les cellules neuronales.⁽¹⁰⁷⁾

Les glycosphingolipides sont formés par un squelette de céramide (sphingosine N-acylé) et un carbohydrate lié de façon β au groupe hydroxyle terminal de la sphingosine. La portion de céramide est intercalée dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire et l'unité de carbohydrate est localisée à la surface de la membrane. La portion de céramide est nécessaire pour assurer la position du sucre qui doit être disponible pour s'attacher aux pathogènes.

Le GalCer a une structure glycosphingolipidique qui comporte une seule unité de D-galactose fixée par une liaison β -O-glycosidique à un céramide qui est constitué d'une D-sphingosine liée par une fonction amide à un acide gras en C24 hydroxylé (Figure I.14).

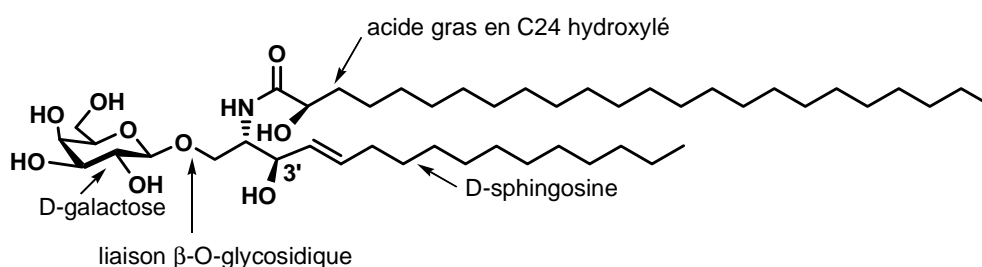


Figure I.14 Structure chimique du β -GalCer

L'identification du GalCer et du SGalCer comme récepteurs alternatifs du VIH-1 a ouvert de nouvelles pistes pour les stratégies thérapeutiques anti-VIH. Le GalCer a une affinité élevée pour la boucle V3 de la protéine virale gp120 (l'affinité entre gp120/GalCer est de 11 nM^(20, 110) et pour le système gp120/CD4 elle est de 2 à 5 nM⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾ et reconnaît spécifiquement la séquence d'acides

aminés 650-685 de la glycoprotéine virale gp41.⁽¹¹⁵⁾ Ce constat a amené plusieurs groupes de recherche à synthétiser et à évaluer la capacité des analogues synthétiques du GalCer et du SGalCer à leurrer le VIH et ainsi à bloquer l'infection virale.

La capacité des analogues synthétiques du GalCer à reconnaître et à se fixer sur la boucle V3 de la gp120 permet de neutraliser l'infection par le VIH sur les cellules possédant le GalCer à leur surface mais aussi sur les cellules possédant le récepteur CD4.^(116, 117) En effet, une fois que la boucle V3 est bloquée par le GalCer, elle n'est plus capable d'interagir avec le récepteur cellulaire CD4. Les analogues synthétiques du GalCer solubles dans l'eau sont donc des candidats de choix pour les thérapies anti-VIH.

D'autre part, l'interaction GalCer-gp120 est conservée quand certaines modifications structurales sont réalisées sur le fragment céramide.⁽¹¹⁸⁾ Cela suggère que les analogues du GalCer doivent posséder des propriétés anti-VIH.

Les premiers analogues du GalCer conçus pour l'inhibition compétitive du VIH pour la gp120 ont été synthétisés par Bertozzi *et al.*⁽¹¹⁹⁾ Ces dérivés qui ont respectivement une liaison O- et C-glycosidique (Figure I.15) sont solubles dans l'eau et s'attachent spécifiquement à la gp120 recombinée⁽¹²⁰⁾ ce qui permet le blocage de l'interaction de la gp120 avec le GalCer.

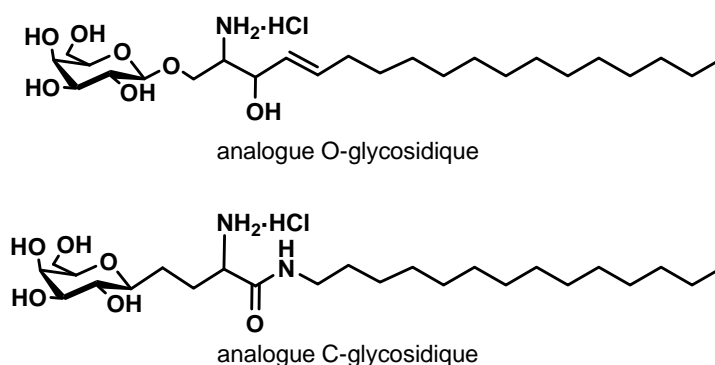


Figure I.15 Analogues synthétiques O- et C-glycosidique du GalCer

L'analogue C-glycosidique possède une meilleure affinité pour la rgp120 ($CI_{50} = 120 \mu\text{M}$) et compète légèrement mieux que l'analogue O-glycosidique ($CI_{50} = 160 \mu\text{M}$). La diminution de l'activité a été observée quand la longueur de la chaîne alkyle est raccourcie.

Plus récemment, Augustin *et al.*⁽¹²¹⁾ ont aussi préparé des analogues C- et aza-C-glycoside du GalCer qui contiennent une chaîne alkyle à 17 atomes de carbone (Figure I.16). Les études du changement de la tension de surface des monocouches de ces glycolipides quand elles sont exposées

à différentes concentrations de gp120 montrent une forte affinité de ces composés pour la gp120. De plus, l'analogue aza-C-glycoside possède une affinité supérieure à celle du GalCer tandis que l'analogue C-glycoside est aussi actif que le GalCer.

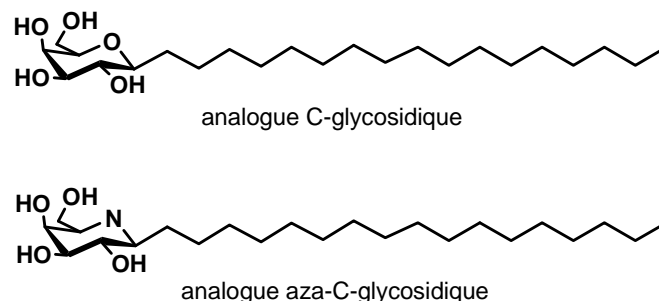


Figure I.16 Analogues C- et aza-C-glycosidique du GalCer

De nombreux composés analogues du GalCer pour des applications anti-VIH ont été développés au sein de notre laboratoire (IMRCP).

Ainsi, les N-alkylamino-1-déoxylactitols ($n = 15$, $m = 0$, $CI_{50} = 50 \mu\text{M}$), les N-alkyl-N-acylamino-1-déoxylactitols ($n = 8$, $m = 14$, $CI_{50} = 10 \mu\text{M}$) et les N-[ω -(sodiumcarboxylate)alkyl]-N-acylamino-1-déoxylactitols ($n = 10$, $m = 14$, $CI_{50} = 108 \mu\text{M}$) ont des activités anti-VIH sur des cellules CEM ou PBMC (Figure I.17).^(117, 122)

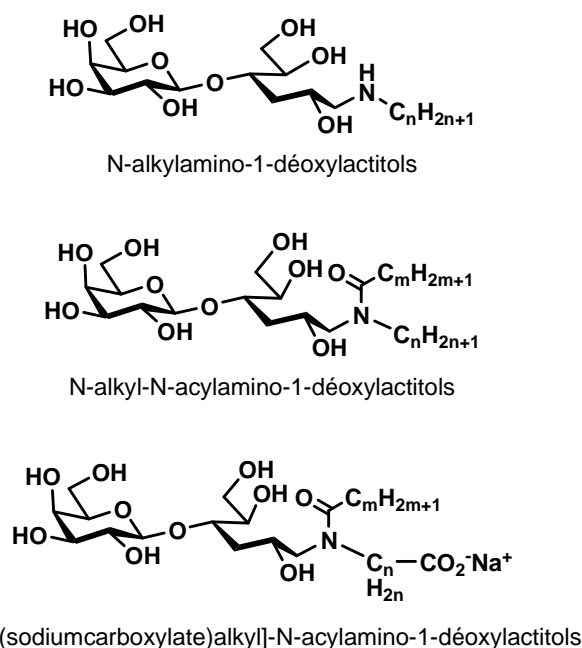


Figure I.17 Structure des analogues du GalCer qui ont également des propriétés anti-VIH

Les N-alkylamino-1-déoxylactitols sont très actifs contre le VIH mais ils sont toxiques au dessus de leur CMC car ils possèdent des propriétés détergentes sur les membranes cellulaires.⁽¹¹⁶⁾ Les N-alkyl-N-acylamino-1-déoxylactitols et les N-[ω -(sodiumcarboxylate)alkyl]-N-acylamino-1-déoxylactitols sont aussi actifs contre le VIH sur des cellules CEM mais n'ont pas de propriétés détergentes sur les membranes cellulaires.⁽¹¹²⁾

Notre groupe de recherche a aussi mis au point la synthèse générale des analogues cationiques de glycolipides à partir de carbohydrates non protégés. Cette méthode de synthèse conduit à l'obtention quantitative de ces produits cationiques bicaténaires ou gemini (Figure I.18)^(123, 124), en remplaçant la liaison amide covalente par une liaison amine-acide ionique. Nous expliquerons ce qu'est un "composé cationique" dans le Chapitre II.

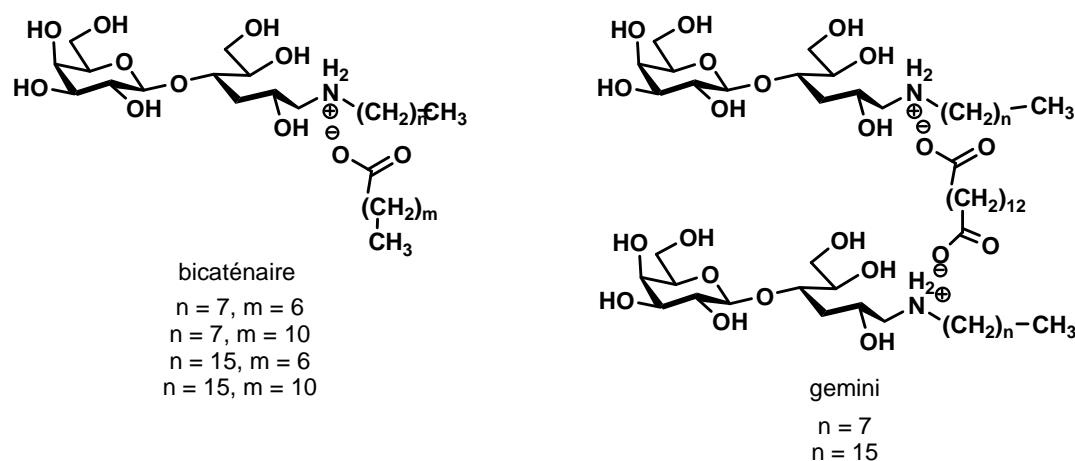


Figure I.18 Structures des analogues cationiques du GalCer, bicaténaires et gemini

Composé	n	m	CI ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	IT	log P	CAC (Mm)
Bicaténaire	7	6	>1000	>1000	-	1,7	-
Bicaténaire	7	10	100	>100	>1	3,3	2,1
Bicaténaire	15	6	16	38	2,3	4,9	0,17
Bicaténaire	15	10	0,9	2,5	2,7	6,5	0,01
Gemini	7	12	500	600	1,1	2,1	2,5
Gemini	15	12	0,5	>100	>200	8,4	0,01

Tableau I.2 Valeurs d'activité, de cytotoxicité et de CMC pour les composés bicaténaires et gemini analogues du GalCer^(123, 124)

(i) Tous ces composés montrent une activité inhibitrice à des concentrations plus faibles que leur CAC, cela signifie à l'état non agrégé, tandis que leur cytotoxicité est principalement due à leur état agrégé.

(ii) En augmentant la lipophilie des analogues bicaténaires, on constate une amélioration de leur activité antivirale mais leur cytotoxicité augmente.

(iii) Dans le cas des composés gemini, la cytotoxicité ne suit pas cette règle (Tableau I.2). Malgré l'hydrophobie élevée, le composé gemini avec $n = 15$ possède une activité élevée avec une faible cytotoxicité pour les cellules non infectées. Ce composé catanionique est le seul qui a une valeur de CC_{50} au dessus de sa CAC, ce qui indique que cet analogue est toxique dans son état agrégé. De plus, cela montre que la CC_{50} est de plus de 100 μM pour une valeur de $\log P$ de 8,4 tandis que le composé bicaténaire correspondant montre une toxicité plus élevée ($CC_{50} = 2,5 \mu\text{M}$) pour une lipophilie plus faible ($\log P = 6,5$). En conséquence, il y a d'autres paramètres en dehors de la lipophilie qui participent à la toxicité des analogues gemini. Les concentrations cytotoxiques de ces composés bicaténaires et gemini sont du même ordre que leurs CAC.

Si la cytotoxicité des analogues non agrégés est associée à la modification de la membrane cellulaire,⁽¹¹⁶⁾ l'incorporation des chaînes alkyle de l'analogue à la bicouche lipidique peut avoir une influence sur la toxicité de ces composés. Pour les analogues bicaténaires, les chaînes alkyles libres peuvent facilement pénétrer la membrane cellulaire et perturber la fonction cellulaire (Figure III.19, A). Par contre dans les analogues gemini, les trois chaînes alkyles sont liées à deux têtes polaires. Dans le milieu biologique très hydrophile, les chaînes hydrophobes s'arrangent entre elles pour minimiser leur contact avec l'eau (Figure III.19, B et C). La partie hydrophobe est donc masquée ce qui diminue la capacité des chaînes hydrophobes à pénétrer dans la membrane cellulaire.

A partir de ces études, ont été établies des relations structure-activité biologique du GalCer et de ses analogues synthétiques :

- La combinaison du sucre et des chaînes hydrophobes est indispensable pour optimiser l'activité. Si l'on utilise individuellement un de ces deux éléments, l'activité est réduite.⁽¹²⁵⁾
- L'utilisation du galactose permet une interaction spécifique avec la gp120, c'est-à-dire, une augmentation de l'affinité.⁽¹²⁶⁾
- La configuration β de la liaison glycosidique est décisive pour l'ancrage efficace du GalCer à la gp120.^(114, 127)
- La partie hydrophobe des analogues du GalCer doit être suffisamment longue pour une bonne efficacité d'ancrage. Rico-Lattes *et al.* ont montré que l'effet hydrophobe joue un rôle primordial dans le processus de reconnaissance, en constatant qu'une chaîne d'acide gras à

16 atomes de carbone a la taille idéale.⁽¹¹⁶⁾ Néanmoins cette chaîne alkyle doit être masquée pour éviter la pénétration des composés cationiques dans la membrane cellulaire en interagissant et en désorganisant les membranes par l'extraction des protéines cellulaires (Figure I.19). Dans ce cas, ces composés deviennent toxiques.

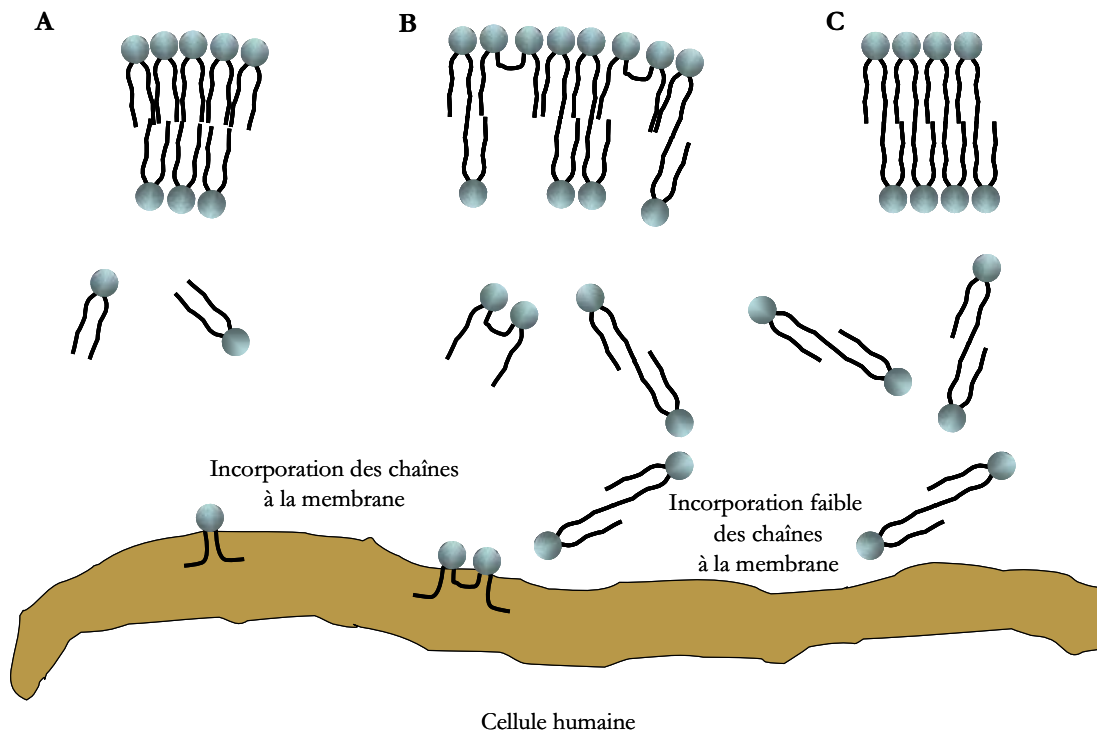


Figure I.19 Incorporation des analogues du GalCer à la membrane cellulaire (A) bicaténaire, (B) gemini à $n = 7$ et (C) gemini à $n = 15$ (hydrophobie masquée)

- L'hydroxyle en position 3' n'est pas indispensable pour une meilleure affinité du GalCer pour la gp120.⁽¹⁰⁷⁾
- Le nombre de sites actifs ainsi que la conformation adoptée par ces analogues du GalCer sont aussi des facteurs déterminants pour une bonne activité virale.^(126, 128-131)

Dans le contexte de multiplication de sites actifs, des dendrimères phosphorés à différents cœurs et à terminaisons acides, dont les surfaces ont été modifiées par des réactions acide-base avec un N-hexadécylaminolactitol, ont été préparés avec 6 ou 12 sites actifs à la surface (Figure I.20).^{(129,}

130)

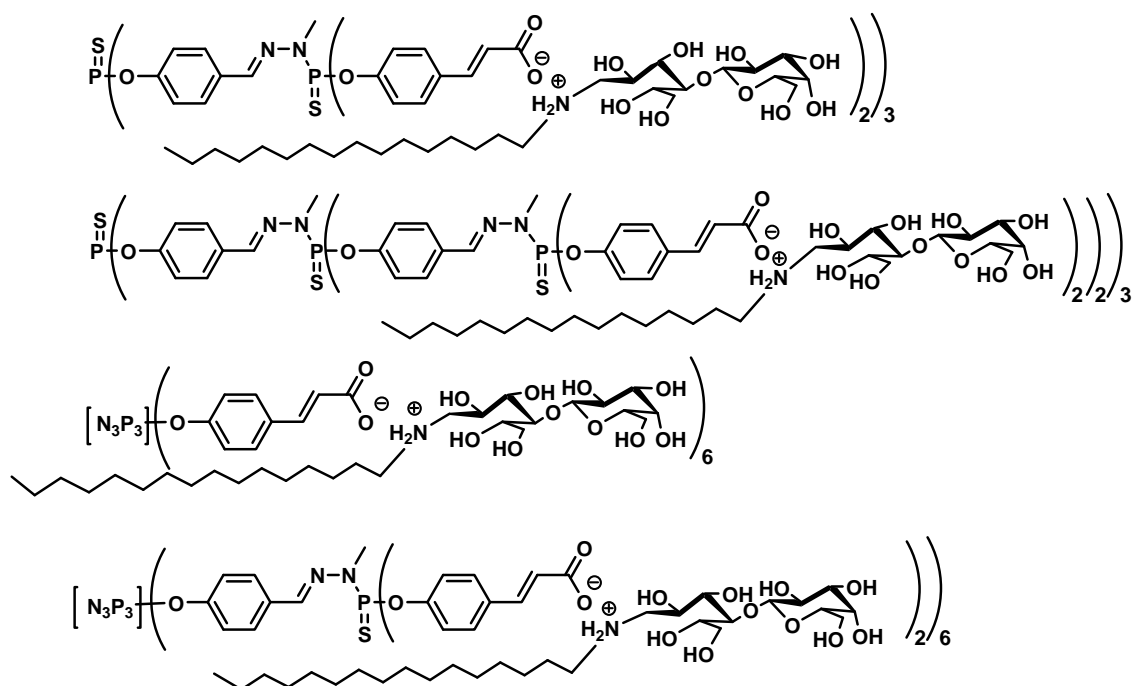


Figure I.20 Dendrimères cationiques analogues du GalCer

L'activité d'inhibition du VIH et la cytotoxicité des nouveaux dendrimères cationiques analogues du GalCer⁽¹³⁰⁾ ont été évaluées *in vitro* dans des cellules CEM-SS (cellules humaines lymphoblastoïdes T4) (Tableau I.3).^(132, 133)

Tous ces assemblages dendritiques montrent des valeurs de RCI₅₀ plus basses (1,44 à 13,2 µM) que la CI₅₀ (= RCI₅₀ = 50 µM) de l'aminolactitol. Ces observations indiquent que les activités anti-HIV des analogues dendritiques multivalents sont meilleures que la somme totale des activités du nombre équivalent d'analogues monomères dans la même relation stœchiométrique. Ces résultats confirment l'effet de multivalence⁽⁴⁶⁾ dans les activités thérapeutiques de chaque inhibiteur dendritique.

Composé	N	CI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	RCI ₅₀ (µM)	IT
G1 cœur P=S	6	2,1	3,5	12,6	1,7
G2 cœur P=S	12	1,1	2,9	13,2	2,6
G0 cœur N₃P₃	6	0,37	9,3	2,22	25
G1 cœur N₃P₃	12	0,12	3,9	1,44	32
L16	1	50	70	50	1,4

Tableau I.3 Résultats des tests *in vitro* des analogues cationiques dendritiques pour l'inhibition de l'infection par le VIH sur des cellules CEM-SS⁽¹³⁰⁾

Bien que la série des quatre dendrimères catanioniques montre un comportement cytotoxique non négligeable, avec des valeurs de CC_{50} de l'ordre du micromolaire ($CC_{50} = 2,9$ à $9,3 \mu\text{M}$), le paramètre IT est plus significatif. Dans cette étude, les dendrimères à **cœur trifonctionnel** ont des valeurs d'IT très faibles (1,5 et 3) alors que les dendrimères à **cœur hexafonctionnel** présentent des valeurs d'IT significativement plus élevées (supérieures à 20). Ces observations indiquent que l'activité virale comme la toxicité peuvent être dépendantes de la forme de l'assemblage catanionique et de la compaction des têtes de sucre.

Une description plus détaillée de cette famille de dendrimères catanioniques sera faite dans le deuxième chapitre car ils sont le point de départ de ces travaux de thèse.

Dans le même contexte, Kensinger *et al.*⁽¹³¹⁾ ont préparé différentes séries de glycodendrimères à squelette PPI (générations 1 à 5) avec des résidus galactose sulfatés ou non sulfatés à la surface qui miment les glycoclusters carbohydrate présents dans les radeaux lipidiques. Une série de glycodendrimères a été préparée à partir du GalCer naturel purifié et une autre a été préparée à partir de l'acide 3-(β -D-galactopyranosylthio)propionique. Une dernière série a été élaborée par sulfonation statistique des dendrimères fonctionnalisés avec de l'acide 3-(β -D-galactopyranosylthio)propionique (Figure I.21).

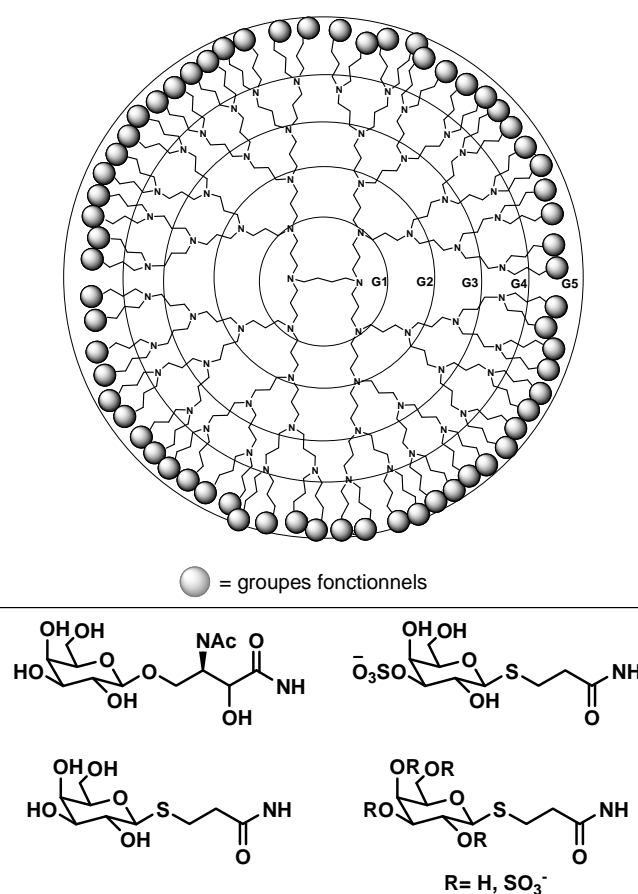


Figure I.21 Glycodendrimères analogues du GalCer et du SGalCer synthétisés par Kensinger

Les tests biologiques *in vitro* ont révélé que les glycodendrimères sulfatés sont de meilleurs inhibiteurs ($CI_{50} = 20\text{--}90 \mu\text{M}$) que les non sulfatés ($CI_{50} > 0,1 \text{ mM}$). En effet, ces derniers sont actifs à partir de concentrations très élevées. Le fait que le GalCer soit d'origine naturelle ou synthétique n'a aucun effet sur l'activité des dendrimères dérivés du GalCer. Kesinger *et al.* supposent que les glycodendrimères non sulfatés sont incapables de bloquer l'interaction entre la boucle V3 de la gp120 chargée positivement et les résidus tyrosine sulfatés et chargés négativement de la partie N-terminale des corécepteurs à chimiokine CCR5,⁽¹³⁴⁾ même si les études par résonance de plasmons de surface ont montré que la rgp120 recombinée a une affinité nanomolaire pour ces dendrimères analogues du GalCer.

Ces dendrimères constitués d'un squelette dendritique PPI de générations 3, 4 et 5 à terminaisons SGalCer ne sont pas toxiques sur des cellules glioblastoma et des cellules U373-MAGI-X4. Ils sont actifs contre le VIH avec des CI_{50} respectivement de 90, 70 et 20 μM pour les dendrimères nommés SGalCer-16mer, SGalCer-32mer et SGalCer-64mer (mer = nombre de groupes à la surface) (Tableau I.4) et comparables à celle du DS ($CI_{50} = 1,6 \mu\text{M}$).

Dendrimère	N	CI_{50} (μM)	RCI_{50} (μM)
SGalCer-16mer	16	90	1440
SGalCer-32mer	32	70	2240
SGalCer-64mer	64	20	1280

N = nombre de groupes fonctionnels

Tableau I.4 Valeurs de l'activité anti-VIH des dendrimères SGalCer

On peut constater qu'il existe un effet dendritique non linéaire. Ainsi, les valeurs de RCI_{50} révèlent qu'en augmentant la génération de 3 à 4, l'activité diminue. Cependant l'augmentation de la génération de 4 à 5 provoque une amélioration significative de l'activité (Tableau I.4).

D'autre part, l'étude de la fixation de plusieurs virus avec différents tropismes cellulaires VIH-1 X4 et R5) et les rgp120 recombinées correspondantes à des GSL immobilisés (le SGalCer, le GalCer, le DS, le ChS et le GM3) sur un support solide indique que la rgp120 montre plus d'affinité pour le SGalCer immobilisé que pour d'autres GSL testés.

Cette interaction paraît être spécifique et pas seulement due à des interactions électrostatiques faibles. Le SGalCer possède un seul résidu de sucre et une seule charge négative comme les GSL avec des acides sialiques chargés négativement. Ces derniers pourraient donc s'attacher à la rgp120 mais cela n'a pas été observé.

D'ailleurs, le fait que les fragments de galactose dans le dendrimère soient sulfatés statistiquement révèle que l'inhibition est due à l'interaction spécifique entre les virions et les

galactose-3-sulfate au lieu d'une interaction anionique non spécifique. En effet, la présence du groupe sulfate en position 3' est primordiale afin que l'interaction ait lieu. De plus, l'observation de la spécificité de la gp120 pour le SGalCer qui contient un résidu Gal-3-sulfate indique que la position sulfatée C3 peut jouer un rôle structurel clé dans l'inhibition du VIH-1.

En résumé, ces travaux montrent que le SGalCer est le meilleur ligand GSL pour la gp120. Étonnamment, la gp120 s'attache beaucoup mieux au SGalCer qu'au GalCer, même si l'affinité entre le gp120/GalCer est de l'ordre du nanomolaire.

Par contre, quand nous comparons les valeurs obtenues pour ces dendrimères dérivés du GalCer avec celles obtenues pour les dendrimères catanioniques, les derniers présentent des concentrations actives antivirales de l'ordre du micromolaire, soit mille fois plus actifs que les glycodendrimères dépourvus de chaînes alkyles présentés par Kensing et même plus de 100 fois plus actifs que les analogues du SGalCer.^(131, 135) Ces résultats confirment que la présence des chaînes alkyles joue un rôle essentiel lors de l'interaction de ces analogues du GalCer avec la glycoprotéine gp120 du VIH.

I.2.3.3.1.3 Interaction spécifique avec la cellule cible du VIH

La principale stratégie antivirale consiste en l'interaction du dendrimère avec la surface virale. Cependant le VIH présente un degré de mutation conduisant à un grand nombre de changements dans les protéines d'enveloppe. C'est une des raisons pour lesquelles le développement d'un vaccin est aussi difficile.

De façon alternative mais complémentaire, une nouvelle approche consiste à concevoir des médicaments qui ont comme cible les récepteurs cellulaires, en les bloquant. Ils deviennent saturés, le virus n'est donc plus capable de se fixer à la cellule cible. En contrepartie, cette stratégie pose plus de problèmes aux patients par rapport aux stratégies qui leurrent le virus, cela peut produire des effets secondaires.

Inhibiteurs avec le récepteur GalCer

Comme nous l'avons déjà vu, la boucle V3 de la gp120 à la surface du VIH-1 joue un rôle clé dans l'infection par le VIH-1.

Un dendrimère peptidique nommé SPC3 qui contient 8 motifs GPGRF⁽¹³⁶⁾ qui sont une séquence conservée de la boucle V3 (Figure I.22), inhibe l'infection par le VIH sur lymphocytes et macrophages CD4(+) et sur cellules épithéliales CD4(-)/GalCer(+).⁽¹³⁷⁻¹⁴²⁾ En effet, ce dendrimère

est plus actif que le peptide monomérique grâce à son caractère multivalent. De plus, le SPC3 qui porte des peptides n'est pas immunogène chez les animaux probablement grâce à sa petite taille.

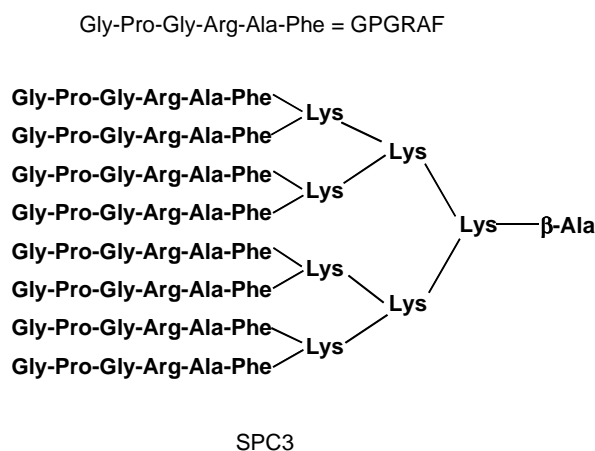


Figure I.22 Structure du dendrimère peptidique SPC3

D'autre part, on constate que son activité est différente selon le type de cellules. Tout d'abord, il a une concentration active de 1,8 μM pour les cellules HT-29 (cellules GalCer (+)) et de 50 nM pour les lymphocytes (CD4(+)). Le SPC3 agit donc de façon différente sur les cellules lymphocytaires CD4(+) et sur les cellules épithéliales CD4(-)/GalCer(+). Le SPC3 n'est pas capable d'éviter l'infection des cellules HT-29 après l'attachement du virus, mais il réduit considérablement l'attachement de la gp120 au récepteur GalCer.⁽¹³⁹⁾ En conséquence, l'activité antivirale du SPC3 dans des cellules HT-29 résulte de l'inhibition de la liaison entre le virion et la surface des cellules CD4(-).

Le SPC3 imite une forme biologiquement active de la boucle V3. Les différentes causes de son activité antivirale peuvent être liées :

(1) au rôle de la boucle V3 dans l'interaction entre la gp120 et le GalCer à la surface des cellules CD4(-)/GalCer(+),^(143, 144) c'est-à-dire que le SPC3 inhibe l'infection par le VIH en s'attachant aux récepteurs GalCer des cellules épithéliales (GalCer (+)). En bloquant ces récepteurs, la gp120 ne peut pas interagir avec eux.

(2) au rôle de la boucle V3 dans les étapes après la liaison qui suit la fixation des cellules CD4(+) au VIH-1 en conduisant à la fusion avec le virus,⁽¹³⁾ ce qui signifie que le dendrimère SPC3 agit après que le virus s'attache au récepteur cellulaire, dans l'étape de fusion dans des cellules lymphocytaires CD4(+).

Interaction avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4

La seconde étape d'entrée du virus implique la fixation de la gp120 sur un corécepteur qui peut être le récepteur CCR5 (virus dit à tropisme R5) ou le récepteur CXCR4 (virus dit à tropisme X4), selon le type cellulaire infecté.

Le potentiel thérapeutique des ligands de CCR5 susceptible de bloquer l'interaction gp120/CCR5, s'est imposé lorsque l'on a découvert que des individus porteurs d'un récepteur CCR5 inactif étaient résistants à l'infection par le VIH.⁽¹⁴⁵⁾ Concernant le CXCR4, il s'exprime sur une grande gamme de cellules. La délétion du récepteur homologue chez les souris est létale. Les effets secondaires des inhibiteurs de ce récepteur sont donc potentiellement plus importants.

Dans ce contexte, deux antagonistes du CCR5, Vicriviroc (SCH-D)^(146, 147) et le Maraviroc (UK-427,875)⁽¹⁴⁷⁾ (Figure I.23) ont une activité antivirale *in vitro* de l'ordre du nanomolaire. Par contre, ils ont de forts effets secondaires, par exemple le Vicriviroc est soupçonné de provoquer l'apparition de tumeurs et le Maraviroc augmente le risque de crise cardiaque. Malgré cela, ce dernier a été agréé par la FDA avec d'importantes restrictions d'utilisation dans les traitements anti-rétroviraux fortement actifs (highly active antiretroviral therapy, HAART).⁽¹⁴⁸⁾

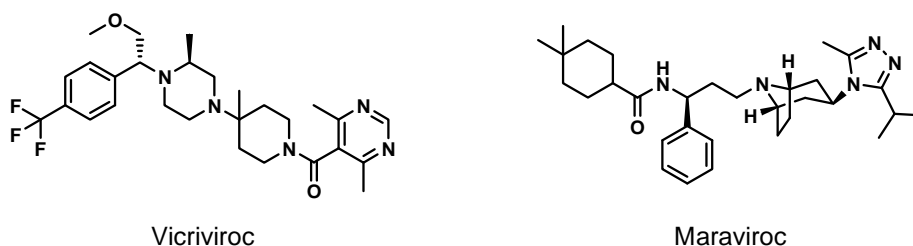


Figure I.23 Structure des inhibiteurs du corécepteur CCR5

Il existe également un antagoniste puissant du CXCR4, l'AMD070 (Figure I.24) qui empêche la fixation du ligand naturel du corécepteur et dont l'activité antivirale est de l'ordre du nanomolaire *in vitro* sur des cellules T.⁽¹⁴⁹⁾ L'AMD070 n'a pas d'effet contre les VIH-1 R5.

Les bicyclams sont aussi des inhibiteurs de CXCR4 (Figure I.24).⁽¹³³⁾ Le monocyclam AMD1498 avec une CI_{50} de 400 μ M est utilisé pour le développement de ce type d'inhibiteurs. Leurs dérivés bicyclam AMD1657 et AMD2763 ont de meilleures activités inhibitrices comprises entre 0,14 et 1,4 μ M. De plus, les bicyclams liés par un pont aromatique sont environ 100 fois plus efficaces que les bicyclams connectés par une chaîne aliphatique.⁽¹⁵⁰⁾ Ainsi, le dérivé AMD3100 est capable de bloquer la réplication du VIH-1 et le VIH-2 à des CI_{50} de 1-10 nM.⁽¹⁵¹⁾

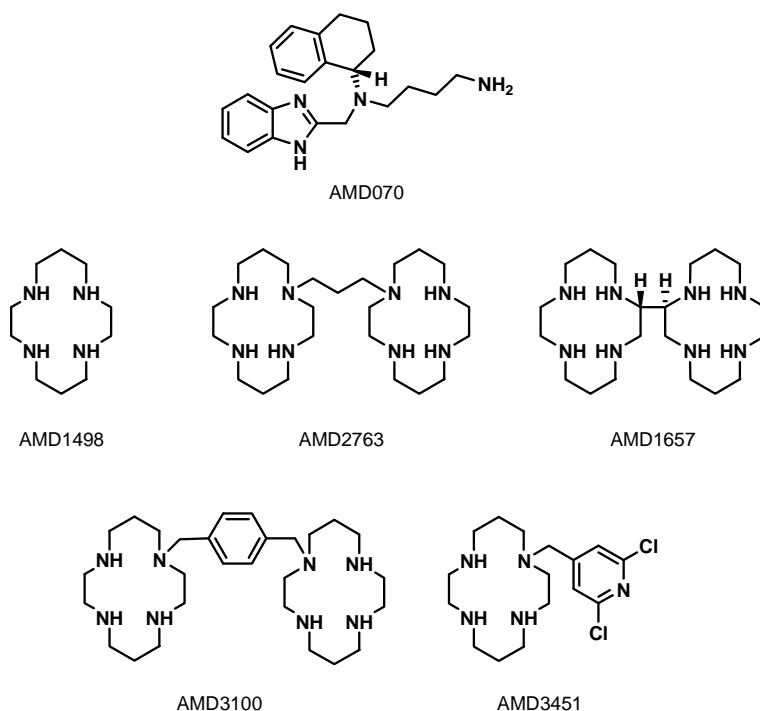


Figure I.24 Inhibiteurs du corécepteur CXCR4 et AMD3451, inhibiteurs des corécepteurs CXCR4 et CCR5

Finalement, le dérivé N-pyridinylméthylecyclam AMD3451 (Figure I.24) possède la particularité de bloquer l'entrée virale aussi bien pour le VIH-1 R5 que pour le VIH-1 X4 avec des concentrations actives entre 1,2 et 26,5 μM en fonction de la nature des cellules ciblées.⁽¹⁵²⁾ Leur capacité à agir contre les virus VIH-1 :R5, R5/X4 et X4 permet de traiter le patient qui peut être infecté par plusieurs types de VIH-1.

Holan *et al.*⁽⁹³⁾ ont réussi à améliorer l'activité de ces bicyclams par la présentation multivalente de ce monocyclam sur un dendrimère PAMAM de génération 4 avec 12 groupes monocyclam à la surface et connectés au dendrimère par un pont aromatique (Figure I.25). Ce dendrimère est jusqu'à 500 fois plus actif ($\text{CI}_{50} = 0,054 \mu\text{M}$, $\text{RCI}_{50} = 0,65 \mu\text{M}$) que ces analogues bicyclams. L'activité semble augmentée par un effet de multivalence.

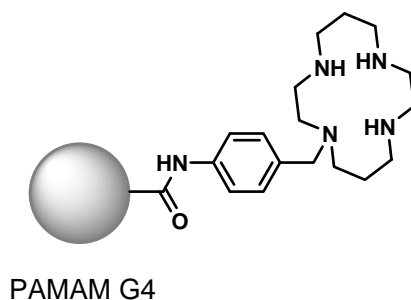


Figure I.25 Dendrimère PAMAM de génération 4 à terminaisons bicyclam

Un autre inhibiteur de CXCR4 est le KRH-1636 (Figure I.26),⁽¹⁵³⁾ qui présente une très bonne biodisponibilité orale et une bonne activité antivirale contre les souches X4 et R5X4 du VIH-1 (CI_{50} entre 1 et 4,2 nM). Le fragment guanidine présent sur cet inhibiteur a été greffé sur un squelette dendritique PAMAM de génération 4. Ce dernier possède une bonne activité anti-VIH ($CI_{50} = 0,27 \mu\text{M}$). Dans ce cas, on ne trouve pas d'effet de multivalence.⁽⁹³⁾ Cela suggère que les groupes aromatiques du KRH-1636 jouent un rôle important dans les interactions avec le CXCR4. Les groupes aromatiques sont probablement nécessaires pour interagir avec la région hydrophobe de CXCR4 en améliorant l'attachement.

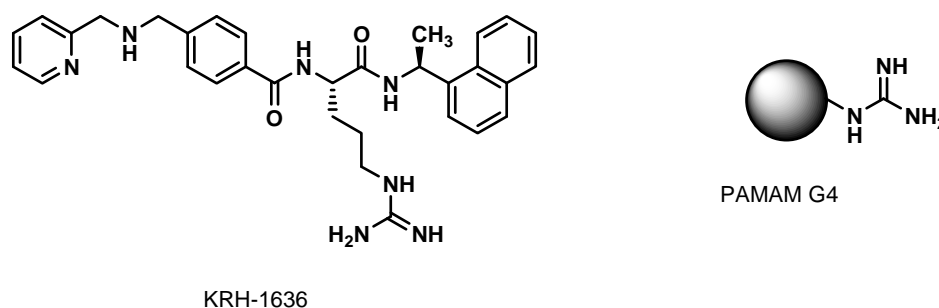


Figure I.26 Structure du KRH-1636 et du dendrimère PAMAM à terminaisons guanidine

Interaction avec le récepteur DC-SIGN

Le DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin) est une protéine transmembranaire de type II qui présente un domaine de reconnaissance carbohydrate (CRD) à l'extrémité C (Figure I.27). Le DC-SIGN est un récepteur impliqué durant le processus d'infection par le VIH.^(154, 155) Il est présent principalement dans les cellules dendritiques (DC) qui sont présentes à la surface des muqueuses. Ces cellules jouent un rôle clé dans les processus de reconnaissance et de capture de pathogènes et postérieurement dans l'activation du système immunitaire contre cette invasion.⁽¹⁵⁶⁾ Les principales régions exposées à l'infection par le VIH sont la muqueuse rectale, vaginale et cervicale. De façon exclusive, le VIH infecte les lymphocytes T CD4(+) ou macrophages qui sont rarement présents dans ces régions. Cela peut s'expliquer car le VIH (les deux types de souches, R5 et X4) utilise l'interaction spécifique de la gp120 avec le DC-SIGN pour être transporté par les cellules dendritiques jusqu'aux sites lymphocytaires où les cellules T sont disponibles.⁽¹⁵⁷⁾

Le DC-SIGN polymérise en homo-tétramères qui présentent 4 CRDs (domaines carbohydrate de reconnaissance à l'extrémité C). Au niveau de la membrane plasmique, le DC-SIGN est organisé en microdomaines.⁽¹⁵⁸⁾ L'interaction entre cette lectine de type C et les structures avec un nombre élevé d'unités de mannoses présents dans les glycoprotéines des pathogènes est multivalente

et calcium dépendante.^(159, 160) Pour concevoir des inhibiteurs de cette interaction, ils doivent mimer l'organisation naturelle des mannoses dans les glycoprotéines d'enveloppe du virus.



Figure I.27 Structure protéique du DC-SIGN attaché à l'oligosaccharide GlcNAc-Man₃-GlcNAc

Une approche de ce type d'inhibiteurs consiste en l'utilisation de glycodendrimères pour stopper la fixation des sites DC-SIGN. Pour cela, Rojo *et al.* ont utilisé des dendrimères de type Boltorn de génération 2 et 3 qui sont disponibles commercialement (Figure I.28).^(161, 162) Ces dendrimères sont composés par des unités polyester à extrémités hydroxyle.

Ces dendrimères ont été fonctionnalisés avec le monosaccharide mannose en utilisant un connecteur succinyle à travers une liaison peptidique qui apporte de la flexibilité au sucre.⁽¹⁶³⁾ Ces dendrimères sont parfaitement solubles en conditions physiologiques. De plus, ils ne sont pas toxiques jusqu'à des concentrations supérieures à 3 mM dans les lignées cellulaires testés COS-7 et 293-T. Le dendrimère de troisième génération inhibe directement l'entrée de l'Ebola à travers du DC-SIGN à des concentrations nanomolaires (CI₅₀ 337 nM ; IT > 10000). De plus, ce dendrimère est capable de bloquer spécifiquement le DC-SIGN à la même échelle de concentrations. Cela est exploitable pour l'inhibition de l'entrée du VIH qui utilise le même mécanisme dans les cellules dendritiques.⁽¹⁶⁴⁾

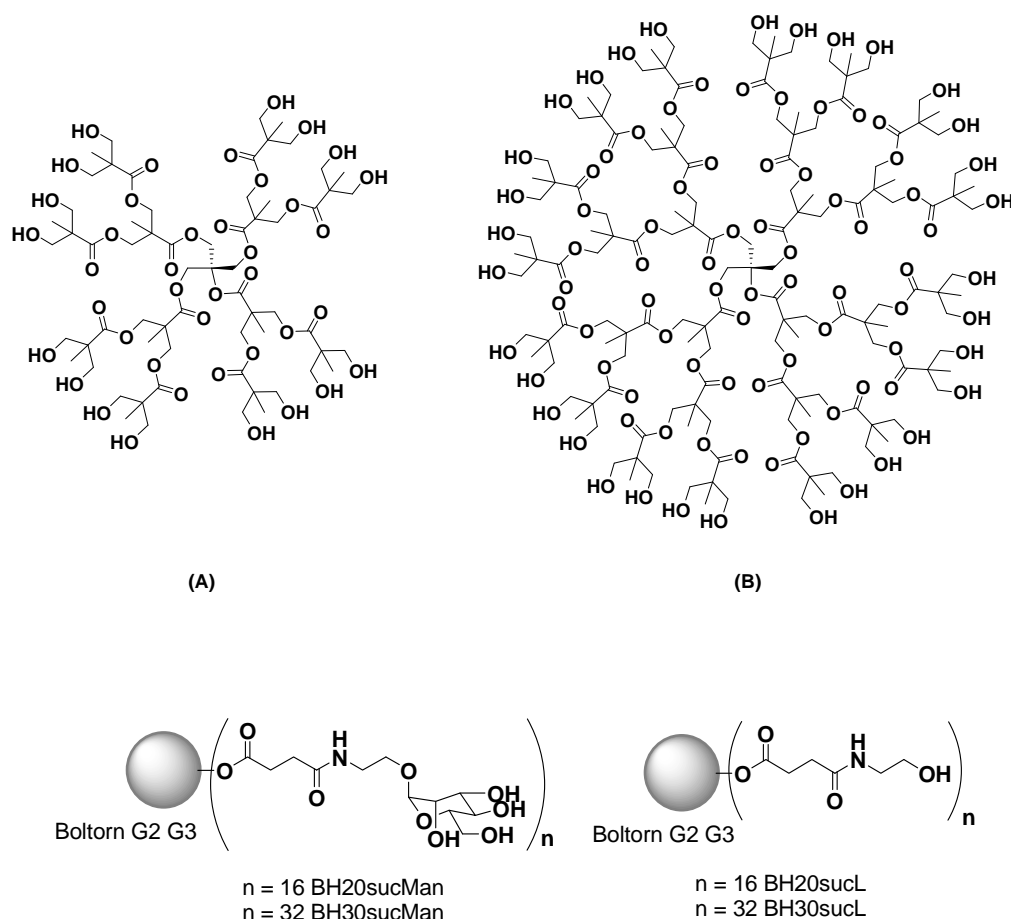


Figure I.28 Structure chimique des dendrimères de type Boltorn : (A) de deuxième génération, BoltornTMH20 et (B) de troisième génération, BoltornTMH30. En dessous, les dendrimères fonctionnalisés avec le mannose (sucMan) et non fonctionnalisés (sucL)

Afin d'analyser le mode de fixation, les auteurs ont produit deux formes différentes de DC-SIGN : le monomérique CRD et le tétramérique ECD. Le CRD possède seulement un site d'attachement alors que la forme tétramérique ECD en contient 4 pour les ligands carbohydrates et peut promouvoir l'interaction multivalente. Ces protéines servent à fonctionnaliser trois surfaces différentes en utilisant une puce de carboxydextrane CM4. Ce système nommé BIAcore permet d'étudier les interactions protéine-ligand et l'affinité d'attachement par l'utilisation de la résonance plasmon de surface, un phénomène optique permettant de détecter des interactions en temps réel.

Les surfaces sont fonctionnalisées avec le DC-SIGN ECD à haute densité (HD) et à basse densité (BD). Une troisième est fonctionnalisée avec le DC-SIGN CRD à une densité moléculaire qui correspond à celle de la surface EDC HD. Malgré une même densité de molécules de protéine la surface à DC-SIGN ECD présente 4 fois plus d'unités de CRD qui a une organisation monomérique (Figure I.29).

Ces surfaces ont été utilisées pour tester les propriétés d'attachement des différents dendrimères. Les dendrimères sans carbohydrates (BH20sucL et BH30sucL = dendrimères Boltorn respectivement de deuxième et troisième génération avec un connecteur succinyle et terminaison hydroxyle) et le dendrimère BH20sucMan (à terminaison mannose) ne s'attachent à aucune des surfaces. Par contre, le dendrimère BH30sucMan interagit avec la surface à ECD à haute densité mais il ne reconnaît pas la surface à CRD, suggérant que le mode d'interaction est multivalent. La surface avec une densité élevée d'ECD imite mieux l'organisation naturelle du DC-SIGN à la surface de la cellule qui forme des clusters dans des radeaux lipidiques.⁽¹⁵⁸⁾

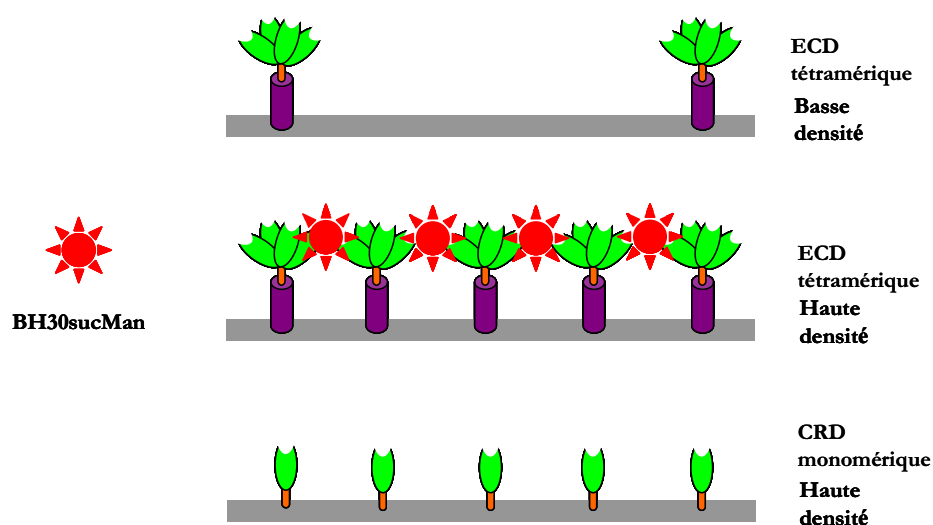


Figure I.29 Biacore fonctionnalisé avec de CRD et ECD à BS et à HD et leur interaction avec le dendrimère BH30sucMan

Des essais de compétition ont été réalisés pour connaître la capacité de ces dendrimères à inhiber l'interaction gp120/DC-SIGN. La gp120 a une constante d'affinité pour DC-SIGN dans l'échelle du nanomolaire.⁽¹⁵⁵⁾ La concentration active du dendrimère BH30sucMan déterminée par ces expériences de compétition est de 50 μ M. On constate également que plus la densité de gp120 est basse, plus le pouvoir inhibiteur du dendrimère est fort. La tomographie électronique révèle en effet qu'un virion de VIH-1 possède 8 à 10 trimères de gp120 à sa surface.⁽¹⁶⁵⁾ Cette faible densité naturelle de la gp120 sur le virion renforce l'approche inhibitrice en utilisant des glycodendrimères.

En utilisant une stratégie similaire, Wang *et al.* ont synthétisé des dendrimères de type AB₃ avec un squelette polyétheramide à terminaisons Man₄ ou Man₉.⁽¹⁶⁶⁾ Les fragments carbohydrates sont couplés au squelette dendritique par cycloaddition de Huisgen (Figure I.30).⁽¹⁶⁷⁾

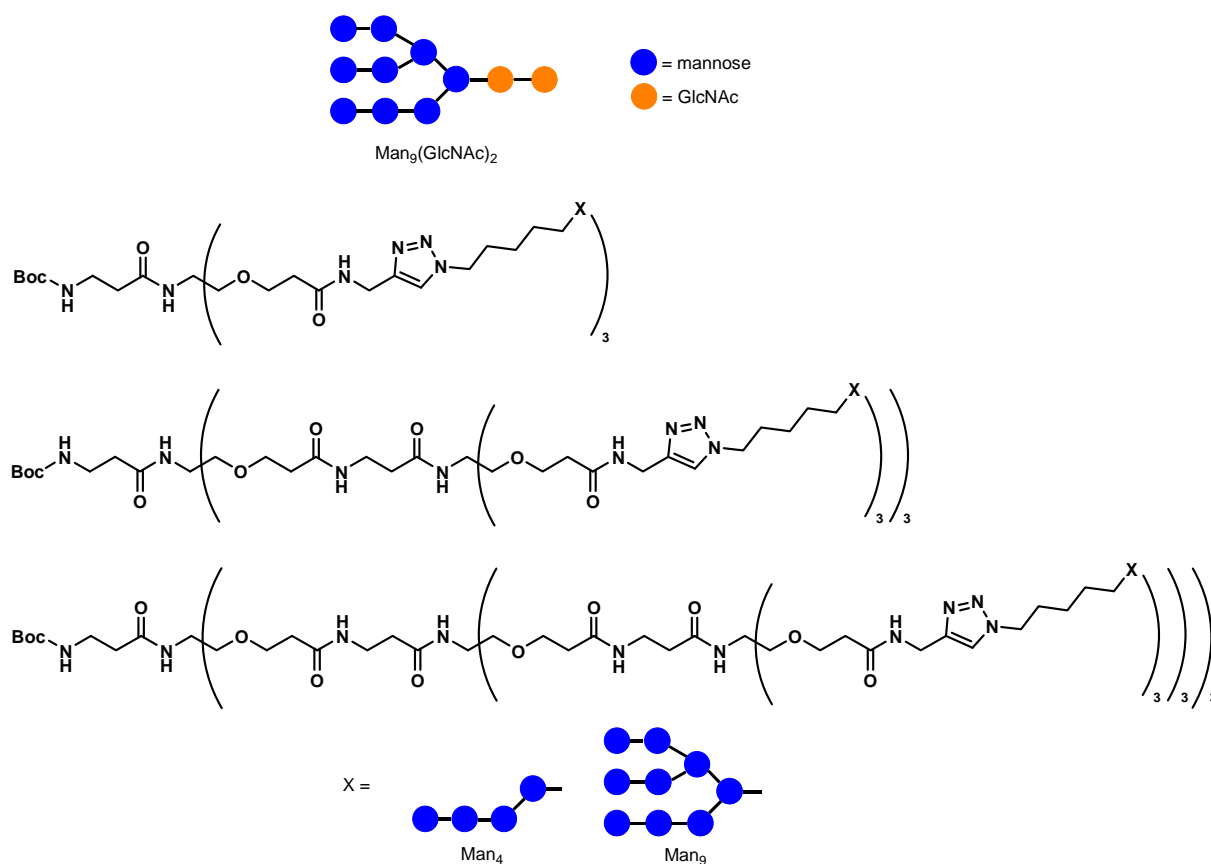


Figure I.30 Structure de $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ et des dendrimères de type AB_3 avec terminaisons Man_4 et Man_9

Pour déterminer comment les dendrons interfèrent dans l'interaction entre la gp120 et DC-SIGN, des études ELISA gp120/Fc-DC-SIGN ont été réalisées (Fc-DC-SIGN est la portion extracellulaire C-terminale de DC-SIGN fusionnée avec un fragment de l'immunoglobuline humaine IgG1-Fc). Le dendron de deuxième génération possède la taille et la densité de mannose optimales. En effet, il montre une excellente inhibition dans l'échelle du nanomolaire (CI_{50} 0,020 et 0,008 μM , respectivement pour Man_4 et Man_9) à la différence du mannose monomérique $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ ($\text{CI}_{50} = 8,5 \text{ mM}$) dont l'inhibition est de l'ordre du millimolaire. On constate un effet multivalent. Les dendrons sans mannoses ne montrent pas d'inhibition jusqu'à 0,1 mM, ce qui indique que l'oligomannose multivalent est responsable de la liaison avec DC-SIGN. On peut conclure que ces glycodendrimères inhibent efficacement l'interaction DC-SIGN/gp120 avec des concentrations actives de l'ordre du nanomolaire. Cette activité est jusqu'à plus de 6000 fois supérieure à celle du dendrimère Boltorn de génération 3 à terminaisons mannose ($\text{CI}_{50} = 50 \mu\text{M}$) probablement grâce à la présence des mannoses oligomériques à la surface, cela augmentant l'interaction du dendrimère avec DC-SIGN.

1.2.3.3.2 Inhibiteur de fusion

L'interaction de la gp120 avec un corécepteur (CXCR4 ou CCR5) découvre la gp41, dont le dépliage permet à son extrémité N-terminale (dit peptide de fusion) de s'ancrer dans la membrane cellulaire. En amont de ce peptide de fusion se trouvent deux domaines protéiques (dits HR1 et HR2) dont l'interaction spécifique permet à la gp41 étendue de se replier sur elle-même, favorisant de ce fait le rapprochement de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Au cours de cette fusion, la gp41 étendue est temporairement vulnérable à un agent capable de se lier à l'un des deux domaines bloquant ainsi son repliement.^(168, 169) Un premier succès a été obtenu avec le T-20 (ou Enfuvirtide) (Triméris, Roche), un peptide de 36 acides aminés qui bloque la fusion de l'enveloppe virale *in vitro* et *in vivo*. Il est l'unique inhibiteur de fusion agréé par la FDA pour une utilisation clinique (Figure I.31).⁽¹⁷⁰⁾ Par contre, des résistances dues à des mutations dans la gp41 apparaissent rapidement. De plus, il s'agit d'un traitement par injection sous-cutanée, donc particulièrement contraignant.

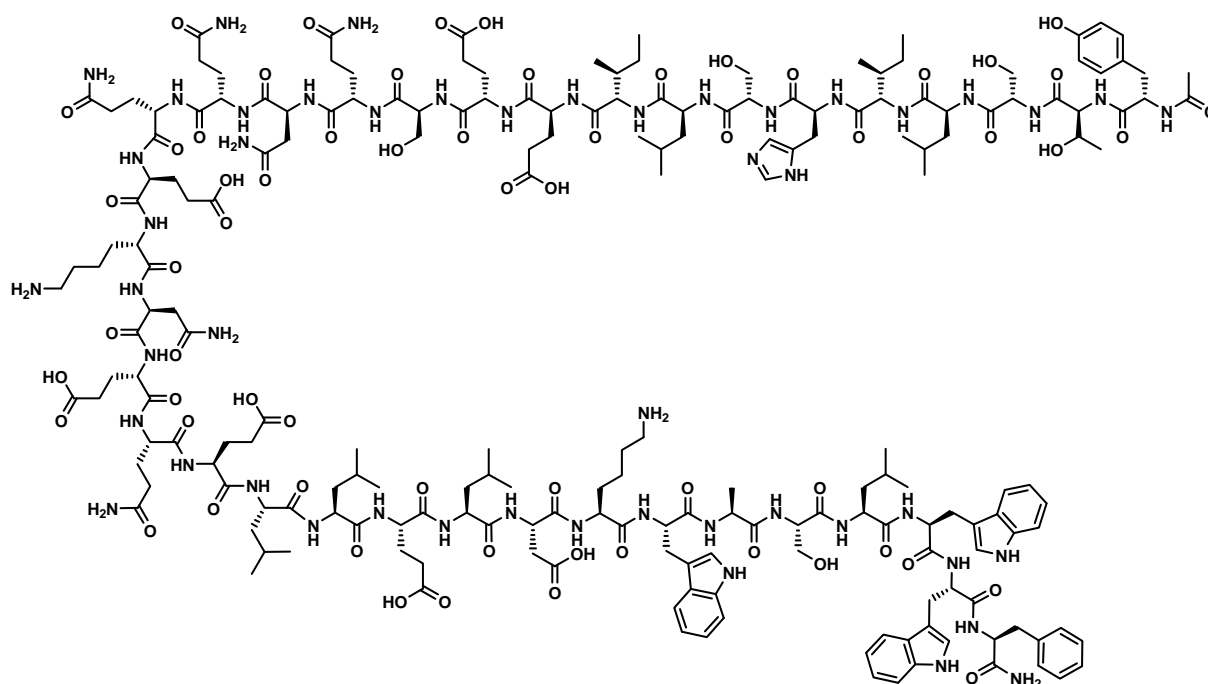


Figure I.31 Structure de l'Enfuvirtide, un inhibiteur de fusion du VIH

Quant au développement de dendrimères à propriétés anti-fusion, il en existe un seul exemple décrit précédemment (c.f. I.2.3.3.1.3) : le dendrimère peptidique SPC3 avec 8 fragments de la région GPGRAF de la boucle V3 de la gp120. Contrairement à l'Enfuvirtide, il n'agit pas sur la gp41, la

glycoprotéine responsable de la fusion virus-cellule, il agit sur les cellules CD4(+) sans interférer avec le récepteur CD4 en empêchant une liaison additionnelle nécessaire pour la fusion. Le SPC3 est donc capable d'éviter l'infection dans les lymphocytes CD4(+) avec une concentration active de 50 nM quand il est ajouté 1h après le contact initial entre le virus et les cellules par interférence de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Ces résultats sont cohérents avec les analyses cinétiques de la pénétration du VIH dans des cellules CD4(+) qui montrent que l'entrée du virus a lieu en plusieurs étapes, la fixation à la surface cellulaire étant l'étape limitante.^(171, 172)

D'autre part, le peptide est aussi capable de bloquer la fusion cellule-cellule (syncytia) induite par le VIH-1.^(137, 138)

I.2.3.4 Inhibiteurs du cycle de réplication

Après la découverte de la maladie du SIDA, les premières approches thérapeutiques ont consisté à bloquer les processus enzymatiques impliqués dans la réplication du VIH. La transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase sont donc les premières cibles thérapeutiques et leurs inhibiteurs sont les premiers médicaments employés en polythérapies anti-VIH.

I.2.3.4.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse

La transcriptase inverse du VIH-1 catalyse la synthèse de l'ADN proviral et utilise comme patron l'ARN viral.⁽¹⁷³⁾ Ce processus de rétrotranscription est une des étapes centrales de la réplication du VIH. Pour cette raison, la plupart des médicaments utilisés pour combattre le VIH sont des inhibiteurs de cette étape.

Les principes actifs antirétroviraux qui ciblent la transcriptase inverse du VIH-1 peuvent être classés en fonction de leur structure chimique et de leur mécanisme d'action selon 3 familles : les inhibiteurs nucléosidiques (INTI), les inhibiteurs nucléotidiques (INtTI) et les inhibiteurs non-nucléosidiques (INNNTI).⁽²²⁾

I.2.3.4.1.1 Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

Ces inhibiteurs nucléosidiques sont des analogues des nucléotides naturels (Figure I.32). Ils rentrent en compétition avec les nucléotides lors de la croissance de l'ADN viral. Pour cela, ils

doivent subir *in vivo* une phosphorylation et de cette façon, les dérivés triphosphate sont générés. Ces derniers sont capables de s'associer à l'enzyme, en stoppant la croissance de l'ADN viral en raison de l'absence d'un groupement OH en position 3' qui est nécessaire pour la formation d'une liaison ester avec le groupement phosphate du nucléotide suivant.⁽¹³⁾ Ils diminuent ainsi la charge virale dans le plasma jusqu'à une quantité presque négligeable. Par contre, ils provoquent de graves effets secondaires liés à une forte toxicité et l'apparition de multiples résistances du virus.

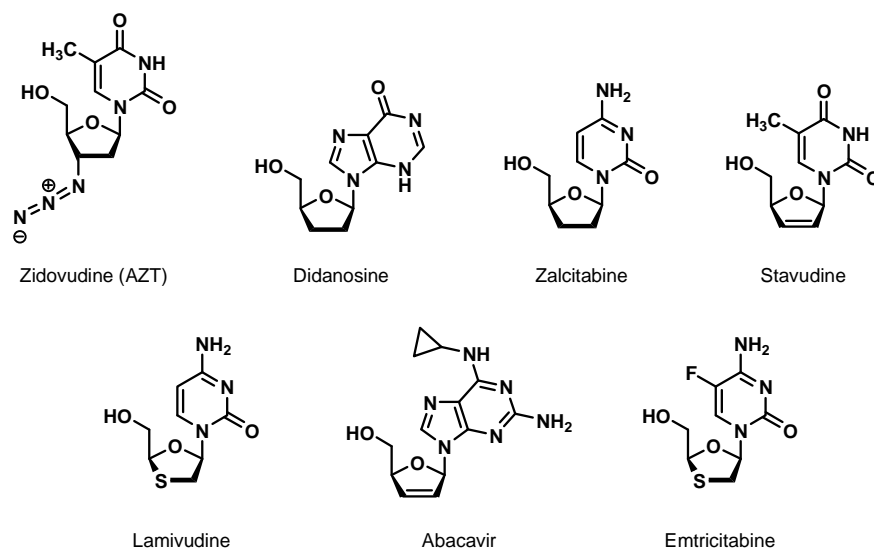


Figure I.32 Structures des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse employés pour la thérapie anti-VIH

I.2.3.4.1.2 Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse ont le même mécanisme d'action que les inhibiteurs nucléosidiques mais ils possèdent déjà un site phosphorylé à fin d'éviter la première étape de phosphorylation qui est la plus lente. Le Ténofovir administré sous forme de disoproxil fumarate (Figure I.33) est le seul INTI utilisé.

Parmi les effets secondaires provoqués par ce médicament, on trouve des signes de pancréatite, de dysfonction rénale et des troubles hépatiques. Par contre, les mutations liées à la résistance au traitement avec Ténofovir sont peu fréquentes.

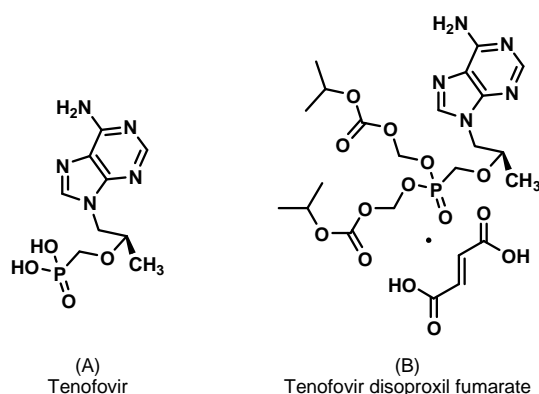


Figure I.33 Structure du Tenofovir (A) et sa formulation (B)

I.2.3.4.1.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) sont spécifiques du VIH-1 (Figure I.34).⁽¹⁷⁴⁾ Ils sont capables de se fixer sur la transcriptase inverse du VIH-1 mais pas sur celle du VIH-2 ou d'autres rétrovirus. Ils interagissent directement avec une poche allostérique de l'enzyme située à environ 15 Å de leur centre catalytique.⁽¹⁷⁵⁾ Les INNTI provoquent un changement conformationnel de l'enzyme par des interactions hydrophobes et diminuent son activité.⁽¹⁷⁶⁾ De manière non-compétitive, les INNTI bloquent l'interaction entre l'enzyme et le substrat.

Ces inhibiteurs jouent un rôle important en polythérapie à cause de leur grande sélectivité et d'une concentration active dans une gamme nanomolaire.⁽¹⁷⁷⁾ Malheureusement, plusieurs études montrent que le traitement avec ces produits conduit à l'apparition de résistance virale. Des éruptions cutanées et des lésions graves au foie apparaissent comme effets secondaires de ces médicaments.

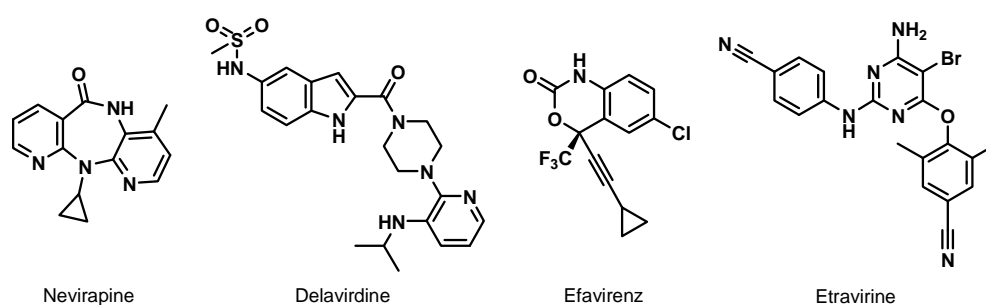


Figure I.34 Structures des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH

I.2.3.4.1.4 Dendrimères comme pro-médicaments inhibiteurs de la transcriptase inverse

Un pro-médicament est une substance médicamenteuse dont le principe actif a besoin d'être transformé, par exemple par des enzymes situées dans les cellules, pour avoir une action thérapeutique efficace.

Dans ce contexte, un exemple de dendrimère pro-médicament anti-VIH est celui développé par Liang *et al.*⁽¹⁶⁶⁾ Le (-)- β -D-(2R,4R)-dioxolanéthymine (DOT) (un inhibiteur nucléosidique de la TI) a une activité anti-VIH contre la plupart des VIH-1 mutants résistants aux INTIs. Les modèles moléculaires montrent que le fragment dioxolane du DOT joue un rôle clé dans la stabilisation de la liaison de la transcriptase inverse du VIH-1 mutant et la nucléoside triphosphate.^(178, 179) Une façon d'augmenter leur efficacité est d'améliorer leur pénétration intracellulaire et leur phosphorylation initiale par la kinase, tout en protégeant la forme triphosphate d'une rapide dégradation. Pour cela, les dendrimères PAMAM et le PEG ont été utilisés comme système de transport (Figure I.35).

Le DOT est attaché aux structures branchées à travers des groupes ester ou phosphate capables de libérer *in vivo* le DOT. Ces connecteurs sont très importants pour l'étape d'activation du DOT car les enzymes vont cliver puis libérer le médicament.

Quatre générations de dendrimères PAMAM 2, 3, 5 et 6 sont utilisées en tant que systèmes de transport du DOT (Figure I.35). La synthèse des dendrimères PAMAM conjugués avec du DOT a lieu à partir des dendrimères PAMAM à cœur diaminehexane et à terminaisons acide succinamique qui vont réagir avec les groupes 5'-hydroxyle du groupe DOT. De plus, les analogues conjugués par un groupe phosphonate au lieu d'un groupe ester ont aussi été synthétisés. Les conjugués PEG-DOT avec connecteur ester et phosphate ont également été synthétisés. L'incorporation de DOT dans les dendrimères n'est pas complète à cause de l'empêchement stérique des dendrimères employés. En conséquence ces dendrimères ont aussi des fonctions acide succinamique à la surface. Par contre, l'incorporation de DOT sur le PEG est complète (Figure I.35).

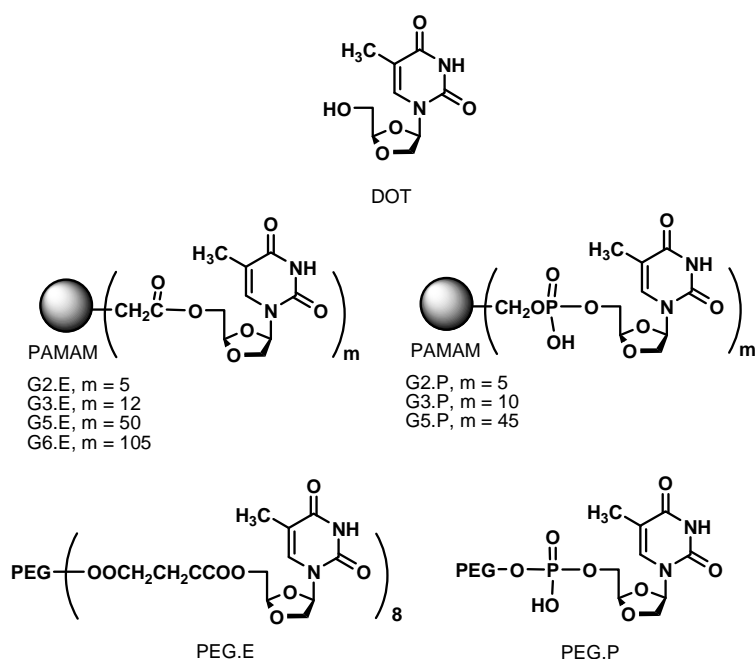


Figure I.35 Inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH

L'activité contre le VIH-1(LAI) de ces dérivés DOT a été testée sur des cellules PBMC. Leur cytotoxicité a été évaluée sur des cellules PBMC (Tableau I.5). On constate que sauf pour le dendrimère G2.P il y a une perte d'activité à cause du greffage, car les valeurs de RCI_{50} des autres dendrimères sont égales ou supérieures à la CI_{50} du DOT. Quant à la toxicité, elle est peu modifiée.

Composé	N	CI_{50} (μM)	RCI_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IT
G2.E	5	0,13	0,65	>100	>769
G3.E	12	0,17	2,04	>100	>588
G5.E	50	0,04	2,00	9,7	242
G6.E	105	>10	>1050	5,5	<0,6
G2.P	4	0,004	0,016	8,5	2125
G3.P	10	0,11	1,10	4,4	40
G5.P	45	<0,01	<0,45	3,6	>360
PEG.E	8	4,9	39,2	>50	>10
PEG.P	8	>100	>800	>100	1
DOT	1	0,56	0,56	>100	>178

Tableau I.5 Valeurs de l'activité, de la cytotoxicité et de la sélectivité des dendrimères PAMAM à terminaisons DOT et des conjugués PEG-DOT sur des cellules PBMC

D'autre part, les dendrimères conjugués avec du DOT par des liaisons phosphonate possèdent une activité anti-VIH plus élevée (jusqu'à 140, 5 et 56 fois plus respectivement pour les dendrimères de génération 2, 3 et 5) en comparaison avec du DOT. Dans ce cas, il y a un effet multivalent mais pas dendritique car la valeur de RCI_{50} de G2.P indique qu'il est jusqu'à 69 fois plus actif que ses analogues de générations supérieures (Tableau I.5). Les conjugués PAMAM-DOT par des liaisons phosphonate sont cytotoxiques à des concentrations entre 3,6 et 8,5 μ M. Ainsi, le dendrimère de génération 2 est le plus sélectif avec un index thérapeutique de 2125.

Finalement, les conjugués PEG-DOT sont moins efficaces que les analogues dendritiques et le DOT, avec des index thérapeutiques entre 1 et 10. Le clivage enzymatique des connecteurs entre le porteur et le médicament dans le plasma sanguin est vraisemblablement la première étape d'activation de ces pro-médicaments. Les faibles activités anti-VIH des conjugués PEG-DOT peuvent être causées par l'incapacité de ces estérases à cliver le DOT. Cela indique que l'activité antivirale dépend fortement du type de système de transport et du type de liaison entre le système de transport et le médicament.

Ces résultats préliminaires suggèrent que le dendrimère de génération 2 avec le connecteur phosphate peut être utile comme pro-médicament du DOT.

I.2.3.4.1.5 Vectorisation des inhibiteurs de la transcriptase inverse par les dendrimères

Les principes actifs utilisés actuellement en polythérapies sont très efficaces mais en contrepartie ils présentent une toxicité élevée en raison du manque de spécificité pour les cellules infectées et saines mais aussi à cause d'un manque de biodisponibilité. Un des défis consiste à trouver des systèmes de vectorisation biologiques pour la délivrance spécifique au niveau cellulaire dans le but de réduire la dose de principe actif administrée en améliorant l'efficacité biologique, d'augmenter le temps de séjour et de diminuer la toxicité de ces principes actifs.

Un système de transport de médicament est un dispositif dans lequel le médicament est encapsulé ou attaché à ce système qui peut être un polymère synthétique, un anticorps ou un liposome.⁽⁷⁹⁾ Les paramètres comme la spécificité et la minimisation des effets secondaires peuvent être modifiés en modulant les propriétés des conteneurs car l'adsorption et la distribution des médicaments de chaque système dépendent des propriétés des systèmes de transport.^(180, 181)

Comme nous l'avons déjà vu, le Lamivudine (3TC) (INTI) et l'Efavirenz (EFV) (INNTI) sont des inhibiteurs de la transcriptase inverse qui présentent des importants effets secondaires associés aux fortes variations de concentration du médicament dans le plasma sanguin.⁽¹⁸²⁾ L'administration de ces composés directement aux cellules infectées est donc souhaitable. La baisse du dosage du

médicament et la prévention ou la minimisation de leur effet dans les cellules non infectés pourraient réduire les effets secondaires.

D'autre part, les macrophages infectés sont considérés comme des réservoirs pour la dissémination du virus. Le traitement de l'infection du VIH doit arriver à ces cellules et aux organes comme le cerveau, le foie et la moelle osseuse. Les récepteurs lectine qui agissent comme cibles moléculaires ont des molécules de sucre comme le mannose ou le galactose.⁽¹⁸³⁾ Les récepteurs mannose sont présents dans la surface de la lignée macrophage/monocyte (Mo/Mac), c'est-à-dire, les macrophages alvéolaires, les astrocytes dans le cerveau, les hépatocytes dans le foie, etc. Une approche pour cibler les antirétroviraux vers les macrophages infectés est l'utilisation de dendrimères à terminaisons mannose ou galactose chargés avec le médicament en augmentant sa sécurité, son efficacité et sa sélectivité.⁽¹⁸⁴⁾ Pour cela, Dutta *et al.*⁽⁶⁸⁾ ont exploré et comparé l'activité d'un dendrimère PPI de génération 5 et de son analogue à terminaisons mannose nommé MPPI (Figure I.36), chargés de 3TC. Ces molécules peuvent encapsuler le médicament et améliorer sa pénétration cellulaire et son activité anti-VIH. Le relargage du médicament se produit à une vitesse contrôlée durant un temps prolongé.

L'efficacité d'encapsulation de médicaments pour ces dendrimères PPI et MPPI est respectivement de 36% et de 43% (p/p). La capacité d'encapsulation augmente avec la présence du mannose. En effet, le nombre des groupes fonctionnels disponibles pour la complexation du médicament augmente et l'empêchement stérique évite la libération du médicament par rapport au PPI qui a une structure plus ouverte. Pour les mêmes raisons, le profil de libération du médicament en PBS (pH 7,4) est 20 fois plus lent pour le MPPI que pour le PPI, grâce à la structure plus fermée du MPPI. Ce contrôle de la vitesse de libération du médicament par le système de transport prolonge ainsi le temps d'action du médicament en réduisant ses effets secondaires.

D'autre part, le dendrimère MPPI est 4 fois moins toxique que le dendrimère PPI sur des cellules MT2. En effet, la protection des groupes amine superficiels avec le mannose réduit la cytotoxicité inhérente aux dendrimères cationiques.^(57, 58, 68)

Quant à la pénétration cellulaire, celle de MPPI est 8,3 fois supérieure à celle du PPI et 21 fois supérieure à celle du 3TC libre. La formulation MPPI-3TC possède une activité anti-VIH 1,5 fois supérieure à celle du 3TC libre ou de la formulation PPI-3TC, ce qui suggère que le dendrimère MPPI a une meilleure aptitude à viser le récepteur cible grâce à la présence des unités de mannose.

On peut conclure que le MPPI augmente la sécurité et l'efficacité des agents anti-VIH en réduisant leur dose et leurs effets secondaires.

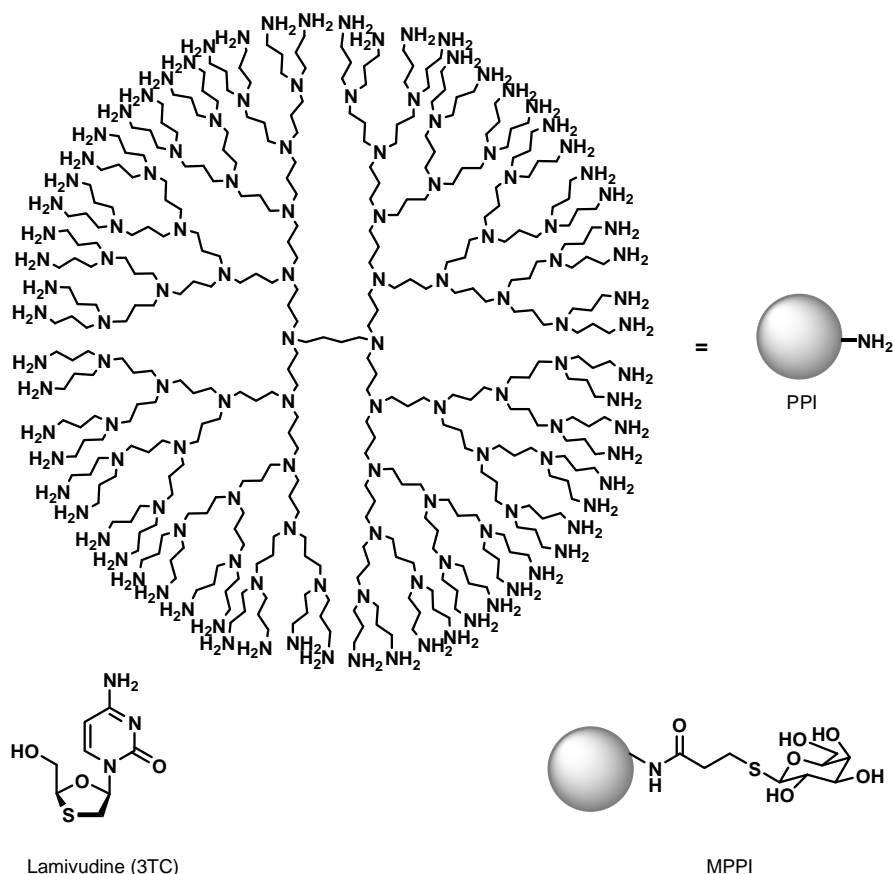


Figure I.36 Structures des dendrimères PPI et MPPI employés pour l'encapsulation de 3TC

De façon similaire, les mêmes auteurs ont aussi utilisé ces dendrimères PPI et MPPI et leur analogue à terminaisons t-Boc-glycine nommé TPPI (Figure I.37) pour encapsuler l'Efavirenz ou EFV et le diriger vers les cellules Mo/Mac.⁽⁶⁸⁾

Parmi ces trois dendrimères, le PPI montre une activité hémolytique (89%) et une cytotoxicité élevée ($CC_{50} = 18 \mu\text{M}$) sur des cellules hépatome humaine (HepG2) à cause de la présence des 64 groupes amine protonables. Dans le cas de TPPI et de MPPI, ils possèdent une très faible activité hémolytique (respectivement 5,3% et 2,8%) et une faible cytotoxicité grâce au camoufflage des charges positives des groupes amine.

D'autre part, l'efficacité d'encapsulation d'EFV par les dendrimères est de 32% pour le PPI, 23% pour le TPPI et 47% (p/p) pour le MPPI. L'augmentation de l'encapsulation d'EFV par le MPPI par rapport au PPI était déjà rationalisée précédemment. Le TPPI montre une capacité d'encapsulation inférieure probablement à cause de la lente infiltration du médicament dans ses cavités.

De plus, la vitesse de libération d'EFV pour TPPI et pour MPPI est inférieure à celle pour le PPI. Tandis que le PPI a libéré complètement l'EFV après 24h, leurs analogues prolongent le temps de libération jusqu'à 144h (83% pour TPPI et 91% pour le MPPI). Le TPPI et le MPPI sont des

systèmes de transport de médicaments contrôlés. De plus, le groupe terminal *tert*-butyle de TPPI est hydrolysé à pH acide, il peut donc être utilisé pour le développement de systèmes de transport sensibles au pH (Figure I.37).

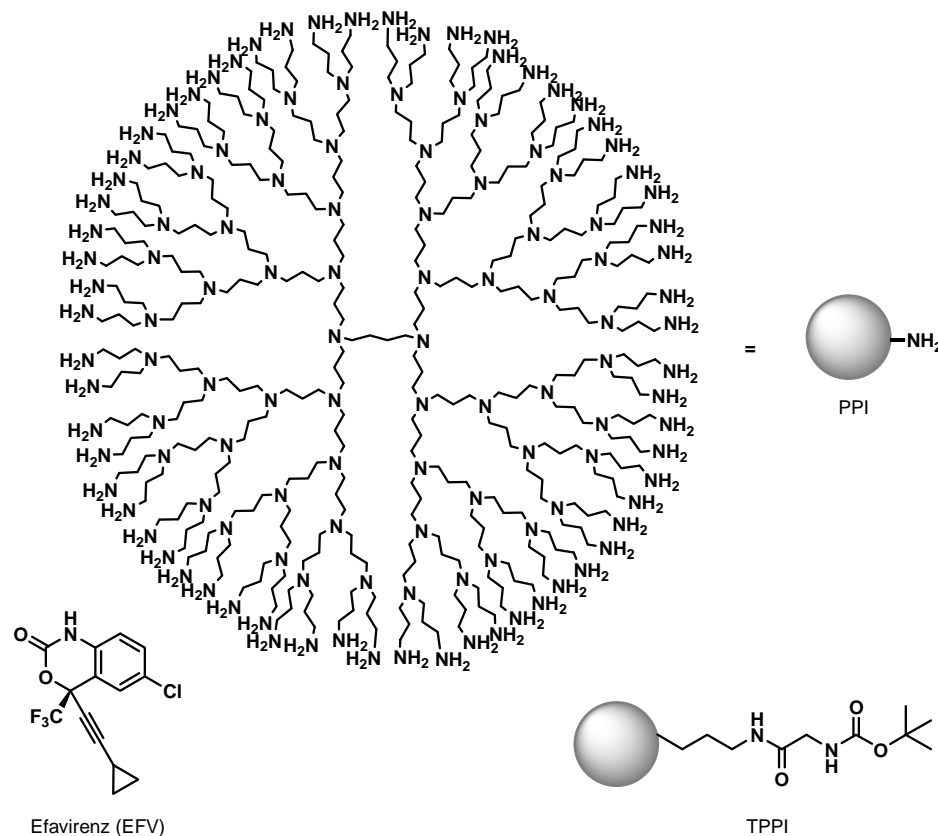


Figure I.37 Structures des dendrimères PPI et TPPI employés pour l'encapsulation d'EFV

L'incubation des cellules Mo/Mac avec l'EFV et leurs formulations à une concentration de 0,3 mM montrent que les cellules incubées avec le PPI ont une très basse viabilité (11%), par contre les cellules incubées avec l'EFV, le TPPI et le MPPI montrent une viabilité proche de 100% à la dose sélectionnée. En conséquence, le PPI n'est pas utilisé pour les études de pénétration cellulaire.

Ainsi, quand le MPPI est utilisé, la pénétration de l'EFV est respectivement 12 et 5,5 fois plus élevée que pour le médicament libre et le TPPI à 48h. Dans le cas de TPPI, la pénétration du médicament est 2,2 fois plus forte que pour l'EFV libre à 48h. Le TPPI montre une rapide pénétration cellulaire jusqu'à 8h (5,8 fois plus que l'EFV libre) qui est suivie par une vitesse relativement lente de pénétration. En effet, les deux dendrimères utilisent des mécanismes d'entrée différents.

Le MPPI interagit spécifiquement avec les récepteurs lectine présents à la surface des cellules Mo/Mac, cela favorise la pénétration cellulaire de l'EFV. Dans le cas de TPPI, l'augmentation de la

pénétration est expliquée par la nature lipophile du TPPI. Le TPPI montre une rapide pénétration jusqu'à 8h puis elle ralentit, en suggérant que le mécanisme de pénétration est la phagocytose.

Afin d'améliorer cette stratégie, les auteurs ont décidé d'introduire dans ce type de dendrimère le fragment Tuftsin (TuPPI = des dendrimères poly(propylèneimine) de génération 5 avec des groupements tuftsin conjugués).⁽⁷⁴⁾ Le Tuftsin est un activateur naturel des macrophages. C'est un tétrapeptide (Thr-Lys-Pro-Arg), qui forme une partie de la portion Fc de la chaîne lourde de l'immunoglobuline leucophilique G (résidus 289-292). Ce tétrapeptide est libéré dans le milieu physiologique comme un peptide libre après avoir été coupé enzymatiquement.⁽¹⁸⁵⁾ Ce peptide est connu pour s'attacher spécifiquement aux macrophages, monocytes et leucocytes polymorphonucléaires et possède de nombreuses activités liées aux fonctions du système immunitaire comme la potentialité de plusieurs fonctions cellulaires (par exemple, la phagocytose, la pinocytose, la mobilité, la réponse immunogénique et des activités bactéricides et tumoricides).^(186, 187)

La modification de ce peptide à son extrémité N-terminale conduit à une réduction significative ou même à la perte d'activité biologique et de sa capacité à s'attacher aux leucocytes polymorphonucléaires. Cependant, si on prolonge le peptide à son extrémité C-terminale, cela n'affecte pas l'activité biologique. Dans ces travaux, le C-terminal de la Tuftsin a été conjugué aux groupes amine terminaux du dendrimère PPI de génération 5 (Figure I.38). Il y a en moyenne 24,83 molécules de Tuftsin attachées à chaque molécule de dendrimère.

L'efficacité d'encapsulation du dendrimère TuPPI est comparée avec celle du dendrimère PPI de génération 5. Elle est respectivement de 49% et de 37% (p/p). L'encapsulation de l'EFV a augmenté avec la présence de Tuftsin dans la structure du dendrimère. De nouveau, la présence de groupes volumineux à la surface du dendrimère TuPPI prévient la libération du médicament en comparaison avec la structure ouverte du PPI tout en augmentant sa capacité d'encapsulation.

Les études de cytotoxicité réalisées *in vitro* sur des cellules mononucléaires (Mo/Mac) révèlent que les formulations PPI-EFV et TuPPI-EFV présentent une CC_{50} respectivement de 7,2 mM et de 16 mM. Cette différence de cytotoxicité entre les deux systèmes n'est pas seulement expliquée par la présence des groupes amine primaires chargés positivement dans le PPI^(57, 58, 68) car le tuftsin possède de multiples groupes amine primaires. La formation de TuPPI conduit donc à l'augmentation du nombre de groupes amine primaire dans la molécule de PPI. Cependant, on constate que la cytotoxicité du TuPPI est inférieure à celle du PPI, ce qui peut être dû au volume du peptide qui masque les fonctions cytotoxiques à la périphérie.

La pénétration dans la cellule de TuPPI chargé d'EFV est beaucoup plus élevée que celle du médicament libre (34,5 et 19 fois plus élevée que l'EFV libre après respectivement 1 et 4h),

vraisemblablement grâce à la capacité de la Tuftsine à pénétrer dans les cellules Mo/Mac infectées. Après 24h, la vitesse de pénétration cellulaire du TuPPI dans des cellules Mo/Mac diminue puis augmente de nouveau après 48h. Ce fait indique la fin de la phagocytose du TuPPI. Bien que le PPI-EFV montre une pénétration cellulaire élevée par rapport à l'EFV libre, la vitesse de la pénétration cellulaire de PPI chute après 4h ce qui est lié comme dans les cas précédents à la cytotoxicité élevée.

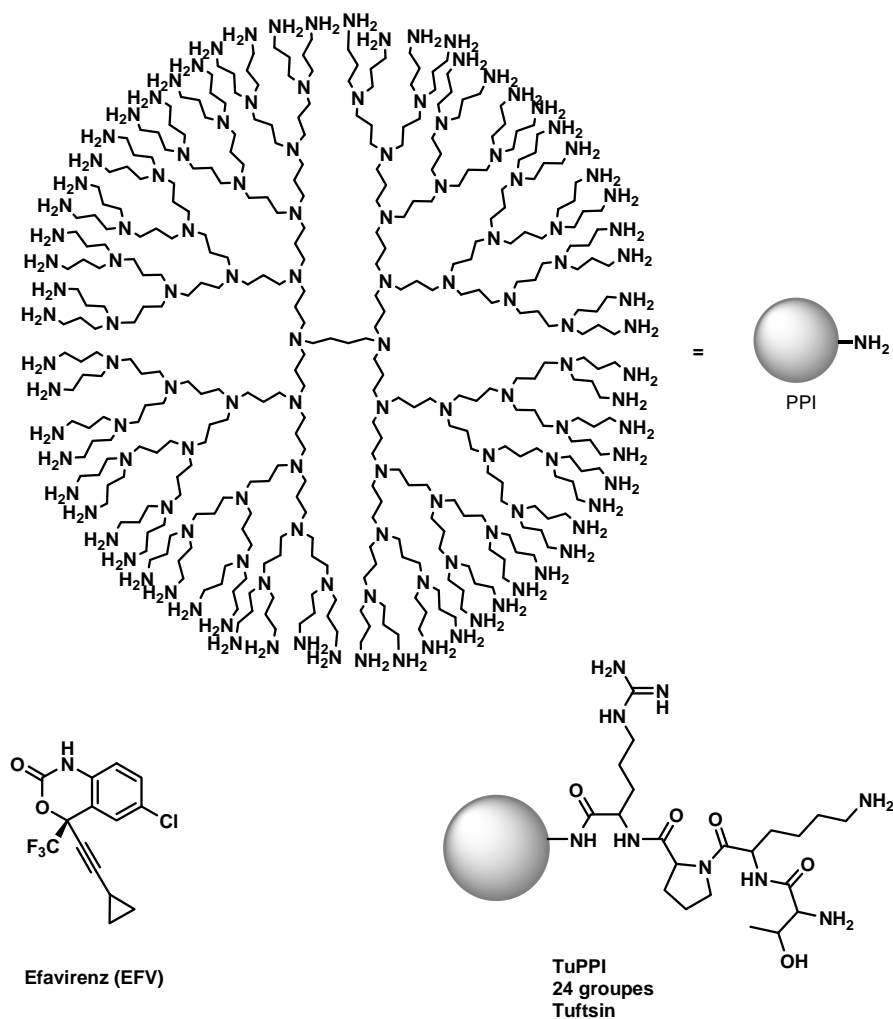


Figure I.38 Système dendritique transporteur d'EFV

De plus, ces travaux montrent que le TuPPI pénètre mieux dans les cellules Mo/Mac infectées que dans les cellules non infectées (1,2 fois plus dans des cellules Mo/Mac infectées après 1h ; 1,5 fois plus dans des cellules Mo/Mac non infectées après 48h). Cette pénétration élevée du TuPPI chargé d'EFV est probablement due à un stade activé de ces cellules infectées par le VIH et permet une phagocytose préférentielle du système TuPPI-EFV.

Le TuPPI est un système de transport potentiel pour contrôler et viser des antirétroviraux vers les cellules cibles. Le Tuftsine joue un rôle décisif dans le TuPPI, en améliorant la pénétration

cellulaire du système TuPPI-EFV, en stimulant l'activité phagocytaire spécialement dans des cellules Mo/Mac infectées et il contribue à l'activité anti-VIH du médicament. La conjugaison du Tuftsine à la surface du dendrimère permet d'amener le système aux macrophages et de plus, de stimuler ces cellules non spécifiquement contre les infections.

I.2.3.4.1.6 Dendrimères inhibiteurs de la transcriptase inverse

Un dernier exemple de dendrimère avec des propriétés d'anti-rétrotranscription est le SPL2923 (dendrimère PAMAM de génération 4 avec 24 groupes acide naphthylsulfonate) déjà évoqué précédemment. Ce dendrimère, qui agit en tant qu'inhibiteur d'entrée du VIH a aussi la capacité d'agir au niveau de la transcriptase inverse avec une concentration active de 13,8 nM grâce à sa capacité de pénétration dans la cellule contrairement à son analogue à terminaisons acide phényldicarboxylique, SPL6195. Cela a pu être vérifié par des expériences de microscopie confocale avec un analogue fluorescent et par des expériences d'addition du composé à différents temps après infection de la cellule par le VIH. Puis ces temps d'addition sont comparés avec ceux des antiviraux qui sont bien connus. De plus, quand le SPL2923 est utilisé à 500 fois sa CI_{50} (6,9 μ M), l'addition du produit peut être retardée jusqu'à 4h après l'exposition de la cellule au virus sans perte d'activité inhibitrice comme dans le cas de la Zidovudine. Le composé est vraisemblablement capable d'interférer avec la transcriptase inverse mais des concentrations élevées sont nécessaires. Son mode d'action n'a pas été rationalisé.

I.2.3.4.2 Inhibiteurs de l'intégrase

Les rétrovirus comme le VIH-1 ont besoin de s'insérer dans le génome de la cellule hôte pour pouvoir se reproduire. L'enzyme virale intégrase (IN) sert à insérer le nouvel ADN double brin viral dans le génome de la cellule hôte. L'intégrase virale n'a pas d'homologue humain ce qui lui permet d'être une cible thérapeutique de choix.

De nombreux composés ont été décrits en tant qu'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 mais un seul est employé en polythérapie anti-VIH, le Raltegravir, et un autre qui est en phase clinique III, l'Elvitegravir (Figure I.39).

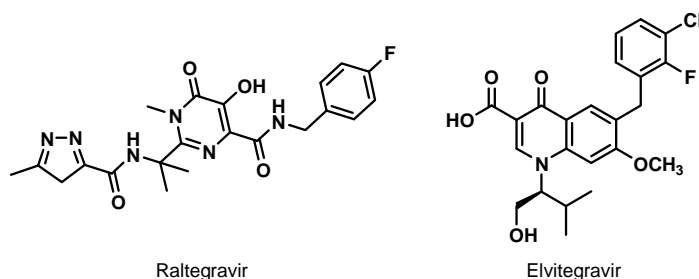


Figure I.39 Structure d'inhibiteurs de l'intégrase

Le mécanisme d'action du Raltegravir consiste à bloquer le transfert du complexe d'intégration dans le noyau et de cette manière il évite l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire, en stoppant la réplication du VIH-1.

Le Raltegravir est le premier principe actif de cette classe à être agréé pour le traitement du SIDA.^(188, 189) Administré en combinaison avec d'autres principes actifs comme le Ténofovir et la Lamivudine aux patients infectés, il diminue la charge virale 100 fois, après 2 années de traitement.

A la différence des autres médicaments, il ne perturbe pas les niveaux de cholestérol ou de triglycérides mais il provoque quelques effets secondaires : nausées, vomissements, fatigue, maux de tête et diarrhée.

Quant aux dendrimères à propriétés anti-intégrase, le seul exemple trouvé est de nouveau le dendrimère poly-anionique SPL2923 présenté déjà en plusieurs occasions. Des expériences de temps d'addition et de microscopie confocale ont montré que ce dendrimère est capable d'entrer dans la cellule et d'agir aussi contre l'intégrase. Le SPL2923 inhibe l'intégrase avec une concentration active de 13,8 nM. Par contre, dans un système cellulaire intact, les études de temps d'interaction montrent que quand le SPL2923 est utilisé à 2500 fois sa CI_{50} (6,9 μ M), l'addition du composé peut être retardée jusqu'à quelques heures après l'infection. Ce résultat indique que le dendrimère interagit dans une étape plus tardive du cycle de réplication mais l'utilisation du produit à concentrations élevées est nécessaire.

1.2.3.4.3 Inhibiteurs de la transcription

L'expression des gènes du VIH-1 peut être inhibée par des composés qui interagissent avec les protéines virales *Tat* et *Rev*.⁽¹⁹⁰⁾ La protéine *Tat* du VIH-1 est essentielle pour la réplication du virus, elle est un trans-activateur de la transcription.^(191, 192) La *Tat* est introduite au complexe de transcription suite à l'attachement à une tige d'ARN avec une structure en boucle, TAR, localisée à

l'extrémité 5' de l'ARNm viral.⁽¹⁹³⁻¹⁹⁶⁾ La protéine *Tat* a entre 86 et 101 acides aminés qui contiennent le domaine d'activation N-terminal et le domaine d'attachement C-terminal de l'ARN.

L'interaction de la *Tat* avec le TAR est cruciale pour la production complète de la transcription et la prolifération du virus. De plus, des médicaments qui peuvent s'attacher à l'ARN TAR puis bloquer l'attachement de la *Tat* sont une bonne stratégie pour l'inhibition du VIH. Dans ce contexte, il est bien connu que les dendrimères PAMAM peuvent former des complexes avec l'ADN à travers des interactions électrostatiques entre les groupes phosphonate chargés négativement de l'acide nucléique et les groupes amine primaire chargés positivement à la surface du dendrimère à pH physiologique.⁽¹⁹⁷⁾ Ainsi, les dendrimères PAMAM sont des candidats pour inhiber l'attachement de *Tat* à l'ARN TAR par la forte interaction entre le dendrimère et les groupes phosphonate de l'ARN TAR. Pour cela, Jiang *et al.*⁽¹⁹⁸⁾ ont étudié les interactions entre la surface des dendrimères PAMAM et l'ARN TAR avec une microbalance microgravimétrique de cristal à quartz (QCM).

Ces travaux montrent que les dendrimères PAMAM peuvent former un complexe avec l'ARN TAR puis inhiber efficacement la liaison de *Tat* à l'ARN TAR, en suggérant que la liaison des dendrimères PAMAM à l'ARN TAR change la structure moléculaire de l'ARN TAR. Ce changement structural induit par le dendrimère semble incompatible avec l'attachement de *Tat*.

Dans un deuxième temps, les mêmes auteurs ont étudié l'influence de la génération (2 à 5) des dendrimères PAMAM pour l'inhibition de la formation du complexe *Tat*-ARN TAR par microgravimétrie avec une microbalance de cristal à quartz (QCM) et par électrophorèse capillaire.

Pour explorer les détails de combinaison, la méthode d'électrophorèse capillaire est utilisée. Des mélanges de TAR/PAMAM/*Tat* en relation molaire 1:5:5 sont utilisés pour étudier la compétition entre TAR-PAMAM et TAR-*Tat*. On trouve que le complexe de chaque génération du dendrimère PAMAM avec l'ARN TAR a son propre temps de migration. Le temps de migration donne des informations sur la force de la combinaison. Les résultats obtenus par QMC sont donc vérifiés par l'électrophorèse capillaire. La séquence de la vitesse de migration des dendrimères PAMAM est $G2 > G3 > G4 > G5$ par contre quand ils sont complexés avec l'ARN, la mobilité est la suivante : $G3\text{-ARN} > G5\text{-ARN} > G4\text{-ARN} > \text{Tat-ARN} > G2\text{-ARN}$. Ces résultats montrent que l'interaction entre l'ARN et les dendrimères PAMAM n'est pas seulement liée à une attraction électrostatique ou à un effet de poids, il existe d'autres facteurs qui sont plus essentiels pour la complexation ligand-récepteur. Probablement, la taille du dendrimère PAMAM de génération 3 peut remplir la boucle sur TAR plus précisément.

1.2.3.4.4 Inhibiteurs de la protéase

Une fois l'ADN viral intégré dans le génome de la cellule hôte, les enzymes cellulaires copient et traduisent le génome proviral afin de former des poly-protéines *gag* et *gag-pol* qui sont des grandes chaînes de polypeptides. La protéase du VIH s'occupe donc de cliver ces poly-protéines en de plus petites protéines qui deviendront la transcriptase inverse (p66/p51), l'intégrase (p32) et la protéase (p11). Cela permet aux virions de mûrir en conservant leur capacité à infecter de nouvelles cellules saines.^(199, 200)

Les inhibiteurs de la protéase bloquent la formation de nouvelles particules virales infectieuses. Ces médicaments présentent une structure peptidique analogue au substrat naturel à l'exception du Nelfinavir qui est un inhibiteur synthétique non peptidique. Ils comportent le même motif, soit une liaison d'hydroxyle d'éthylène à la place de la liaison peptidique qui confère un caractère non-clivable à la molécule (Figure I.40). Leur mécanisme d'action consiste en la compétition de l'inhibiteur avec le substrat naturel (la poly-protéine virale) pour occuper le centre actif de la protéase en empêchant le clivage des protéines *gag* et *gag-pol*. En conséquence, les virions formés sont non infectieux.

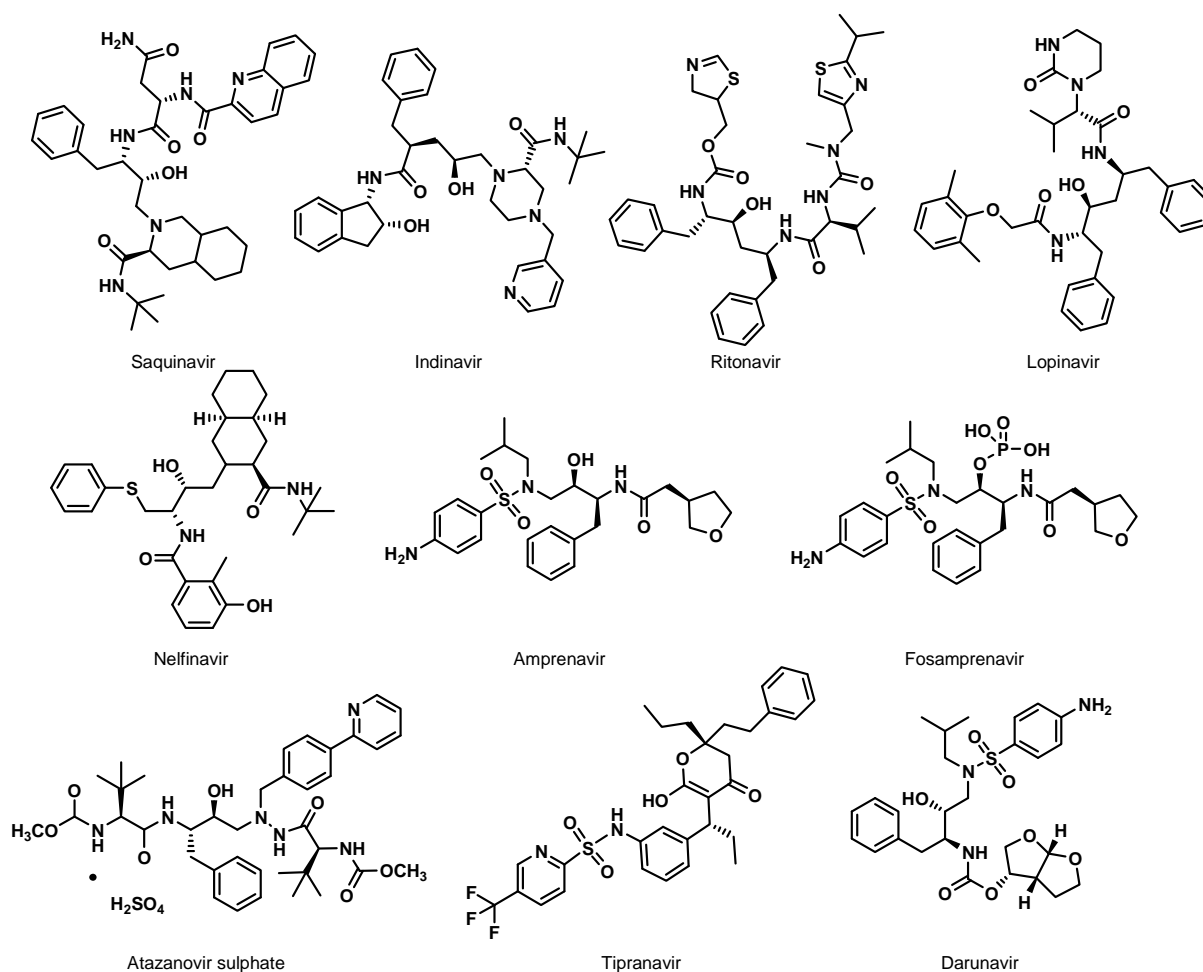


Figure I.40 Structures des inhibiteurs de la protéase employés dans les polythérapies anti-VIH actuelles

Ces inhibiteurs de la protéase sont très actifs. En revanche, ils présentent de nombreux inconvénients : (1) le VIH-1 développe une résistance envers ce type d'inhibiteurs, (2) une faible biodisponibilité orale en raison de leur structure peptidique, (3) des effets secondaires (par exemple, l'augmentation du cholestérol dans le sang), et (4) ce sont les plus toxiques de tous les médicaments anti-VIH utilisés en polythérapies (Tableau I.6).

Même si les inhibiteurs de la protéase sont très toxiques, ils sont indispensables pour la polythérapie rétrovirale actuelle. De nombreuses études sont en cours afin de trouver de nouvelles molécules actives ciblant d'autres séquences de l'enzyme moins prédisposées à la mutation.

Une de ces nouvelles solutions emploie des dérivés fullerène. En effet, Friedman *et al.* ont découvert que le dérivé méthanofullerène de première génération soluble dans l'eau, est un inhibiteur compétitif de la protéase recombinée du VIH avec une K_i (i = inhibition) de $5,3 \mu\text{M}$. En utilisant des modèles moléculaires, Friedman *et al.* anticipent que la sphère C60 pourrait remplir la cavité hydrophobe de la protéase.^(201, 202)

L'activité du dendrimère fullerène de première génération (Figure I.41) a été évaluée par Schinazi *et al.* sur des cellules PBMC infectées par le VIH-1 et le VIH-2. Il a une activité antivirale respectivement, de $7,3 \mu\text{M}$ et $5,5 \mu\text{M}$. De plus, le dendrimère est actif sur des cellules H9 infectées avec une $\text{CI}_{50} = 10,8 \mu\text{M}$. L'activité sélective dans ces cellules est une marque distinctive de tous les inhibiteurs de la protéase. En outre, ce composé n'est pas toxique jusqu'à des concentrations supérieures à $100 \mu\text{M}$ sur des cellules PBMC et CEM non infectées. D'autre part, les dérivés C60 solubles dans l'eau peuvent être adsorbés efficacement après administration orale et ils sont éliminés à travers les reins.⁽²⁰³⁾

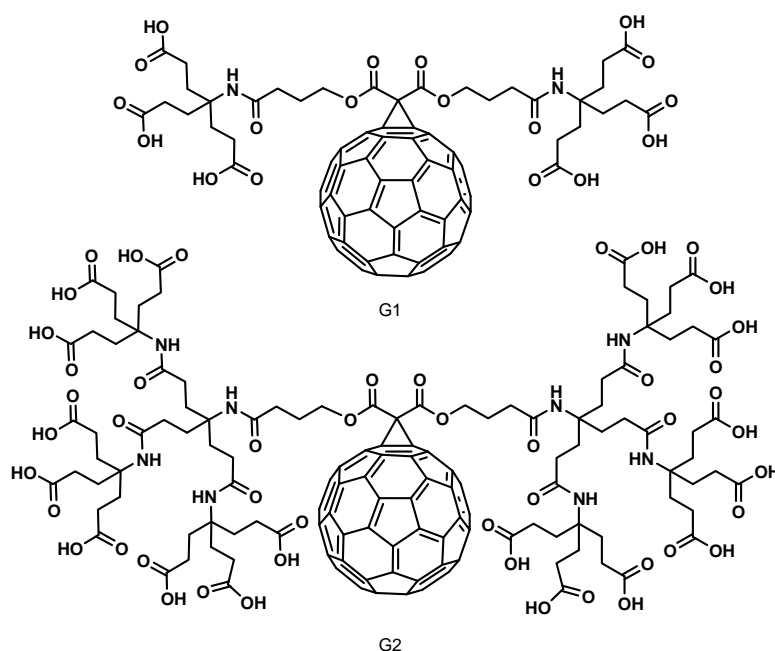


Figure I.41 Structure des dendrimères fullerène de génération 1 (G1) et 2 (G2) inhibiteurs de la protéase

Ces dendrimères fullerène solubles dans l'eau sont aussi efficaces contre des souches de VIH résistants à d'autres médicaments souvent utilisés en polythérapies (CI_{50} entre 0,052 et 0,97 μM) (Tableau I.6).

Les modèles théoriques montrent que ce dérivé fullerène s'attache plutôt fortement à la protéase.⁽²⁰⁴⁾

L'activité de ce dendrimère de génération 1 est améliorée par le dendrimère de deuxième génération avec 18 groupes carboxyliques qui est actif sur des lymphocytes humaines ($CI_{50} = 0,12 \mu\text{M}$) et pas toxiques ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) sur des cellules humaines PBMC, Vero et CEM (51,1 μM). Les valeurs de RCI_{50} de ces deux dendrimères indiquent qu'il existe un effet dendritique. Ainsi, le RCI_{50} du dendrimère de deuxième génération est 11 fois inférieur à celui du dendrimère de génération 1, ce qui signifie que le dendrimère de deuxième génération est plus actif. De plus, il est plus sélectif car il possède un index thérapeutique supérieur (Tableau I.6).

Les modèles moléculaires montrent que les branches hydrophiles du dendrimère de deuxième génération dépassent la cavité hydrophobe de la protéase où la sphère du fullerène est localisée dans la poche d'attachement et bloque l'accès au site actif de l'enzyme.

L'énergie intermoléculaire calculée par des modèles minimisés est négative, ce qui signifie que l'interaction entre le dendrimère de deuxième génération et la protéine est très favorable. Ce dendrimère est un des dérivés fullerène découverts, le plus actif.⁽²⁰⁵⁾

Médicament	N	VIH-1	CI_{50} (μM)	RCI_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IT	Biodisponibilité orale
Dendrimère fullerène G1	6	Sauvage	7,3	43,8	>100	>13,7	-
Dendrimère fullerène G2	18	Sauvage	0,22	3,96	>100	>455	~30%
		M184V	0,052	0,936		>1923	
Saquinavir	1	Sauvage	0,001-0,03	0,001-0,03	>10	>333-10000	-
		M184V	-	-		-	
Indinavir	1	Sauvage	~0,1	~0,1	>400	>4000	-
		M184V	-	-		-	
Ritonavir	1	Sauvage	0,045	0,045	>57	>1267	~78%
		M184V	0,8	0,8		>71	
Nelfinavir	1	Sauvage	0,031-0,043	0,031-0,043	23	534-742	52%
		M184V	0,4	0,4		57,5	
Amprenavir	1	Sauvage	0,054	0,054	89	1648	-
		M184V	0,5	0,5		178	

Tableau I.6 Comparaison de l'activité et la cytotoxicité du dendrimère fullerène de deuxième génération et d'autres inhibiteurs de la protéase

I.2.3.5 Thérapie génique anti-VIH

La technique de l'ARNi (i = interférence) consiste en l'utilisation d'un acide ribonucléique simple ou double brin, qui interfère avec un ARN messager spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine.^(206, 207)

Le mécanisme de l'ARNi implique des fragments courts de double brin de l'ARN (ARNsi (si : de l'anglais : small interference)). Si la complémentarité entre le ARNsi et l'ARNm cible est parfaite, ce dernier est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher la dégradation. Ce mécanisme est donc très spécifique de la séquence du ARNsi et de sa cible, l'ARNm.⁽²⁰⁸⁾ Cette technique a été utilisée pour bloquer la réplication du VIH.^(209, 210)

Un des principaux obstacles de cette technique *in vivo* est la dégradation de l'ARNsi par les ARNases dans le flux sanguin et son acheminement vers les cellules cible. *In vitro*, le principal obstacle est la transfection inefficace de l'ARNsi dans des cellules en suspension. Un autre obstacle est que les systèmes de transport courants de l'ARNsi emploient des lipides cationiques et des vecteurs viraux qui offrent une basse transfection, des cytotoxicités et des immunogénicités élevées en particulier quand ils sont utilisés dans des cellules lymphocytaires ou *in vivo*. Les dendrimères ont été utilisés comme alternative pour le transport d'oligonucléotides et de médicaments.

Weber *et al.* ont développé des dendriplexes qui sont formés par des dendrimères carbosilane chargés positivement et d'ARNsi chargés négativement.⁽¹⁵¹⁾ Les dendrimères carbosilane (CBS) de deuxième génération sont 2G-NN8 et 2G-NN16 portant respectivement 8 et 16 charges positives (Figure I.42).

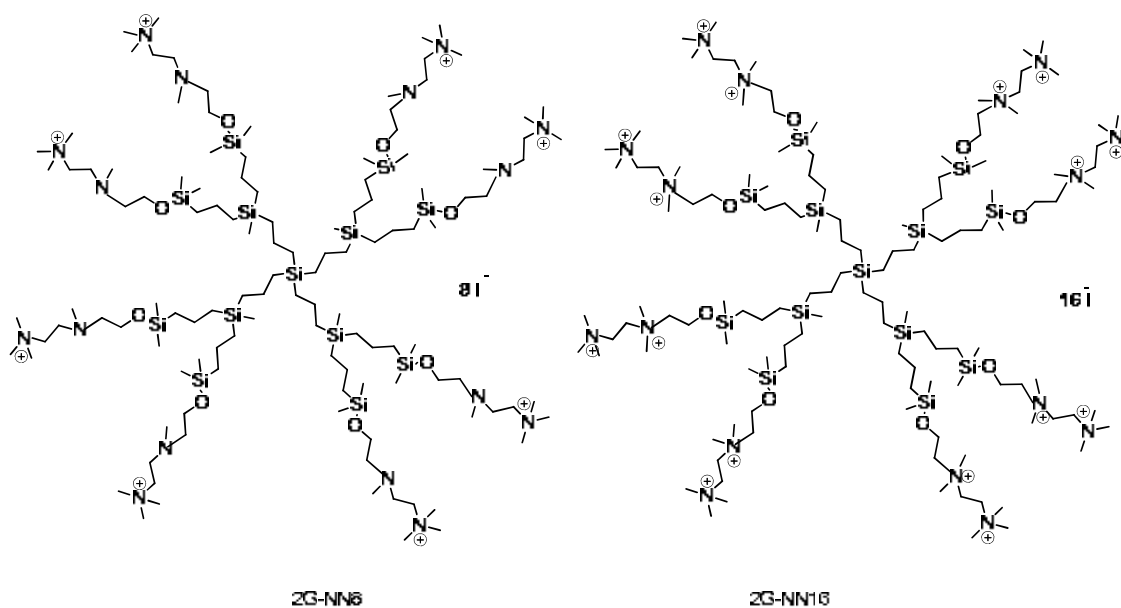


Figure I.42 Structure des dendrimères carbosilane employés en transfection

Ces dendrimères sont solubles dans l'eau, ils s'attachent efficacement à l'ARNsi et sont capables de relarguer leur charge en fonction du temps grâce à l'hydrolyse de la liaison Si-O. Les séquences polyanioniques de l'ARNsi choisies codent les protéines p24 (protéine de la capsid virale), GAG1 (gène qui code pour les protéines structurales) et NEF (gène qui code pour les protéines d'enveloppe) du VIH.

Les essais de compétition montrent que l'ARNsi interagit plus fortement avec le dendrimère 2G-NN8 qu'avec son analogue 2G-NN16. D'autre part, les études d'électrophorèse sur gel d'agarose indiquent que l'attachement de l'ARNsi aux groupes ammonium quaternaire du dendrimère CBS augmentent la stabilité de l'ARNsi en évitant sa dégradation par les ARNases.

De plus, les études de la rupture membranaire, de la viabilité cellulaire, de l'activité métabolique et de la prolifération cellulaire montrent la diminution de la cytotoxicité du dendriplexe sur des cellules lymphocytaires SupT1 par rapport au dendrimère non complexé car les charges positives du dendriplexe sont masquées. La cytotoxicité dépend du rapport de charges +/- des dendriplexes : ceux qui ont un rapport de charges inférieur à 8 ne sont pas toxiques.

De la même façon, les résultats de la cytométrie en flux réalisée avec un fluorochrome attaché à l'ARNsi libre ou complexé montre que l'efficacité de transfection des dendriplexes dépend de la charge.

L'ARNsi libre ou complexé avec un rapport de charges +/- de 1 et 2 possèdent l'efficacité de transfection la plus élevée. Ces résultats sont corroborés avec la microscopie confocale où le fluorochrome attaché à l'ARNsi libre ou complexé avec le dendrimère est observé à l'intérieur des cellules lymphocytaires SupT1. Par contre, l'efficacité de transfection de l'ARNsi libre sur des cellules PBMC infectées par le VIH est très faible (~1%) après 3h, alors que l'ARNsi complexé avec le dendrimère 2G-NN16 montre une efficacité de transfection d'environ 40%. Après 24h, les efficacités de transfection de l'ARNsi et de dendriplexes sont similaires avec une cytotoxicité minimale (viabilité cellulaire de 80%). De plus, les dendriplexes réduisent efficacement la réplication du VIH sur des cellules SupT1 et PBMC. En effet, le dendriplexe 2G-NN16-NEFsi montre une inhibition du VIH de 40% pour un rapport de charges de 2. La faible cytotoxicité liée à l'efficacité de transfection élevée et à la stabilité de l'ARNsi donnée par le dendrimère carbosilane montre l'importance de son développement comme système de transport de l'ARNsi.

I.3 Conclusion et but de cette thèse

Les dendrimères sont des macromolécules multivalentes de taille et de forme bien définies. Le contrôle de leur architecture nous permet de moduler leurs propriétés physicochimiques et

biologiques. De cette manière, on peut construire des dendrimères sur mesure en fonction des besoins.

Ils peuvent ainsi être des transporteurs spécifiques et efficaces de substances actives qui sont soit greffées sur le dendrimère soit encapsulées dans le dendrimère. Des agents de solubilisation, de ciblage ou des sondes peuvent être greffés de façon contrôlée sur les dendrimères. La conception des systèmes chimiques hydrosolubles avec un grand nombre de fonctions de surface est donc possible en utilisant des dendrimères. De plus, la bonne biodisponibilité et la toxicité réduite des dendrimères en font de bons outils pour des applications biomédicales : systèmes de délivrance de principes actifs, imagerie ou analyse médicale, transfection ou encore comme agents thérapeutiques.

Par ailleurs, le caractère multivalent des dendrimères est lié à la présence d'un grand nombre de sites actifs dans une région confinée de l'espace. Dans la nature, la plupart des processus de reconnaissance cellulaire sont multivalents. L'inhibition de ces processus est plus efficace quand un inhibiteur multivalent est employé. Nous pouvons construire ces inhibiteurs en utilisant comme plate-forme des dendrimères qui peuvent mimer de façon synthétique les surfaces cellulaires.

Dans ce contexte, les dendrimères peuvent être utilisés pour concevoir des agents antiviraux qui inhiberont l'étape de reconnaissance entre le virus et la cellule hôte. Cette stratégie est très prometteuse surtout dans le cas où il n'existe pas de vaccin et où l'épidémie est une menace comme le VIH. On a vu que les traitements actuels utilisés sur des personnes infectées par ce virus sont rudes et toxiques. Le besoin de trouver des nouveaux agents anti-VIH plus efficaces, plus spécifiques, moins toxiques et plus biodisponibles est urgent. A priori, les dendrimères sont de bons candidats pour construire des inhibiteurs multivalents de l'entrée du VIH dans la cellule. Ils ont également d'autres applications anti-VIH, en tant que transporteurs de principes actifs ou pour le développement de vaccins.^(166, 211-224)

Dans ce contexte, les dendrimères catanioniques analogues du GalCer développés au sein de nos laboratoires montrent leur capacité à être des inhibiteurs de reconnaissance du VIH. La synthèse originale et simple de ces dendrimères analogues du GalCer en font des systèmes très attractifs :

- ils possèdent des unités de GalCer qui augmentent la spécificité pour le virus et les cellules infectées
- ils montrent une bonne activité anti-VIH
- ils ont cependant une certaine toxicité.

Le point de départ de cette thèse consiste à se poser les questions suivantes :

- Pourquoi ces dendrimères catanioniques analogues du GalCer sont toxiques ?
- La paire d'ions est-elle dissociée dans ce milieu cellulaire ?

- Comment pouvons-nous améliorer la force de cette paire d'ion ?

Dans les chapitres suivants, nous allons tenter d'y répondre.

I.4 Bibliographie

- (1) Jang, W. D.; Selim, K. M. K.; Lee, C. H.; Kang, I. K., *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 1.
- (2) Smith, D. K., *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1187.
- (3) Jain, N. K.; Gupta, U., *Exp. Opin. Drug Metabol. Toxicol.* **2008**, *4*, 1035.
- (4) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C., *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517.
- (5) Barresinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axlerblin, C.; Vezinetbrun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., *Science* **1983**, *220*, 868.
- (6) Chakraborty, R., *Curr. HIV Res.* **2005**, *3*, 31.
- (7) UNASIDA, *Report on the global AIDS epidemic* **2008**, 32.
- (8) Whittle, H.; Morris, J.; Todd, J.; Corrah, T.; Sabally, S.; Bangali, J.; Ngom, P. T.; Rolfe, M.; Wilkins, A., *AIDS* **1994**, *8*, 1617.
- (9) Menéndez-Arias, L., *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **2002**, *71*, 91.
- (10) Coffin, J. M., *Science* **1995**, *267*, 483.
- (11) Wei, X. P.; Ghosh, S. K.; Taylor, M. E.; Johnson, V. A.; Emimi, E. A.; Deutsch, P.; Lifson, J. D.; Bonhoeffer, S.; Nowak, M. A.; Hahn, B. H.; Saag, M. S.; Shaw, G. M., *Nature* **1995**, *373*, 117.
- (12) Gelderblom, H. R., *AIDS* **1991**, *5*, 617.
- (13) Moore, J. P.; Bradford, A.; Jameson, A.; Weiss, R. A.; Sattentau, Q. J., *Virus Fusion Mechanisms*. Bentz, J. (CRC, Boca Raton, FL), 1993, 233 p.
- (14) Greene, W. C.; Peterlin, B. M., *Nat. Med.* **2002**, *8*, 673.
- (15) Muesing, M. A.; Smith, D. H.; Cabradilla, C. D.; Benton, C. V.; Lasky, L. A.; Capon, D. J., *Nature* **1985**, *313*, 450.
- (16) Kramer-Hammerle, S.; Rothenaigner, I.; Wolff, H.; Bell, J. E.; Brack-Werner, R., *Virus Res.* **2005**, *111*, 194.
- (17) Zaitseva, M.; Peden, K.; Golding, H., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, *1614*, 51.
- (18) Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Lu, Z.; Olson, W.; Kwong, P. D.; Sattentau, Q. J., *J. Virol.* **2000**, *74*, 1948.
- (19) Zhang, J.; Moore, J. S.; Xu, Z.; Aguirre, R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2273.
- (20) Harouse, J. M.; Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Laughlin, M.; Stefano, K.; Silberberg, D. H.; Gonzalez-Scarano, F., *Science* **1991**, *253*, 320.
- (21) De Santis, C.; Lopalco, L.; Robbioni, P.; Longui, R.; Rappocciolo, G.; Siccardi, A. G.; Beretta, A., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1994**, *10*, 157.
- (22) Sosnik, A.; Chiappetta, D. A.; Carcaboso, A. M., *J. Control. Release* **2009**, *138*, 2.
- (23) Kaufmann, G. R.; Cooper, D. A., *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 508.
- (24) Mocroft, A.; Vella, S.; Benfield, T. L.; Chiesi, A.; Miller, V.; Gargalianos, P.; Monforte, A. D.; Yust, I.; Bruun, J. N.; Phillips, A. N.; Lundgren, J. D.; Euro, S. S. G., *Lancet* **1998**, *352*, 1725.
- (25) Sharkey, M. E.; Teo, I.; Greenough, T.; Sharova, N.; Luzuriaga, K.; Sullivan, J. L.; Bucy, R. P.; Kostrikis, L. G.; Haase, A.; Veryard, C.; Davaro, R. E.; Cheeseman, S. H.; Daly, J. S.; Bova,

- C.; Ellison, R. T.; Mady, B.; Lai, K. K.; Moyle, G.; Nelson, M.; Gazzard, B.; Shaunak, S.; Stevenson, M., *Nat. Med.* **2000**, *6*, 76.
- (26) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- (27) Tomalia, D. A., *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 294.
- (28) Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W., *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665.
- (29) Newkome, G. R.; Young, J. K.; Baker, G. R.; Potter, R. L.; Audoly, L.; Cooper, D.; Weis, C. D.; Morris, K.; Johnson, C. S., *Macromolecules* **1993**, *26*, 2394.
- (30) Donald, A. T.; Adel, M. N.; William, A. G., III, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138.
- (31) Mansfield, M. L.; Klushin, L. I., *Macromolecules* **1993**, *26*, 4262.
- (32) Murat, M.; Grest, G. S., *Macromolecules* **1996**, *29*, 1278.
- (33) Seel, C.; Vogtle, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 528.
- (34) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F., *Synthesis* **1978**, 155.
- (35) Moors, R.; Vogtle, F., *Chem. Ber. Rec.* **1993**, *126*, 2133.
- (36) Worner, C.; Mulhaupt, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306.
- (37) de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308.
- (38) O'Sullivan, D. A., *Chem. Eng. News* **1993**, *71*, 20.
- (39) Denkewalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasage, W. J. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. US4289872. 1981-09-15.
- (40) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., *Macromolecules* **1986**, *19*, 2466.
- (41) Tomalia, D. A.; Hall, M.; Hedstrand, D. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1601.
- (42) Tomalia, D. A.; Berry, V.; Hall, M.; Hedstrand, D. M., *Macromolecules* **1987**, *20*, 1164.
- (43) Tomalia, D. A.; Dvornic, P. R., *Dendritic Polymers, Divergent Synthesis (Starburst Polyamidoamine Dendrimers)*, *Polymeric Materials Encyclopedia*. J.C. Salamose (Ed), CRC Press, New York, 1996, 1814 p.
- (44) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.
- (45) Launay, N.; Caminade, A. M.; Lahana, R.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1589.
- (46) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- (47) Ehrlich, P. H., *J. Theor. Biol.* **1979**, *81*, 123.
- (48) Hahn, K. W.; Klis, W. A.; Stewart, J. M., *Science* **1990**, *248*, 1544.
- (49) Lee, Y. C.; Lee, R. T., *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321.
- (50) Lundquist, J. J.; Toone, E. J., *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- (51) Nagahori, N.; Lee, R. T.; Nishimura, S.; Page, D.; Roy, R.; Lee, Y. C., *ChemBioChem* **2002**, *3*, 836.
- (52) Servin, P.; Laurent, R.; Gonsalvi, L.; Tristany, M.; Peruzzini, M.; Majoral, J. P.; Caminade, A. M., *Dalton Trans.* **2009**, 4432.
- (53) Christine, V.; Ester, A.; Jaime, R.; Jean-Claude, B.; Didier, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1747.
- (54) Boas, U.; Karlsson, A. J.; de Waal, B. F. M.; Meijer, E. W., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2136.
- (55) Zinselmeyer, B. H.; Mackay, M. E.; Schatzlein, A. G.; Uchegbu, I. F., *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 960.
- (56) Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T., *J. Biomed. Mater. Res. A* **1996**, *30*, 53.

- (57) Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R., *J. Control. Release* **2000**, *68*, 299.
- (58) Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A., *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263.
- (59) El-Sayed, M.; Ginski, M.; Rhodes, C.; Ghandehari, H., *J. Control. Release* **2002**, *81*, 355.
- (60) Fischer, D.; Li, Y. X.; Ahlemeyer, B.; Kriegelstein, J.; Kissel, T., *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121.
- (61) Maszewska, M.; Leclaire, J.; Cieslak, M.; Nawrot, B.; Okruszek, A.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 193.
- (62) Padie, C.; Maszewska, M.; Majchrzak, K.; Nawrot, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *New J. Chem.* **2009**, *33*, 318.
- (63) Brazeau, G. A.; Attia, S.; Poxon, S.; Hughes, J. A., *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 680.
- (64) Gebhart, C. L.; Kabanov, A. V., *J. Control. Release* **2001**, *73*, 401.
- (65) Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K., *Int. J. Pharm.* **2010**, *394*, 122.
- (66) Kim, Y.; Klutz, A. M.; Jacobson, K. A., *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1660.
- (67) Lee, J. H.; Lim, Y. B.; Choi, J. S.; Lee, Y.; Kim, T. I.; Kim, H. J.; Yoon, J. K.; Kim, K.; Park, J. S., *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 1214.
- (68) Dutta, T.; Agashe, H. B.; Garg, M.; Balasubramaniam, P.; Kabra, M.; Jain, N. K., *J. Drug Targeting* **2007**, *15*, 89.
- (69) Rittner, K.; Benavente, A.; Bompard-Sorlet, A.; Heitz, F.; Divita, G.; Brasseur, R.; Jacobs, E., *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 104.
- (70) Hong, S. P.; Biellinska, A. U.; Mecke, A.; Keszler, B.; Beals, J. L.; Shi, X. Y.; Balogh, L.; Orr, B. G.; Baker, J. R.; Holl, M. M. B., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 774.
- (71) Stasko, N. A.; Johnson, C. B.; Schoenfisch, M. H.; Johnson, T. A.; Holmuhamedov, E. L., *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3853.
- (72) Heiden, T. C. K.; Dengler, E.; Kao, W. J.; Heideman, W.; Peterson, R. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *225*, 70.
- (73) Malik, N.; Evagorou, E. G.; Duncan, R., *Anti-Cancer Drugs* **1999**, *10*, 767.
- (74) Dutta, T.; Garg, M.; Dubey, V.; Mishra, D.; Singh, K.; Pandita, D.; Singh, A. K.; Ravi, A. K.; Velpandian, T.; Jain, N. K., *Nanotoxicology* **2008**, *2*, 62.
- (75) Ihre, H. R.; De Jesus, O. L. P.; Szoka, F. C.; Frechet, J. M. J., *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 443.
- (76) Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Saga, T.; Sato, N.; Hiraga, A.; Ishimori, T.; Konishi, J.; Togashi, K.; Brechbiel, M. W., *Magn. Reson. Med.* **2001**, *46*, 781.
- (77) Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, P.; Jain, N. K., *Pharmazie* **2002**, *57*, 5.
- (78) Agashe, H. B.; Dutta, T.; Garg, M.; Jain, N. K., *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1491.
- (79) Soussan, E.; Cassel, S.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 274.
- (80) Chan, D. C.; Kim, P. S., *Cell* **1998**, *93*, 681.
- (81) Santhosh, K. C.; Paul, G. C.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Witvrouw, M.; Loftus, T. L.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W.; Cushman, M., *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 703.
- (82) Mitsuya, H.; Popovic, M.; Yarchoan, R.; Matsushita, S.; Gallo, R. C.; Broder, S., *Science* **1984**, *226*, 172.
- (83) Broder, S.; Collins, J. M.; Markham, P. D.; Redfield, R. R.; Hoth, D. F.; Groopman, J. E.; Gallo, R. C.; Yarchoan, R.; Lane, H. C.; Klecker, R. W.; Mitsuya, H.; Gelmann, E.; Resnick, L.; Myers, C. E.; Fauci, A. S., *Lancet* **1985**, *2*, 627.

- (84) De Clercq, E., *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 567.
- (85) Gallaher, W. R.; Ball, J. M.; Garry, R. F.; Martinamedee, A. M.; Montelaro, R. C., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1995**, *11*, 191.
- (86) Stone, A., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 977.
- (87) Balzarini, J.; Van Damme, L., *Lancet* **2007**, *369*, 787.
- (88) Fletcher, P.; Wallace, G.; Mesquita, P.; Shattock, R., *Retrovirology* **2006**, *3*, 46.
- (89) Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grise, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A.; Roux, K. H., *Nature* **2006**, *441*, 847.
- (90) Bourne, N.; Stanberry, L. R.; Kern, E. R.; Holan, G.; Matthews, B.; Bernstein, D. I., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2471.
- (91) Gong, Y. H.; Matthews, B.; Cheung, D.; Tam, T.; Gadawski, I.; Leung, D.; Holan, G.; Raff, J.; Sacks, S., *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 319.
- (92) Luscher-Mattli, M., *Antivir. Chem. Chemother.* **2000**, *11*, 249.
- (93) Matthews, B. R.; Holan, G. Antiviral dendrimers. US5229490. 2- 20-2001.
- (94) Witvrouw, M.; Fikkert, V.; Pluymers, W.; Matthews, B.; Mardel, K.; Schols, D.; Raff, J.; Debyser, Z.; De Clercq, E.; Holan, G.; Pannecouque, C., *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1100.
- (95) Bernstein, D. I.; Stanberry, L. R.; Sacks, S.; Ayisi, N. K.; Gong, Y. H.; Ireland, J.; Mumper, R. J.; Holan, G.; Matthews, B.; McCarthy, T.; Bournel, N., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3784.
- (96) Dezzutti, C. S.; James, V. N.; Ramos, A.; Sullivan, S. T.; Siddig, A.; Bush, T. J.; Grohskopf, L. A.; Paxton, L.; Subbarao, S.; Hart, C. E., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3834.
- (97) Rupp, R.; Rosenthal, S. L.; Stanberry, L. R., *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 561.
- (98) McCarthy, T. D.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; Giannis, M.; O'Keefe, D. F.; Heery, G.; Paull, J. R. A.; Matthews, B. R.; Holan, G., *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 312.
- (99) Jiang, Y. H.; Emau, P.; Cairns, J. S.; Flanary, L.; Morton, W. R.; McCarthy, T. D.; Tsai, C. C., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2005**, *21*, 207.
- (100) Patton, D. L.; Sweeney, Y. T. C.; McCarthy, T. D.; Hillier, S. L., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1696.
- (101) O'Loughlin, J.; Millwood, I. Y.; McDonald, H. M.; Price, C. F.; Kaldor, J. M.; Paull, J. R. A., *Sex. Transm. Dis.* **2010**, *37*, 100.
- (102) Tao, W. C.; Richards, C.; Hamer, D., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2008**, *24*, 925.
- (103) Sonza, S.; Johnson, A.; Tyssen, D.; Spelman, T.; Lewis, G. R.; Paull, J. R. A.; Tachedjian, G., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3565.
- (104) Fantini, J.; Cook, D. G.; Nathanson, N.; Spitalnik, S. L.; Gonzalez-Scarano, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2700.
- (105) Furuta, Y.; Eriksson, K.; Svennerholm, B.; Fredman, P.; Horal, P.; Jeansson, S.; Vahlne, A.; Holmgren, J.; Czerkinsky, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12559.
- (106) Hammache, D.; Pieroni, G.; Yah, N.; Delezay, O.; Koch, N.; Lafont, H.; Tamalet, C.; Fantini, J., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7967.
- (107) Harouse, J. M.; Collman, R. G.; Gonzalez-Scarano, F., *J. Virol.* **1995**, *69*, 7383.
- (108) Yah, N.; Baghdiguian, S.; Moreau, H.; Fantini, J., *J. Virol.* **1992**, *66*, 4848.
- (109) Fantini, J.; Yah, N.; Baghdiguian, S.; Chermann, J. C., *J. Virol.* **1992**, *66*, 580.
- (110) Conboy, J. C.; McReynolds, K. D.; Gervay-Hague, J.; Saavedra, S. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 968.

- (111) Lundin, K.; Nygren, A.; Arthur, L. O.; Robey, W. G.; Morein, B.; Ramstedt, U.; Gidlund, M.; Wigzell, H., *J. Immunol. Methods* **1987**, *97*, 93.
- (112) Lasky, L. A.; Nakamura, G.; Smith, D. H.; Fennie, C.; Shimasaki, C.; Patzer, E.; Berman, P.; Gregory, T.; Capon, D. J., *Cell* **1987**, *50*, 975.
- (113) Smith, D. H.; Byrn, R. A.; Marsters, S. A.; Gregory, T.; Groopman, J. E.; Capon, D. J., *Science* **1987**, *238*, 1704.
- (114) Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Gonzalez-Scarano, F.; Silberberg, D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7131.
- (115) Alfsen, A.; Bomsel, M., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25649.
- (116) Rico-Lattes, I.; Gouzy, M. F.; Andre-Barres, C.; Guidetti, B.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1998**, *22*, 451.
- (117) Fantini, J.; Hammache, D.; Delezay, O.; Yahi, N.; AndreBarres, C.; RicoLattes, I.; Lattes, A., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7245.
- (118) Fantini, J.; Yahi, N., *M S-Med. Sci.* **1993**, *9*, 891.
- (119) Bertozzi, C. R.; Cook, D. G.; Kobertz, W. R.; Gonzalez-Scarano, F.; Bednarski, M. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10639.
- (120) Ivey-Holey, M.; Culp, J. S.; Chaikin, M. A.; Hellmig, B. D.; Matthews, T. J.; Sweet, R. W.; Rosenberg, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 512.
- (121) Augustin, L. A.; Fantini, J.; Mootoo, D. R., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1182.
- (122) Rico-Lattes, I.; Garrigues, J. C.; Pérez, E.; André-Barrès, C.; Madelaine-Dupuich, C.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1995**, *19*, 341.
- (123) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A., *Langmuir* **1999**, *15*, 6163.
- (124) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1063.
- (125) Fantini, J., Synthetic soluble analogs of glycolipids for studies of virus-glycolipid interactions. In *Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Pt A*, 2000; Vol. 311, pp 626.
- (126) McReynolds, K. D.; Gervay-Hague, J., *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1533.
- (127) Villard, R.; Hammache, D.; Delapierre, G.; Fotiadu, F.; Buono, G.; Fantini, J., *ChemBioChem* **2002**, *3*, 517.
- (128) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Gulik, A., *Chem. Commun.* **2003**, 244.
- (129) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Chem. Commun.* **2002**, 1864.
- (130) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2207.
- (131) Kensinger, R. D.; Yowler, B. C.; Benesi, A. J.; Schengrund, C.-L., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 349.
- (132) Moog, C.; Wick, A.; Leber, P.; Kirn, A.; Aubertin, A. M., *Antivir. Res.* **1994**, *24*, 275.
- (133) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Baba, M.; Schols, D.; Nakashima, H.; Balzarini, J.; Debyser, Z.; Murrer, B. A.; Schwartz, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5286.
- (134) Farzan, M.; Mirzabekov, T.; Kolchinsky, P.; Wyatt, R.; Cayabyab, M.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Sodroski, J.; Choe, H., *Cell* **1999**, *96*, 667.
- (135) Kensinger, R. D.; Catalone, B. J.; Krebs, F. C.; Wigdahl, B.; Schengrund, C. L., *Antimicrob. Agents Chemoth.* **2004**, *48*, 1614.

- (136) Larosa, G. J.; Davide, J. P.; Weinhold, K.; Waterbury, J. A.; Profy, A. T.; Lewis, J. A.; Langlois, A. J.; Dreesman, G. R.; Boswell, R. N.; Shaddock, P.; Holley, L. H.; Karplus, M.; Bolognesi, D. P.; Matthews, T. J.; Emini, E. A.; Putney, S. D., *Science* **1990**, *249*, 932.
- (137) Fantini, J.; Yahi, N.; Mabrouk, K.; Van Rietschoten, J.; Rochat, H.; Sabatier, J. M., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **1993**, *316*, 1381.
- (138) Yahi, N.; Fantini, J.; Mabrouk, K.; Tamalet, C.; Demicco, P.; Vanrietschoten, J.; Rochat, H.; Sabatier, J. M., *J. Virol.* **1994**, *68*, 5714.
- (139) Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Baghdiguiian, S.; Gonzalezscarano, F.; Fantini, J., *J. Virol.* **1995**, *69*, 320.
- (140) Benjouad, A.; Fenouillet, E.; Gluckman, J. C.; Sabatier, J. M., *Antivir. Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 195.
- (141) Fantini, J.; Yahi, N.; Mabrouk, K.; van Rietschoten, J.; Rochat, H.; Sabatier, J. M., *Lett. Peptide Sci.* **1994**, *1*, 17.
- (142) Yahi, N.; Fantini, J.; Baghdiguiian, S.; Mabrouk, K.; Tamalet, C.; Rochat, H.; Van Rietschoten, J.; Sabatier, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4867.
- (143) Cook, D. G.; Fantini, J.; Spitalnik, S. L.; Gonzalezscarano, F., *Virology* **1994**, *201*, 206.
- (144) Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; Gonzalezscarano, F.; Fantini, J., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24349.
- (145) Samson, M.; Libert, F.; Doranz, B. J.; Rucker, J.; Liesnard, C.; Farber, C. M.; Saragosti, S.; Lapoumeroulie, C.; Cognaux, J.; Forceille, C.; Muyldermans, G.; Verhofstede, C.; Burtonboy, G.; Georges, M.; Imai, T.; Rana, S.; Yi, Y. J.; Smyth, R. J.; Collman, R. G.; Doms, R. W.; Vassart, G.; Parmentier, M., *Nature* **1996**, *382*, 722.
- (146) Tagat, J. R.; McCombie, S. W.; Nazareno, D.; Labroli, M. A.; Xiao, Y. S.; Steensma, R. W.; Strizki, J. M.; Baroudy, B. M.; Cox, K.; Lachowicz, J.; Varty, G.; Watkins, R., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2405.
- (147) Este, J. A.; Telenti, A., *Lancet* **2007**, *370*, 81.
- (148) Gulick, R. M.; Su, Z. H.; Flexner, C.; Hughes, M. D.; Skolnik, P. R.; Wilkin, T. J.; Gross, R.; Krambrink, A.; Coakley, E.; Greaves, W. L.; Zolopa, A.; Reichman, R.; Godfrey, C.; Hirsch, M.; Kuritzkes, D. R., *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 304.
- (149) Schols, D.; Claes, S.; Hatse, S.; Princen, K.; Vermeire, K.; De Clercq, E.; Skerlj, R.; Bridger, G.; Calandra, G. In 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, 2003; 2003; p 257.
- (150) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; Devreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R.; Thornton, D.; Skerlj, R.; Gaul, F.; Padmanabhan, S.; Bridger, G.; Henson, G.; Abrams, M., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 668.
- (151) DeVreese, K.; KoflerMongold, V.; Leutgeb, C.; Weber, V.; Vermeire, K.; Schacht, S.; Anne, J.; DeClercq, E.; Datema, R.; Werner, G., *J. Virol.* **1996**, *70*, 689.
- (152) Princen, K.; Hatse, S.; Vermeire, K.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Gerlach, L. O.; Rosenkilde, M.; Schwartz, T. W.; Skerlj, R.; Bridger, G.; Schols, D., *J. Virol.* **2004**, *78*, 12996.
- (153) Schols, D., *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 216.
- (154) Geijtenbeek, T. B. H.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C. F.; Adema, G. J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G., *Cell* **2000**, *100*, 575.

- (155) Geijtenbeek, T. B. H.; Kwon, D. S.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C. F.; Middel, J.; Cornelissen, I.; Nottet, H.; KewalRamani, V. N.; Littman, D. R.; Figdor, C. G.; van Kooyk, Y., *Cell* **2000**, *100*, 587.
- (156) Banchereau, J.; Steinman, R. M., *Nature* **1998**, *392*, 245.
- (157) Pohlmann, S.; Leslie, G. J.; Edwards, T. G.; MacFarlan, T.; Reeves, J. D.; Hiebenthal-Millow, K.; Kirchhoff, F.; Baribaud, F.; Doms, R. W., *J. Virol.* **2001**, *75*, 10523.
- (158) Cambi, A.; de Lange, F.; van Maarseveen, N. M.; Nijhuis, M.; Joosten, B.; van Dijk, E.; de Bakker, B. I.; Franssen, J. A. M.; Bovee-Geurts, P. H. M.; van Leeuwen, F. N.; Van Hulst, N. F.; Figdor, C. G., *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 145.
- (159) Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28939.
- (160) Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I., *Science* **2001**, *294*, 2163.
- (161) Rojo, J.; Delgado, R., *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 579.
- (162) Tabarani, G.; Reina, J. J.; Ebel, C.; Vives, C.; Lortat-Jacob, H.; Rojo, J.; Fieschi, F., *FEBS J.* **2006**, *580*, 2402.
- (163) Arce, E.; Nieto, P. M.; Diaz, V.; Castro, R. G.; Bernad, A.; Rojo, J., *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 817.
- (164) Lasala, F.; Arce, E.; Otero, J. R.; Rojo, J.; Delgado, R., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3970.
- (165) Zhu, P.; Chertova, E.; Bess Jr., J.; Lifson, J. D.; Arthur, L. O.; Liu, J.; Taylor, K. A.; Roux, K. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15812.
- (166) Wang, S. K.; Liang, P. H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T. L.; Hsieh, S. L.; Burton, D. R.; Wong, C. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3690.
- (167) Huisgen, R., *B. Soc. Chim. Fr.* **1965**, 3431.
- (168) Eckert, D. M.; Kim, P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11187.
- (169) Eckert, D. M.; Kim, P. S., *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 777.
- (170) Lazzarin, A.; Clotet, B.; Cooper, D.; Reynes, J.; Arasteh, K.; Nelson, M.; Kattama, C.; Stellbrink, H. J.; Delfraissy, J. F.; Lange, J.; Huson, L.; DeMasi, R.; Wat, C.; Delehanty, J.; Drobnes, C.; Salgo, M., *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2186.
- (171) Orloff, G. M.; Orloff, S. L.; Kennedy, M. S.; Maddon, P. J.; McDougal, J. S., *J. Immunol.* **1991**, *146*, 2578.
- (172) Rieber, E. P.; Federle, C.; Reiter, C.; Krauss, S.; Gurtler, L.; Eberle, J.; Deinhardt, F.; Riethmuller, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10792.
- (173) Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A., *Science* **1992**, *256*, 1783.
- (174) De Clercq, E., *Antiviral Res.* **1998**, *38*, 153.
- (175) De Clercq, E., *Antiviral Res.* **2005**, *67*, 56.
- (176) De Clercq, E., *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115.
- (177) Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J., *ChemMedChem* **2006**, *1*, 16.
- (178) Chong, Y. H.; Chu, C. K., *Antiviral Res.* **2004**, *63*, 7.
- (179) Chu, C. K.; Yadav, V.; Chong, Y. H. H.; Schinazi, R. F., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3949.
- (180) Patri, A. K.; Majoros, I. J.; Baker, J. R., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466.
- (181) Jeyprasesphant, R.; Penny, J.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A., *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1543.
- (182) Thomas, S. A., *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1313.

- (183) Auger, M. J.; Ross, J. A., *The Natural Immune System: The Macrophage*. C. E. Lewis, J. O. D. Mcgee (Eds.), 1992, 2 p.
- (184) Bender, A. R.; vonBriesen, H.; Kreuter, J.; Duncan, I. B.; RubsamenWaigmann, H., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1467.
- (185) Najjar, V. A., *Drug Future* **1987**, *12*, 147.
- (186) Fridkin, M.; Najjar, V. A., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*, 1.
- (187) Agrawal, A. K.; Gupta, C. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 135.
- (188) Savarino, A.; Pistello, M.; D'Ostilio, D.; Zabogli, E.; Taglia, F.; Mancini, F.; Ferro, S.; Matteucci, D.; De Luca, L.; Barreca, M. L.; Ciervo, A.; Chimirri, A.; Ciccozzi, M.; Bendinelli, M., *Retrovirology* **2007**, *4*.
- (189) Dubey, S.; Satyanarayana, Y. D.; Lavania, H., *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 1159.
- (190) Daelemans, D.; Vandamme, A. M.; De Clercq, E., *Antivir. Chem. Chemother.* **1999**, *10*, 1.
- (191) Arya, S. K.; Guo, C.; Josephs, S. F.; Wongstaal, F., *Science* **1985**, *229*, 69.
- (192) Dayton, A. I.; Sodroski, J. G.; Rosen, C. A.; Goh, W. C.; Haseltine, W. A., *Cell* **1986**, *44*, 941.
- (193) Roy, S.; Delling, U.; Chen, C. H.; Rosen, C. A.; Sonenberg, N., *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1365.
- (194) Dingwall, C.; Ernberg, I.; Gait, M. J.; Green, S. M.; Heaphy, S.; Karn, J.; Lowe, A. D.; Singh, M.; Skinner, M. A., *EMBO J.* **1990**, *9*, 4145.
- (195) Weeks, K. M.; Crothers, D. M., *Cell* **1991**, *66*, 577.
- (196) Churcher, M. J.; Lamont, C.; Hamy, F.; Dingwall, C.; Green, S. M.; Lowe, A. D.; Butler, P. J. G.; Gait, M. J.; Karn, J., *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 90.
- (197) Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker Jr, J. R., *Pharm. Sci. Technol. To.* **2000**, *7*, 232.
- (198) Zhao, H.; Li, J. R.; Xi, F.; Jiang, L., *FEBS J.* **2004**, *563*, 241.
- (199) De Clercq, E., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1800.
- (200) Flexner, C., *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 1281.
- (201) Friedman, S. H.; Decamp, D. L.; Sijbesma, R. P.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Kenyon, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6506.
- (202) Schinazi, R. F.; Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Hill, C. L.; Wudl, F., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1707.
- (203) Moussa, F.; Trivin, F.; Ceolin, R.; Hadchouel, M.; Sizaret, P. Y.; Greugny, V.; Fabre, C.; Rassat, A.; Szwarc, H., *Fuller. Sci. Technol.* **1996**, *4*, 21.
- (204) Friedman, S. H.; Ganapathi, P. S.; Rubin, Y.; Kenyon, G. L., *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2424.
- (205) Schinazi, R. F.; Brettreich, M.; Hirsch, A. Water-soluble Dendrimeric Fullerene as anti-HIV therapeutic. US0036562. 2-20-2003.
- (206) Sharp, P. A., *Genes Dev.* **2001**, *15*, 485.
- (207) Coburn, G. A.; Cullen, B. R., *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 753.
- (208) Dykxhoorn, D. M.; Novina, C. D.; Sharp, P. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 457.
- (209) Lee, M. T. M.; Coburn, G. A.; McClure, M. O.; Cullen, B. R., *J. Virol.* **2003**, *77*, 11964.
- (210) Han, W. L.; Wind-Rotolo, M.; Kirkman, R. L.; Morrow, C. D., *Virology* **2004**, *330*, 221.
- (211) Cruz, L. J.; Iglesias, E.; Aguilar, J. C.; Cabrales, A.; Reyes, O.; Andreu, D., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 112.
- (212) Iglesias, E.; Aguilar, J. C.; Cruz, L. J.; Reyes, O., *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 99.

- (213) Flinn, N. S.; Quibell, M.; Turnell, W. G.; Monk, T. P.; Ramjee, M. K., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 1010.
- (214) Cruz, L. J.; Iglesias, E.; Aguilar, J. C.; Gonzalez, L. J.; Reyes, O.; Albericio, F.; Andreu, D., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 112.
- (215) Misumi, S.; Endo, M.; Mukai, R.; Tachibana, K.; Umeda, M.; Honda, T.; Takamune, N.; Shoji, S., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32335.
- (216) Misumi, S.; Nakajima, R.; Takamune, N.; Shoji, S., *J. Virol.* **2001**, *75*, 11614.
- (217) Misumi, S.; Takamune, N.; Ido, Y.; Hayashi, S.; Endo, M.; Mukai, R.; Tachibana, K.; Umeda, M.; Shoji, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 1309.
- (218) Rym, B.; Marie-Jeanne, P.; Raymond, M.; Régis, G.; Emmanuel, F., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 235.
- (219) Wang, L. X.; Ni, J. H.; Singh, S., *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 159.
- (220) Barbouche, R.; Feyfant, E.; Belhaj, B.; Fenouillet, E., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2002**, *18*, 201.
- (221) Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Yachi, Y.; Sato, S.; Uryu, T., *J. Polym. Sci. A., Polym. Chem.* **2002**, *40*, 3622.
- (222) Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Tokunaga, S.; Uryu, T., *Macromolecules* **2003**, *36*, 7100.
- (223) Kantchev, E. A.; Chang, C. C.; Chang, D. K., *Biopolymers* **2006**, *84*, 232.
- (224) Wang, L. X.; Ni, J. H.; Singh, S.; Li, H. G., *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 127.

**Chapitre II : Design,
synthèse et propriétés
biologiques de nouveaux
dendrimères phosphorés
anti-VIH**

CHAPITRE II : DESIGN, SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE NOUVEAUX DENDRIMÈRES PHOSPHORES ANTI-VIH	99
II.1 INTRODUCTION	103
II.2 CADRE DU SUJET ET PROBLÉMATIQUE	103
II.3 OBJECTIFS	107
II.4 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	109
II.4.1 Synthèse des squelettes dendritiques PPH.....	109
II.4.2 Fonctionnalisation de la surface des dendrimères PPH.....	111
II.4.3 Formation des amphiphiles catanioniques.....	117
II.5 STRATÉGIE GÉNÉRALE POUR LA SYNTHÈSE DES DENDRIMÈRES PPH.....	119
II.5.1. Greffage de fonction phosphonate en surface.....	119
II.5.2 Transformation des alkyl-phosphonate en acides phosphoniques correspondants ...	120
II.5.3 Formation des dendrimères catanioniques	121
II.6 RESULTATS	122
II.6.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate 1x-G1	122
II.6.1.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate 1a-G1	122
II.6.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 1b-G1	123
II.6.1.3 Synthèse du dendrimère chargé 1c-G1 et de son analogue catanionique 1d-G1	124
II.6.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate 2x-G1 ..	125
II.6.2.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate 2a-G1	125
II.6.2.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 2b-G1	126
II.6.2.3 Synthèse du dendrimère sel de sodium 2c-G1 et son analogue catanionique 2d-G1	127
II.6.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate 3x-G1 , 4x-G1 et 5x-G1	127
II.6.3.1 Généralités.....	127
II.6.3.2 Synthèse de phénols : Série α -alkylphosphonate 3a , 4a et 5a	128
II.6.3.3 Synthèse des dendrimères à terminaisons diméthylphosphonate 3a-G1 , 4a-G1 et 5a-G1	130
II.6.3.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 3b-G1 , 4b-G1 et 5b-G1	131
II.6.3.5 Synthèse des dendrimères sel de sodium, 3c-G1 , 4c-G1 et 5c-G1	132
II.6.3.6 Analyse structurale par spectroscopie de RMN 2D de 4c-G1 et 5c-G1	132
II.6.3.7 Synthèse des dendrimères catanioniques 3d-G1 , 4d-G1 et 5d-G1	136

II.7 COMPILATION DES DONNEES RMN.....	137
II.8 PROPRIETES BIOLOGIQUES DE NOUVEAUX CATIONIQUES DENDRITIQUES ANALOGUES DU GALCER ET DE LEURS PRECURSEURS POLY-ANIONIQUES	138
II.8.1 Définitions	138
II.8.2 Lignée cellulaire et souche virale	138
II.8.3 Méthode utilisée.....	139
II.8.4 Activité anti-VIH et viabilité cellulaire	139
II.8.4.1 Sel de sodium Nc-G1	139
II.8.4.2 Dérivés cationiques Nd-G1	142
II.9 CONCLUSIONS	144
II.10 BIBLIOGRAPHIE	146

I.1 Introduction

Parmi l'arsenal de produits conçus pour combattre l'épidémie du SIDA, les inhibiteurs d'entrée apparaissent comme des bons candidats pour les poly-thérapies actuelles. Les inhibiteurs d'entrée ont pour cible le virus ou les cellules susceptibles d'être infectées. Ils peuvent agir de façon non spécifique ou spécifique, comme nous l'avons vu au Chapitre I.

Une de ces approches a été développée au sein de nos laboratoires. Plusieurs familles d'analogues du GalCer ont été synthétisées.⁽¹⁻⁷⁾ Parmi eux, des analogues multivalents du GalCer visant la gp120 sont de bons inhibiteurs du VIH.^(8, 9) Il a été montré que leur activité de l'ordre du submicromolaire dépend fortement de la structure du cœur. Il existe un effet de multivalence mais il n'existe pas d'effet dendritique. Cependant, ils montrent une toxicité cellulaire non-négligeable. Ces points font l'objet d'un rappel bibliographique en début de Chapitre.

Afin de diminuer une telle cytotoxicité et d'étudier l'influence de la périphérie du dendrimère sur son activité et sur sa toxicité, nous proposons une série de nouveaux systèmes catanioniques multivalents constitués par des dendrimères de première génération à terminaison acide phosphonique et des unités de N-hexadécylaminolactitol. Les mêmes squelettes dendritiques sous forme de sels de sodium permettront de comparer directement leur relation structure/activité avec celle des assemblages catanioniques.

II.2 Cadre du sujet et problématique

Le galactosylcéramide ou GalCer est un glycosphingolipide qui agit comme récepteur membranaire de la gp120 du VIH.^(10, 11) Une alternative pour empêcher l'infection des cellules par le VIH est de bloquer la reconnaissance entre le virus et les récepteurs cellulaires (GalCer ou CD4).^(3, 12) Ainsi, l'utilisation d'analogues solubles du GalCer peut permettre la saturation des sites de gp120 et en conséquence inhiber l'étape de reconnaissance. Dans ce contexte, plusieurs familles d'analogues du GalCer ont été synthétisés au laboratoire.⁽¹⁻⁷⁾ Ces composés ont été synthétisés à partir du lactose non protégé en trois étapes. Pour introduire une deuxième chaîne sur la structure de l'analogue du GalCer, une étape d'acylation est nécessaire.⁽¹³⁾ Plus tard, cette liaison amide est remplacée par une liaison amine-acide ionique, ce qui mène à la formation des analogues catanioniques du GalCer par une simple réaction acido-basique.⁽⁶⁾

D'autre part, comme nous l'avons déjà vu dans le Chapitre I, la plupart des processus de reconnaissance cellulaire se produisent par des interactions multivalentes.^(14, 15) En fait, l'inhibition de ces processus est plus efficace quand des inhibiteurs multivalents sont employés au lieu du même

nombre d'inhibiteurs monovalents.⁽¹⁶⁾ Ces derniers ont un mécanisme d'action compétitif tandis que leurs analogues multivalents peuvent empêcher la fixation du virus à la surface par une combinaison de deux mécanismes : une inhibition compétitive multivalente et/ou une inhibition stérique.

Une collaboration entre les laboratoires LCC et IMRCP a permis de développer de nouveaux systèmes multivalents analogues du GalCer. Ces systèmes sont des dendrimères catanioniques qui comportent une grande densité de sites de reconnaissance à leur surface. De cette manière, on augmente la probabilité d'interaction entre le virus et le leurre sans augmenter la concentration active en produit.⁽⁹⁾

Ces dendrimères catanioniques à cœur thiophosphate⁽⁸⁾ ou cyclotriphosphazène⁽⁹⁾ sont élaborés à différentes générations avec 6 ou 12 fonctions acide cinnamique à la surface (Figure II.1). La synthèse de ces dérivés dendritiques analogues du GalCer consiste en la réaction acide-base dans l'eau entre 6 ou 12 équivalents de N-hexadécylamino-1-déoxylactitol **L16** pour 1 équivalent de dendrimère comportant 6 ou 12 fonctions acides en surface.⁽⁹⁾ La stabilité de l'assemblage catanionique final est favorisée par les interactions hydrophobes entre l'intérieur du dendrimère et les longues chaînes alkyle de l'aminolactitol **L16**.

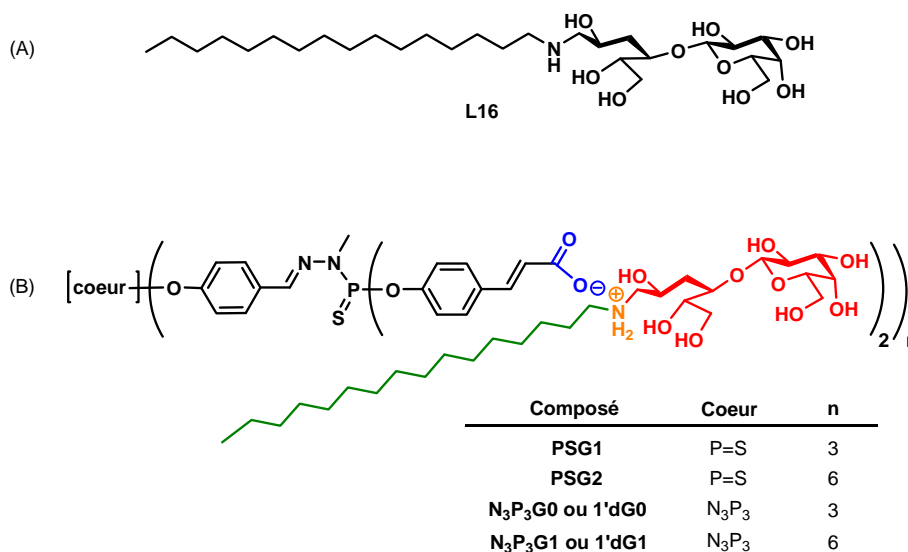


Figure II.1 (A) Structure du N-hexadécylamino-1-déoxylactitol, **L16**. (B) Structure des premiers dendrimères catanioniques analogues du GalCer

Les résultats obtenus lors des tests *in vitro* pour l'activité anti-VIH et la cytotoxicité de ces composés dendritiques sur des cellules CEM-SS possédant le récepteur CD4 sont reportés sur le Tableau II.1.⁽⁹⁾

L'activité inhibitrice relative de ces dendrimères catanioniques multivalents ($RCI_{50} = 1,44-13,2 \mu\text{M}$; RCI_{50} représente la concentration inhibitrice normalisée, exprimée comme la concentration

inhibitrice du dérivé catanionique dendritique multipliée par N sites actifs) est nettement supérieure (5 à 35 fois plus) que l'addition des activités d'un nombre équivalent d'inhibiteurs monovalents analogues du GalCer (**L16**). Il y a un effet multivalent (Tableau II.1).

Composé	N	CI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	RCI ₅₀ (μM)	IT
G1 cœur P=S	6	2,1	3,5	12,6	1,7
G2 cœur P=S	12	1,1	2,9	13,2	2,6
G0 cœur N₃P₃	6	0,37	9,3	2,22	25
G1 cœur N₃P₃	12	0,12	3,9	1,44	32
L16	1	50	70	50	1,4

$$RCI_{50} = N \times CI_{50}; IT = CC_{50} / CI_{50}$$

Tableau II.1 Résultats des tests *in vitro* des analogues catanioniques dendritiques pour l'inhibition de l'infection par le VIH sur des cellules CEM-SS⁽⁹⁾

La différence d'IT entre les dendrimères possédant le même nombre de motifs sucre à la surface mais un cœur différent indique que l'activité anti-VIH dépend fortement de la structure du cœur, elle-même responsable de la conformation de l'assemblage catanionique. Ainsi, les modèles moléculaires montrent que les assemblages catanioniques à cœur trifonctionnel adoptent une structure en forme de « chou-fleur » alors que les dendrimères à cœur hexafonctionnel conduisent à une structure cylindrique (Figure II.2). Ces derniers sont moins compacts, leurs sites actifs sont vraisemblablement plus accessibles pour interagir avec la gp120 du VIH. Pour cette raison ces dendrimères sont jusqu'à 9 fois plus actifs que les dendrimères à cœur trifonctionnel.⁽⁹⁾

De plus, les chaînes alkyle présentes dans la structure des analogues du GalCer jouent un rôle décisif dans l'interaction avec la gp120 virale.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Ces dendrimères catanioniques ont des RCI₅₀ de l'ordre d'une micromole pour les quatre assemblages catanioniques, c'est-à-dire, entre 100 et 1000 fois plus actifs que les glycodendrimères analogues covalents du GalCer, dépourvus de chaînes alkyle synthétisés par Kensinger *et al.* qui obtiennent des RCI₅₀ de l'ordre d'une millimole (c.f. I.2.3.1.1.2).^(20, 21)

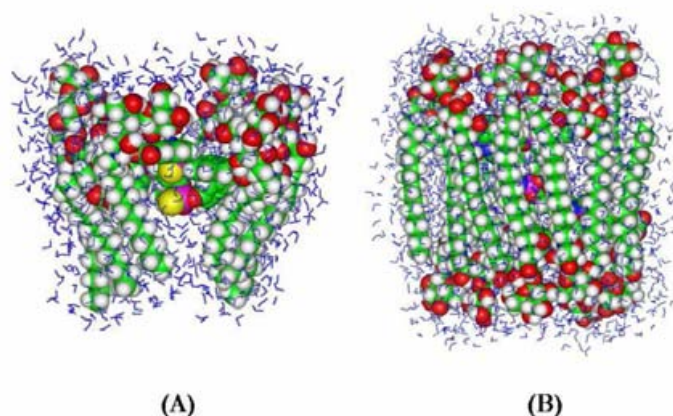


Figure II.2 Modèles moléculaires obtenus après minimisation dans l'eau des tensioactifs catanioniques dendritiques (A) à cœur trifonctionnel (G2 cœur P=S) et (B) à cœur hexafonctionnel (G1 cœur N₃P₃).⁽⁹⁾ Ces modélisations ont été effectuées en utilisant le logiciel Insight II avec le champ de force esff et le programme Discover 3. La structure de rayons X du N₃P₃(OPh)₆ enregistré dans la base de données Cambridge a été utilisée pour la modélisation des dendrimères à cœur cyclotriphosphazène. La structure 3D de chaque dendrimère a été entourée avec une couche de 5 Å de molécules d'eau.

En dépit de la bonne activité antivirale de ces composés, ces derniers présentent une toxicité cellulaire non négligeable. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette toxicité.

La première hypothèse explique la toxicité par une incorporation des assemblages catanioniques à la membrane plasmique causée par la conformation adoptée par ces associations dendritiques. De cette façon, l'arrangement en chou-fleur des chaînes alkyle hydrophobes dans les dendrimères à cœur trifonctionnel peut permettre l'interaction des chaînes alkyle avec la membrane cellulaire puis son incorporation et peut perturber les fonctions cellulaires. Par contre, les chaînes alkyles des associations catanioniques hexafonctionnelles qui ont une conformation cylindrique minimisent leurs interactions avec l'eau en s'associant fortement entre elles par effets hydrophobes. De cette manière, l'accessibilité de ces chaînes est très réduite et l'interaction et la fusion du dérivé avec la membrane cellulaire est peu favorable. Néanmoins cette hypothèse ne suffit pas à expliquer la toxicité relativement élevée qui est systématiquement observée pour ces systèmes.

Une deuxième hypothèse consiste à expliquer la cytotoxicité par une dissociation partielle de l'entité catanionique à chaque extrémité du dendrimère (Figure II.3). Cela suggère que les interactions lipophiles entre les branches du dendrimère et les chaînes alkyle de l'aminolactitol sont faibles. En conséquence, les unités d'aminolactitol peuvent être libres dans le milieu cellulaire. Dans ce contexte, ce type de molécules amphiphiles peut être employé pour l'extraction de protéines des membranes biologiques. Ainsi, des études précédentes montrent que les N-alkylamino-1-déoxylactitols sont capables d'extraire des récepteurs opiate (op) des cellules du cerveau de grenouille.⁽¹³⁾ En effet, ces N-

alkylamino-1-déoxylactitols libres forment des micelles ellipsoïdales qui semblent favoriser la dissolution des protéines de membrane. Enfin, si l'assemblage catanionique est dissocié dans le milieu biologique, l'aminolactitol libre peut déséquilibrer l'organisation cellulaire par un effet de détergence et cela peut être l'origine de la cytotoxicité observée.

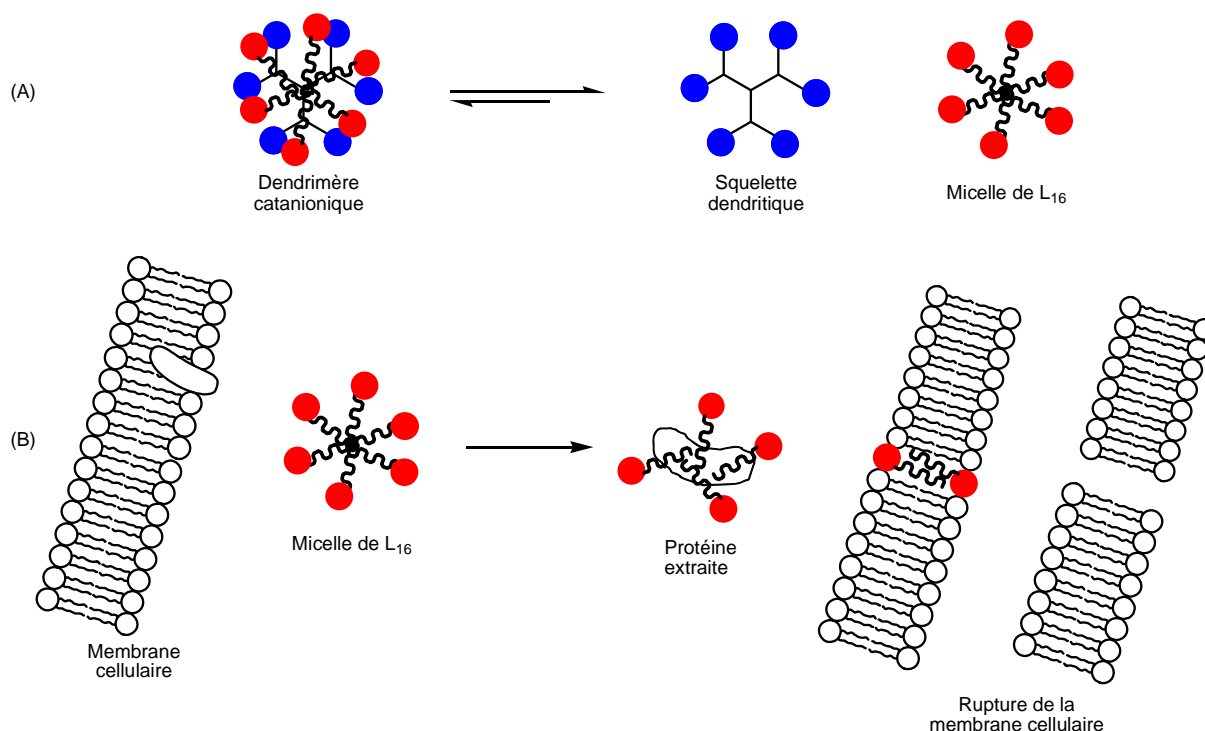


Figure II.3 (A) Dissociation de l'assemblage catanionique dans le milieu cellulaire. (B) Rupture de la membrane cellulaire provoquée par l'extraction de protéines

II.3 Objectifs

L'objet de ce Chapitre est d'évaluer l'influence de modifications structurales visant à stabiliser la paire d'ions sur les activités biologiques des dendrimères catanioniques. Les dendrimères poly-anioniques précurseurs des analogues catanioniques correspondants seront aussi évalués (Figure II.4).

Nous allons ainsi concevoir des inhibiteurs d'entrée du VIH qui bloquent la boucle V3 rendant cette dernière incapable d'interagir avec le récepteur cellulaire CD4.^(3, 12) Ces inhibiteurs ont des modes d'action différents :

(1) Des inhibiteurs dendritiques poly-anioniques qui vont interagir de façon non spécifique avec le virus en bloquant les sites chargés positivement de la boucle V3 de la gp120 par des interactions électrostatiques avec le poly-anion (Figure II.4, A).

(2) Des inhibiteurs dendritiques analogues du GalCer qui vont reconnaître et se fixer de façon spécifique sur la boucle V3 de la gp120 ce qui permet de neutraliser l'infection par le VIH sur des

cellules possédant le GalCer à leur surface mais aussi sur les cellules possédant le récepteur CD4. (Figure II.4, B).^(3,12)

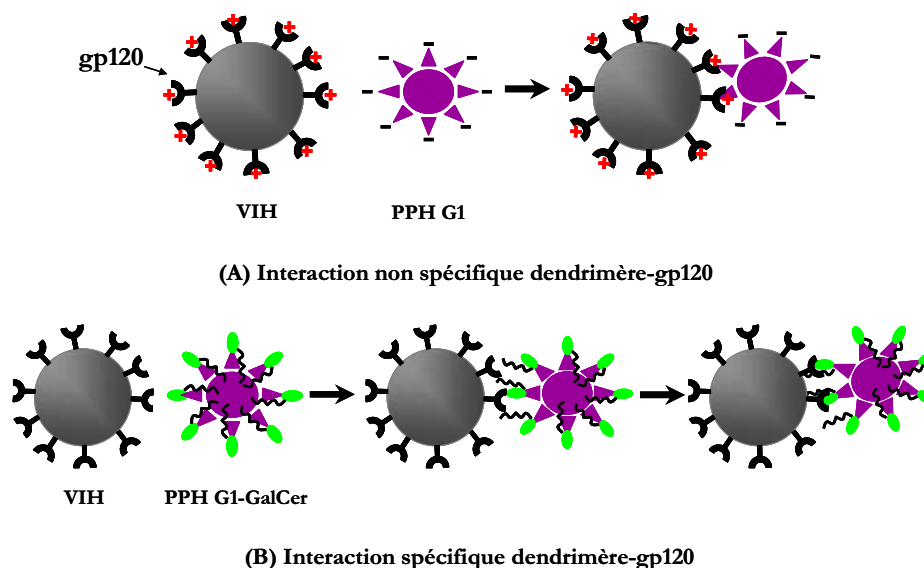


Figure II.4 (A) Interaction non spécifique des dendrimères PPH poly-anioniques avec la gp120. (B) Interaction spécifique des dendrimères PPH analogues du GalCer avec la boucle V3

La synthèse de nouvelles structures dendritiques a pour but de créer des assemblages catanioniques avec une toxicité inférieure à celle des dendrimères catanioniques précédents.^(8,9) Dans ce contexte, les modifications suivantes vont être réalisées pour tenter de consolider l'association catanionique : (i) remplacer la fonction acide carboxylique par une fonction acide phosphonique, (ii) renforcer les interactions lipophiles entre les branches hydrophobes du dendrimère et les chaînes alkyle de l'aminolactitol par introduction de chaînes alkyle de longueur différente sur ce squelette dendritique, à proximité de la paire d'ions. Finalement, nous allons aussi étudier l'influence d'un groupe hydrophile proche de la paire d'ions.

En outre, nous allons synthétiser les sels de sodium de ces structures dendritiques pour évaluer l'influence de la structure dendritique en l'absence des unités d'aminolactitol. En fait, nous avons déjà vu que les inhibiteurs ayant pour base des polymères et des dendrimères anioniques ont de très bonnes activités anti-VIH.⁽²²⁻²⁵⁾ Nous allons synthétiser et évaluer les activités et les toxicités de ces deux types d'inhibiteurs de reconnaissance : les dendrimères à terminaisons phosphonate poly-anioniques (interaction non spécifique) et catanioniques (interaction spécifique) (Figure II.5).

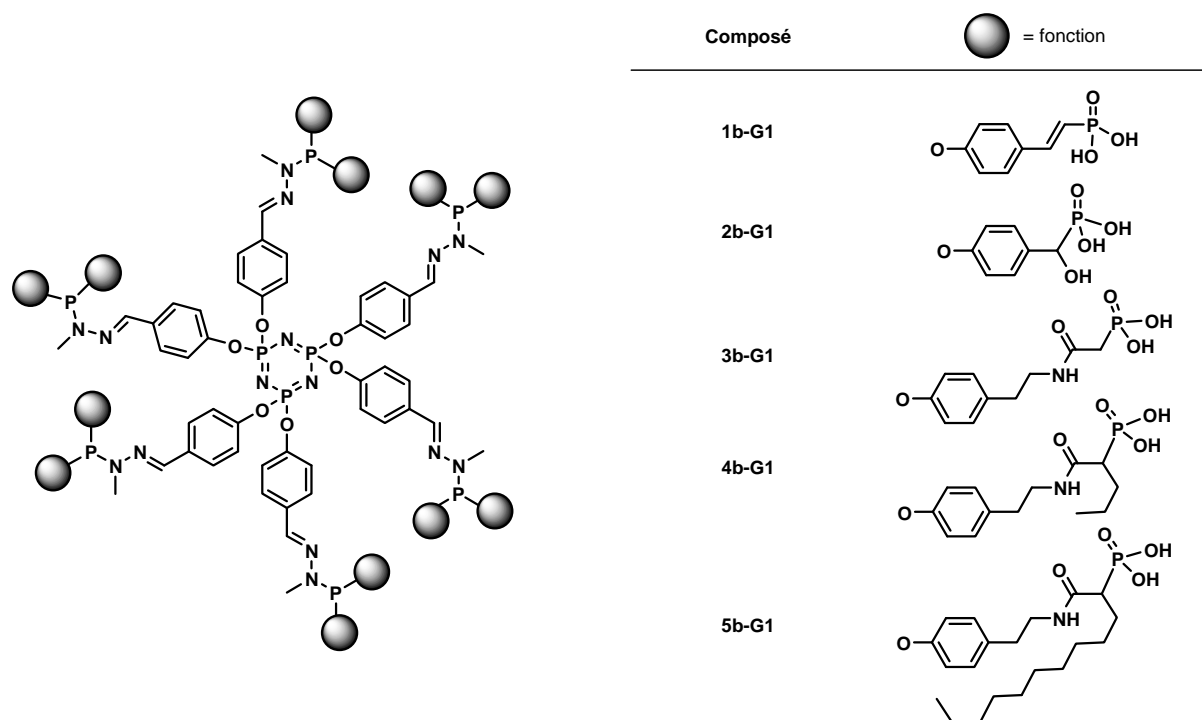


Figure II.5 Dendrimères à terminaisons acide phosphonique **Nb-G1** avec les nouvelles modifications structurales

II.4 Rappels bibliographiques

II.4.1 Synthèse des squelettes dendritiques PPH

Pour développer ces nouveaux inhibiteurs synthétiques du VIH, nous utilisons comme squelette les dendrimères phosphorés.

Les dendrimères phosphorés PPH synthétisés dans notre groupe possèdent des phosphores pentavalents au cœur et à leurs points de divergence. Ces dendrimères peuvent avoir à la périphérie deux types de fonctions très réactives : des groupes aldéhyde ou des groupes électrophiles PSCl_2 .

La synthèse originale des dendrimères PPH à cœur hexachlorocyclotriphosphazène développée par Launay *et al.*⁽²⁶⁻²⁸⁾ se déroule en deux étapes. La première étape consiste en la réaction de l'hexachlorocyclotriphosphazène avec le sel de sodium du 4-hydroxybenzaldéhyde (Schéma II.1). Le produit résultant est traité avec le N-méthylchlorothiophosphorhydrazide pour obtenir la génération 1 d'un dendrimère qui a 12 atomes de chlore à sa surface. Avec cette méthode divergente qui consiste en la répétition de ces deux étapes, on peut faire croître le dendrimère au moins jusqu'à la génération 8 à partir du cœur cyclotriphosphazène.⁽²⁶⁾

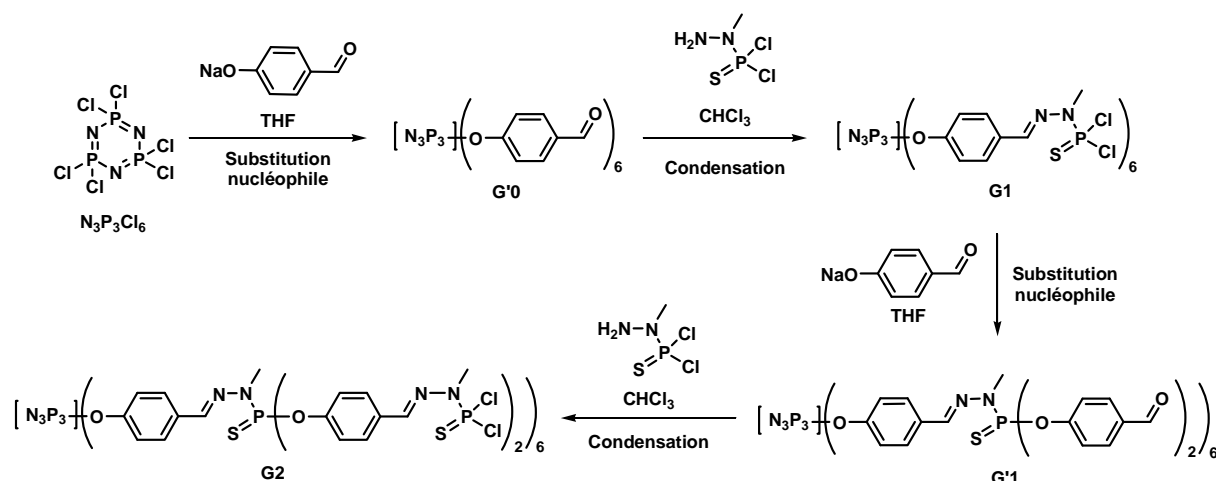


Schéma II.1 Croissance dendritique des dendrimères phosphorés à cœur cyclotriphosphazène

Les réactions employées dans cette méthode divergente sont des réactions simples, sélectives et quantitatives qui permettent un contrôle parfait de la croissance dendritique. Les produits secondaires sont le chlorure de sodium et l'eau. De plus, des étapes de protection/déprotection ne sont pas nécessaires dans cette stratégie synthétique car les fonctions aldéhydes ne sont pas affectées par la substitution nucléophile et les fonctions chlorure de thiophosphoryle ne réagissent pas au cours de l'étape de condensation.

Pour un suivi efficace de chacune de ces étapes synthétiques et pour la détection des défauts dans ces structures, la spectroscopie de RMN est un excellent outil.⁽²⁹⁾ En fait, la spectroscopie de RMN du phosphore 31 permet d'identifier les atomes de phosphore correspondant au cœur et aux différentes générations ou points de divergence car leurs signaux ont des déplacements chimiques et des intensités spécifiques (Tableau II.2).⁽²⁷⁾ Les spectroscopies de RMN du proton et du carbone 13 permettent également de vérifier la disparition des signaux des fonctions aldéhyde (à 9,97 ppm pour le proton et à 189,9 ppm pour le carbonyle). Même si la sensibilité de la sonde de phosphore 31 permet de contrôler la pureté des dendrimères (la sensibilité des appareils utilisés est environ de 0,5%), pour les générations supérieures à 6, le signal des atomes de phosphore du cœur se distingue mal et les signaux des atomes de phosphore des branches avec un environnement quasi-similaire sont souvent superposés. Néanmoins les signaux des phosphores des niveaux de divergence les plus extérieurs sont parfaitement différenciables.

Génération	Nombre de fonctions de surface Cl/CHO	$\delta(^{31}\text{P}_0)$	$\delta(^{31}\text{P}_1)$	$\delta(^{31}\text{P}_2)$	$\delta(^{31}\text{P}_3)$	$\delta(^{31}\text{P}_4)$	$\delta(^{31}\text{P}_5)$	$\delta(^{31}\text{P}_6)$	$\delta(^{31}\text{P}_7)$	$\delta(^{31}\text{P}_8)$
G'0	-/6	7,3								
G1	12/-	8,4	62,6							
G'1	-/12	8,2	60,6							
G2	24/-	8,4	62,2	63,0						
G'2	-/24	8,4	62,5	60,5						
G3	48/-	8,5	62,2	62,5	63,0					
G'3	-/48	8,4	60,4	62,5	62,7					
G4	96/-	8,3	62,1	62,6	62,7	63,0				
G'4	-/96	8,3	60,4	62,4	62,7	63,1				
G5	192/-	-	62,8	62,8	62,0	62,4	63,0			
G'5	-/192	-	62,9	62,9	62,7	62,3	60,4			
G6	384/-	-	63,0	63,0	62,5	62,4	62,0	63,0		
G'6	-/384	-	62,9	62,9	62,9	62,7	62,3	60,4		
G7	768/-	-	63,1	63,1	63,1	62,6	62,4	62,0	63,1	
G'7	-/768	-	63,0	63,0	63,0	63,0	62,7	62,3	60,4	
G8	1536/-	-	63,1	63,1	63,1	63,1	62,6	62,3	62,1	63,1
G'8	-/1536	-	62,9	62,9	62,9	62,9	62,9	62,7	62,3	60,4

Tableau II.2. Déplacements chimiques des dendrimères à cœur cyclotriphosphazène de générations 1 à 8. P_0 correspond à l'atome de P du cœur et P_i ($i = 1$ à 8) pour l'atome de P de génération i ($\delta(^{31}\text{P}_i)$: ppm)⁽²⁶⁾

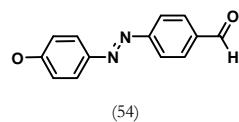
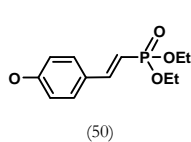
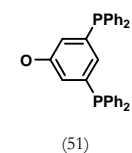
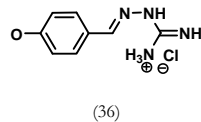
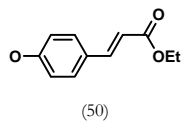
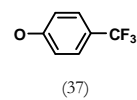
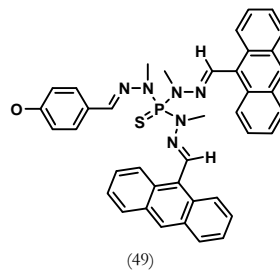
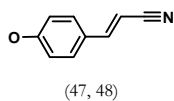
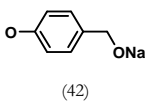
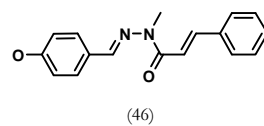
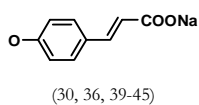
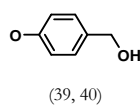
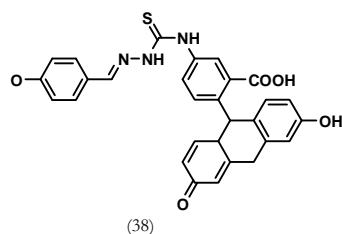
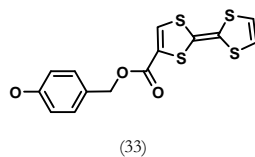
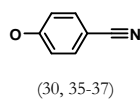
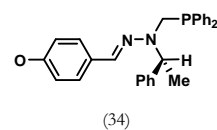
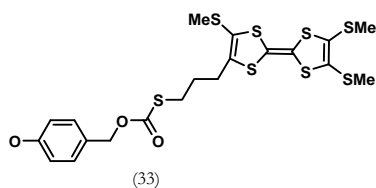
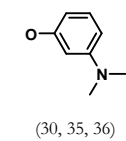
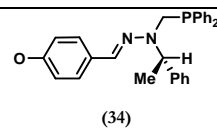
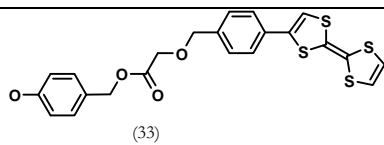
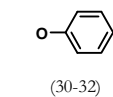
II.4.2 Fonctionnalisation de la surface des dendrimères PPH

Les dendrimères phosphorés de type **GN** et **G'N** (**N** = nombre de génération) possèdent un intérieur hydrophobe mais leur surface peut être fonctionnalisée par de nombreux groupements chimiques hydrophiles ou hydrophobes selon leurs applications postérieures (matériaux, catalyse ou biologie) (Tableau II.3). En effet, comme nous l'avons déjà vu dans le Chapitre I, les propriétés physico-chimiques macroscopiques des dendrimères en raison de leur forme pseudo-globulaire, dépendent fortement de la nature des fonctions de surface.

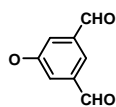


R = groupes fonctionnels à la surface des dendrimères PPH

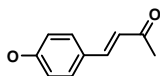
R



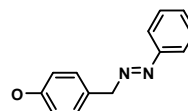
R



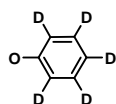
(52)



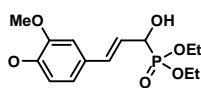
(48, 53)



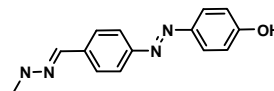
(37)



(55)



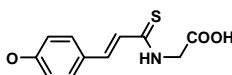
(46)



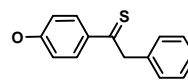
(56)



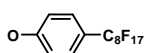
(49)



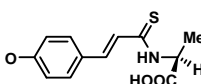
(45)



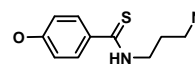
(57)



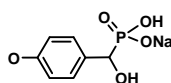
(30, 36, 58)



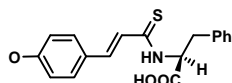
(45)



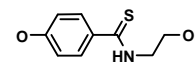
(59)



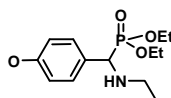
(38, 50)



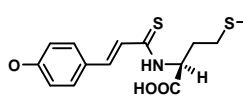
(45)



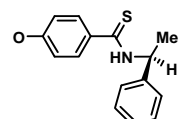
(59)



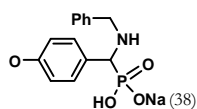
(46)



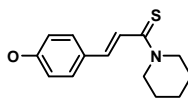
(45)



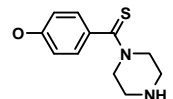
(59)



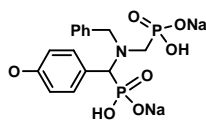
(38)



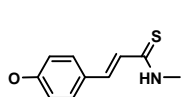
(50)



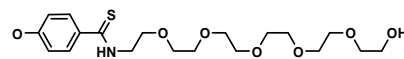
(59)



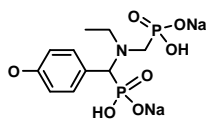
(38)



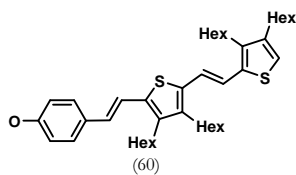
(50)



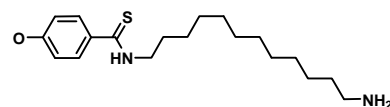
(59)



(38)

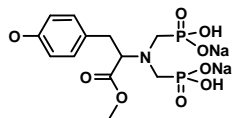


(60)

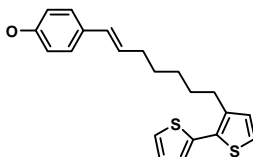


(59)

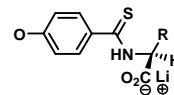
R



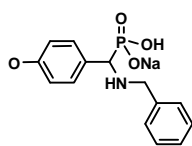
(38)



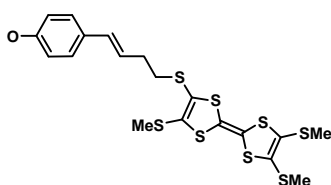
(30, 40, 61)



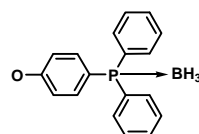
(44)



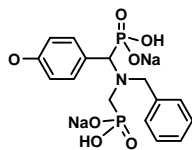
(62)



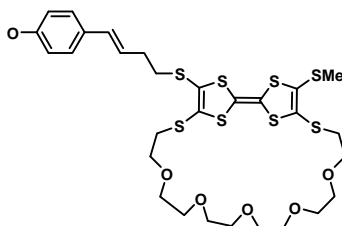
(63)



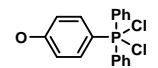
(40, 42, 56, 64, 65)



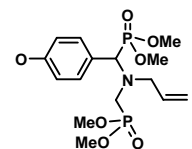
(62)



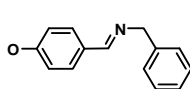
(30, 40, 63)



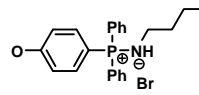
(65)



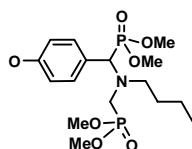
(66)



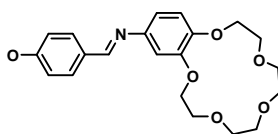
(62)



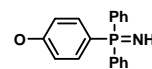
(65)



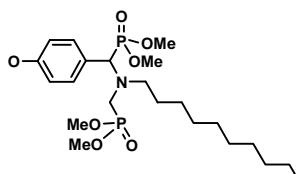
(66)



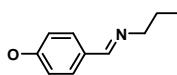
(50, 53, 67)



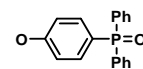
(65)



(66)

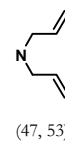
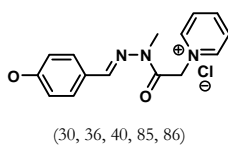
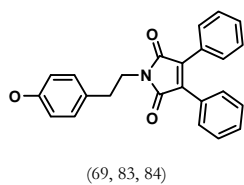
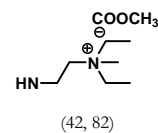
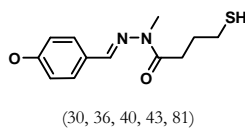
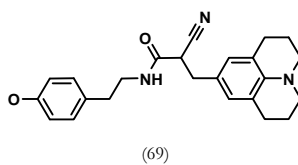
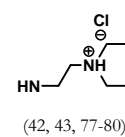
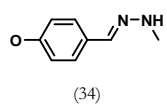
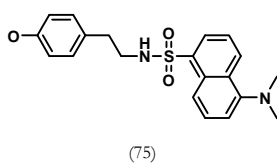
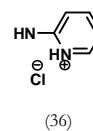
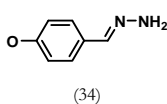
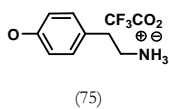
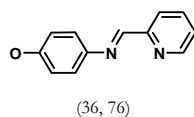
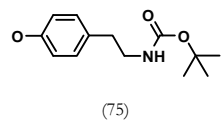
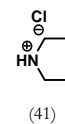
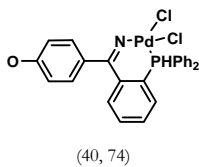
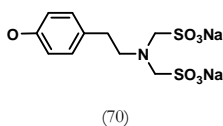
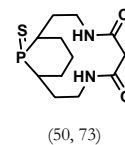
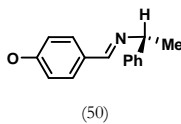
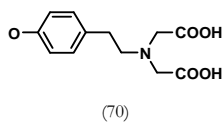
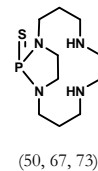
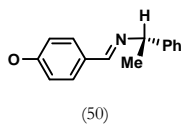
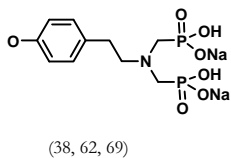
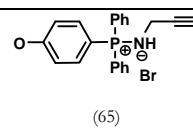
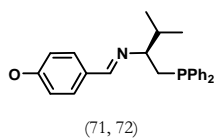
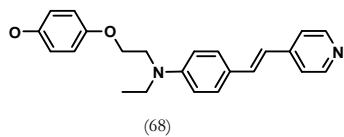


(50)

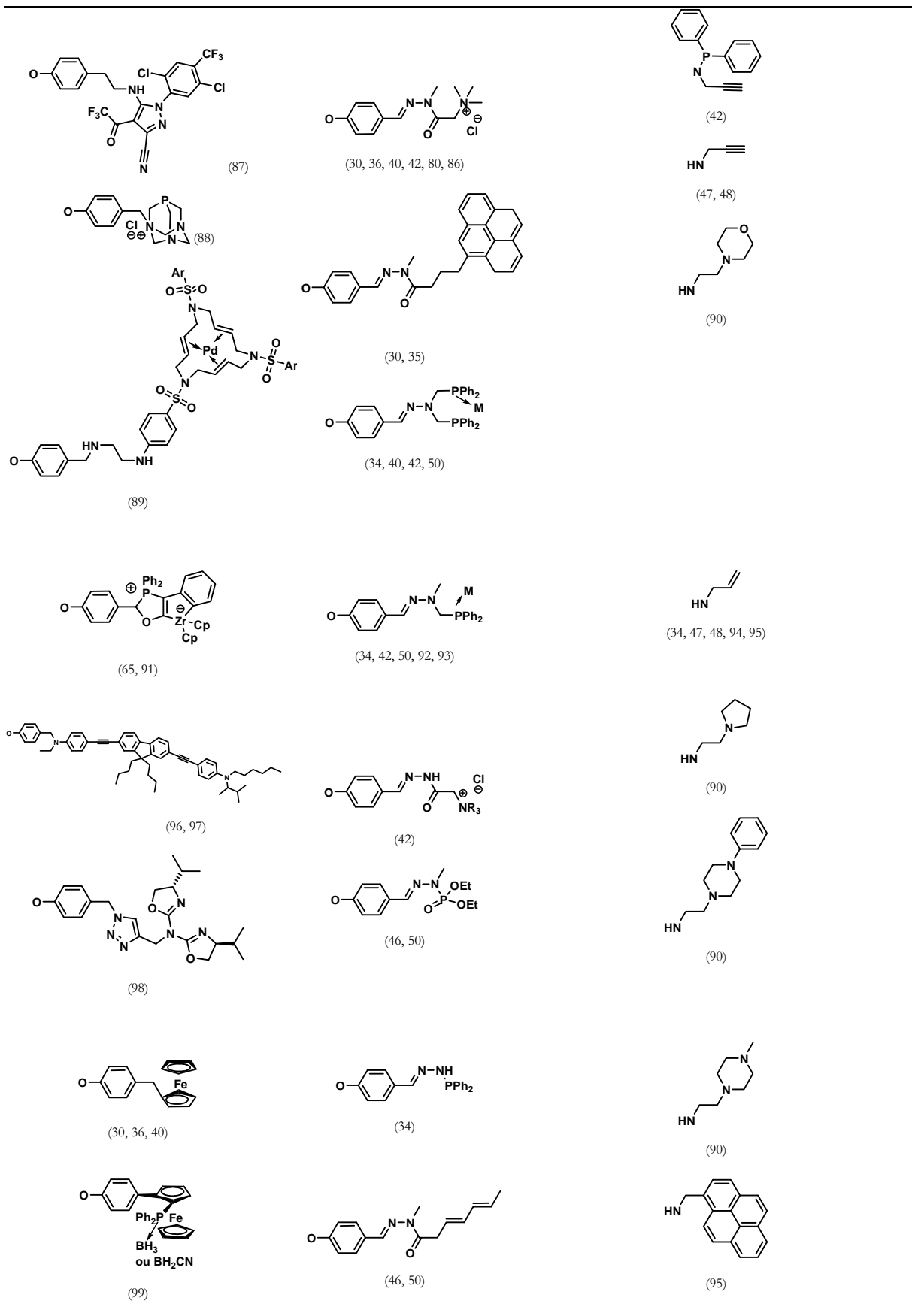


(65)

R



R



R

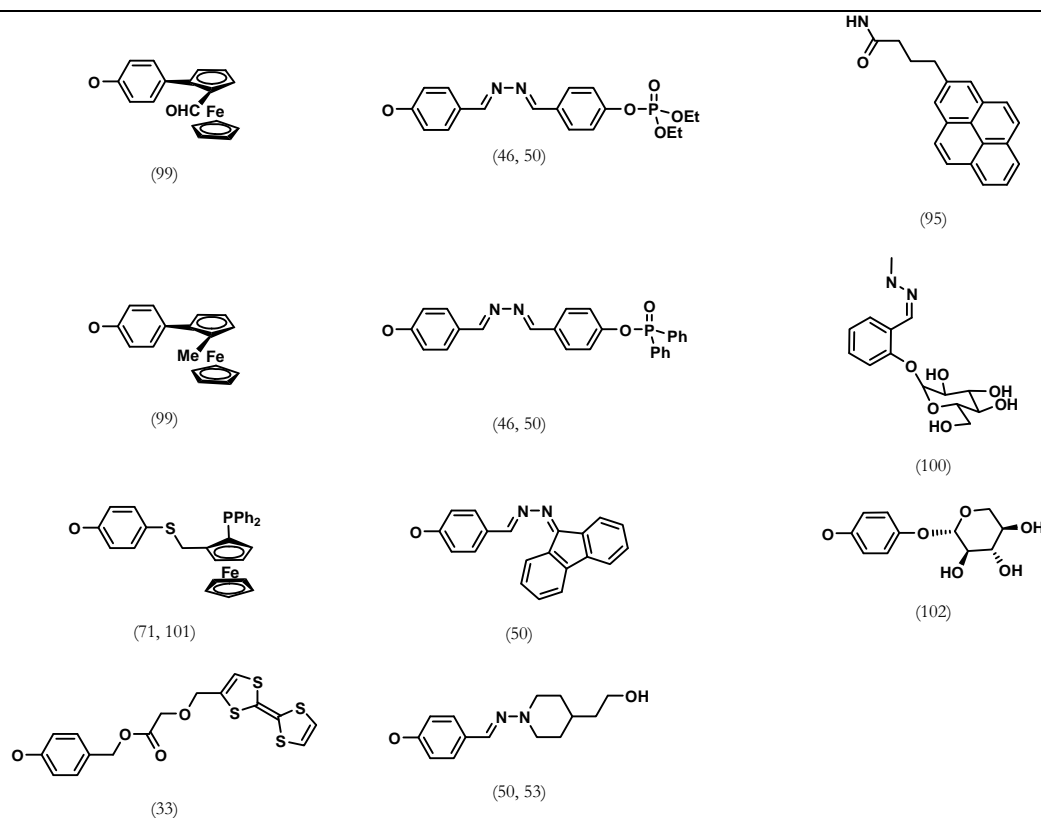


Tableau II.3 Groupements chimiques qui sont employés pour fonctionnaliser la surface des dendrimères PPH

II.4.3 Formation des amphiphiles catanioniques

Un tensioactif catanionique est un mélange équimolaire de deux tensioactifs de charge opposée dont les contre-ions inorganiques ont été éliminés.⁽¹⁰³⁾ Ce rapport équimolaire entre les deux tensioactifs conduit généralement à la précipitation de la paire d'ions.⁽¹⁰⁴⁾ Cependant, l'utilisation d'un tensioactif dérivé de sucre rend le composé catanionique soluble dans l'eau car cela augmente l'hydrophilie de la paire d'ions. Le premier exemple de tensioactif catanionique dérivé de sucre soluble dans l'eau à la stœchiométrie est obtenu par Menger en 1997.⁽¹⁰⁵⁾

D'autre part, la préparation des tensioactifs catanioniques est différente de celle des mélanges catanioniques, dans lesquels les sels inorganiques n'ont pas été éliminés. La présence de sels résiduels peut affecter les propriétés biologiques du produit ainsi que les propriétés d'agrégation.

Dans ce contexte, Jokela *et al.* ont décrit quatre méthodes de préparation de tensioactifs catanioniques sans sels résiduels :^(103, 106)

(1) Méthode par extraction.⁽¹⁰³⁾ Des quantités équimolaires de chaque tensioactif sont dissoutes séparément dans l'eau puis les deux solutions sont mélangées. Le tensioactif catanionique formé

dans la phase aqueuse est extrait par addition d'un solvant organique. La phase organique est séparée et évaporée pour obtenir le tensioactif sous la forme d'un solide.

(2) Méthode par précipitation.⁽¹⁰³⁾ La précipitation de la paire d'ions peut avoir lieu par préparation d'une solution saturée de quantités équimolaires des deux tensioactifs. Le précipité est filtré, lavé et séché pour obtenir le tensioactif catanionique sous forme d'un solide.

Une autre technique de précipitation consiste en l'emploi d'un sel d'argent.⁽¹⁰³⁾ Le tensioactif anionique qui a un contre-ion sodium, potassium ou lithium est d'abord précipité en solution aqueuse par formation du sel d'argent du tensioactif. Ce dernier est isolé, purifié et dissous dans un mélange d'eau et de solvant organique qui sera titrée par la solution du tensioactif cationique associé à un contre-ion halogénure. De cette façon, la précipitation de l'halogénure d'argent permet sa séparation du tensioactif catanionique ainsi formé qui sera purifié par recristallisation.

(3) Méthode d'échange d'ions.⁽¹⁰³⁾ Le tensioactif anionique est transformé en sa forme acide et le tensioactif cationique en sa forme hydroxyde par l'éluion de ces composés sur une colonne échangeuse d'ions contenant la résine appropriée. Le tensioactif catanionique est obtenu par la titration des solutions du tensioactif hydroxyle et du tensioactif acide et suivie de la lyophilisation ou de l'évaporation de la solution.

(4) Méthode d'échange de proton. Ces méthodes fastidieuses ont été complétées par une nouvelle méthode mise au point pour la première fois au laboratoire lors de la synthèse d'analogues catanioniques du GalCer par Blanzat *et al.*^(5, 6) Ainsi, la réaction acido-basique entre un acide gras et un aminolactitol en quantités équimoléculaires à température ambiante dans l'eau conduit à la formation de l'analogue catanionique sans formation de sels résiduels. Cette méthode a permis la synthèse des analogues du GalCer en remplaçant la liaison amide covalente par une liaison acide-amine ionique. De cette façon, on obtient ces analogues catanioniques en deux étapes à partir du lactose non protégé avec des rendements élevés (96% pour les deux étapes où l'étape finale est quantitative) et sans purification. La formation des agrégats dans le milieu réactionnel permet le déplacement de l'équilibre vers la formation quantitative de la paire d'ions. Ainsi, plusieurs familles d'analogues catanioniques du GalCer solubles dans l'eau ont été synthétisées par réaction entre des N-alkylamino-1-déoxylactitols et des acides gras, des diacides ou des dendrimères à terminaisons acide (Figure II.6).^(5, 6, 8, 9)

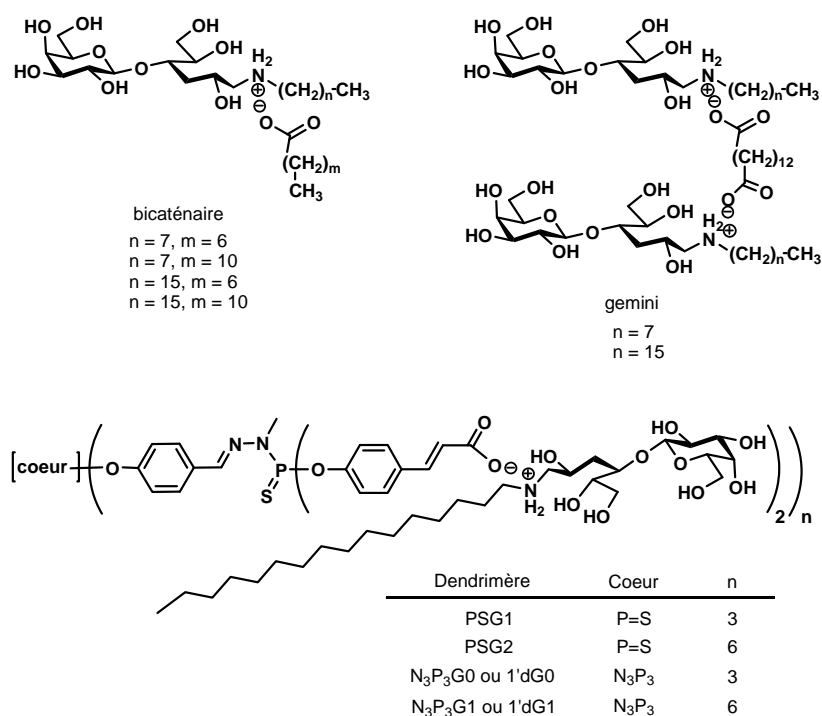


Figure II.6 Structure des analogues cationiques du GalCer : des composés bicaténaires, des composés gemini et des dendrimères

II.5 Stratégie générale pour la synthèse des dendrimères

PPH

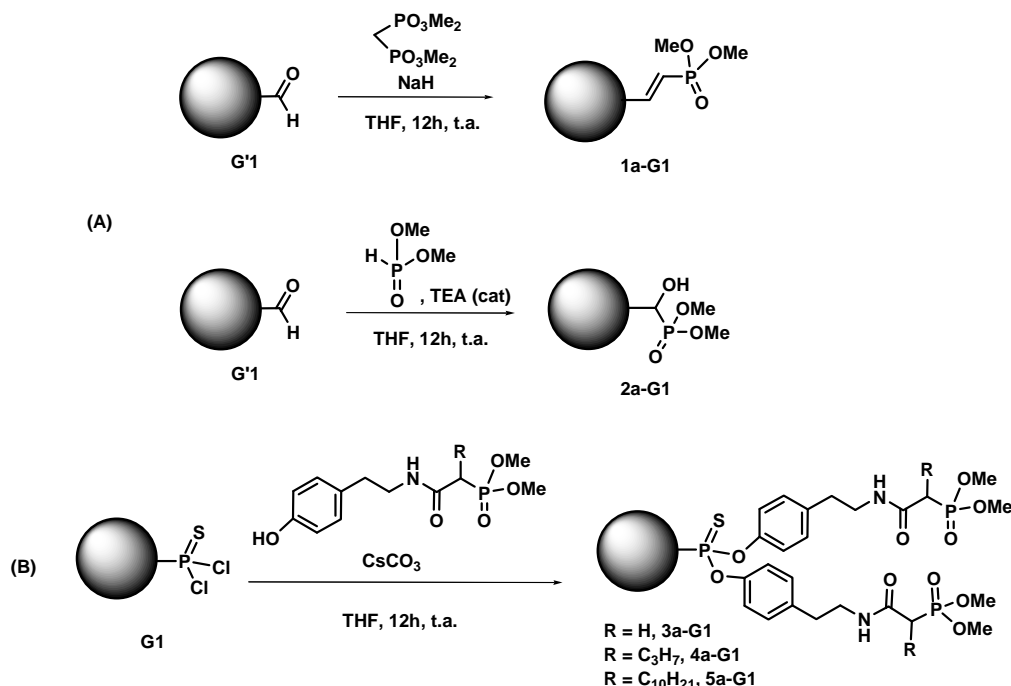
Dans le cadre de notre travail, deux stratégies sont employées : l'addition nucléophile sur la fonction aldéhyde du dendrimère PPH G'1 et la substitution nucléophile des atomes de chlore sur la surface du dendrimère PPH G1 (Schéma II.2).

Certaines de ces méthodes ont déjà été décrites.^(46, 62) Dans la mesure où elles ont toutes fait l'objet d'optimisations au cours de cette thèse, elles sont détaillées ci-dessous.

II.5.1. Greffage de fonction phosphonate en surface

La synthèse des dendrimères à terminaisons vinylphosphonate **1x-G1** et des dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate **2x-G1** implique la transformation de la fonction aldéhyde du dendrimère **G'1** en la fonction vinyldiméthylphosphonate par une réaction de type Horner-Wadsworth-Emmons et en la fonction α -hydroxydiméthylphosphonate par une réaction de type Abramov-Pudovik (Schéma II.2 A). Par contre, la synthèse des nouvelles structures dendritiques

phosphorées **3x-G1**, **4x-G1** et **5x-G1** a lieu par greffage de nouveaux phénols qui confèrent les propriétés désirées à la surface du dendrimère **G1** (Schéma II.2 B).



*Schéma II.2 Stratégies employées pour fonctionnaliser la surface des dendrimères PPH : (A) addition nucléophile sur la fonction aldéhyde de **G'1** et (B) greffage du phénol par substitution nucléophile*

II.5.2 Transformation des alkyl-phosphonate en acides phosphoniques correspondants

Cette transformation est obtenue par une procédure de silylation/méthanolyse,⁽³⁸⁾ en utilisant 2,5 à 3 équivalents de bromotriméthylsilane (très oxophile) par phosphonate⁽⁶⁶⁾ dans une solution diluée (1-10 mmol/L) d'esters de phosphonate dans un solvant polaire et dissociant comme l'acétonitrile. La solution est agitée durant 12 heures à température ambiante. Le fait d'augmenter la température pour diminuer les temps de réaction amène à la dégradation partielle de la structure dendritique. La réaction peut aussi avoir lieu dans le dichlorométhane ou dans un mélange dichlorométhane/acétonitrile, selon la solubilité du dendrimère diméthylphosphonate. Le mécanisme de réaction consiste en l'addition électrophile du bromotriméthylsilane à la liaison P=O en libérant un ion bromure qui réagit postérieurement avec un des groupes alkyle protecteurs pour former un alkylbromure (Schéma II.3). Cette séquence est répétée une autre fois pour former les fonctions di(triméthylsilyl)phosphonate. Ensuite, ces dernières sont transformées facilement en acides phosphoniques par méthanolyse.

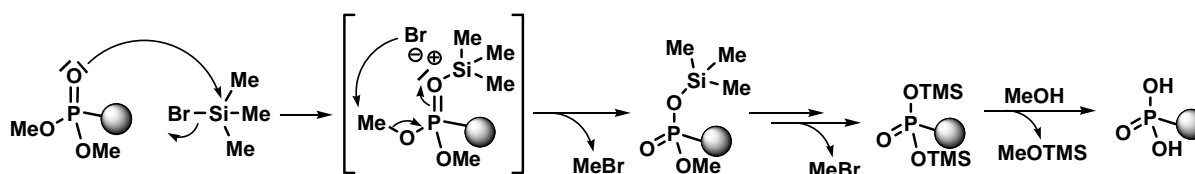


Schéma II.3 Mécanisme de silylation du dialkylephosphonate et de méthanolyse postérieure

Les produits secondaires, le bromure de méthyle et le méthoxytriméthylsilane sont éliminés facilement car les points d'ébullition sont respectivement de 4°C et de 57°C. Le dendrimère est ensuite précipité et lavé au méthanol.

Les acides phosphoniques présentent un caractère très polaire. Ils possèdent aussi un caractère amphotère et deux groupements ionisables avec des acidités relatives dont les valeurs de pKa sont généralement comprises entre 7-8 ($\text{RHPO}_3^-/\text{RPO}_3^{2-}$) et 2-3 ($\text{RH}_2\text{PO}_3/\text{RHPO}_3^-$).

Ainsi, les dendrimères à terminaisons acide phosphonique sont transformés en monosels de sodium **1c-G1** à **5c-G1** par addition de quantités stœchiométriques d'hydroxyde de sodium dans des suspensions des dendrimères à terminaisons acides dans l'eau à 0°C (Schéma II.4).

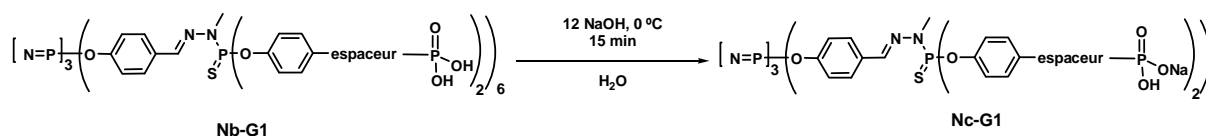


Schéma II.4 Formation des sels de sodium des dendrimères à terminaisons acide phosphonique

Pour vérifier la formation du phosphonate et pour confirmer la structure de ces nouveaux dendrimères **Nc-G1** ($\text{N} = 1$ à 5), ils sont analysés par RMN du phosphore 31 (Tableau II.4, paragraphe II.7).

II.5.3 Formation des dendrimères catanioniques

Pour la préparation des dendrimères catanioniques, nous avons utilisé le N-hexadécylamino-1-déoxylactitol préparé par C. Bololoi.⁽¹⁰⁷⁾ Le protocole initial a été décrit par R. Garelli-Calvet *et al.*⁽¹⁰⁸⁾ et postérieurement amélioré par Blanzat *et al.*⁽⁵⁾ Cette stratégie sera aussi employée pour la préparation de l'aminolactitol fluorescent utilisé dans le Chapitre IV.

Puis les dendrimères catanioniques sont préparés par la méthode d'échange du proton décrit dans la mise au point bibliographique de ce Chapitre.

II.6 Résultats

II.6.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate 1x-G1

Le dendrimère **1d-G1** est un analogue strict du composé **1'd-G1** (Figure II.1).⁽⁹⁾ Il permet d'étudier les effets induits par la fonction acide phosphonique qui est un acide plus fort que les acides carboxylique dans la stabilité de l'assemblage catanionique et dans l'inhibition de la reconnaissance cellulaire.

II.6.1.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate 1a-G1

L'obtention des fonctions vinylphosphonate à partir de dendrimères PPH à surface aldéhyde **G'N** a déjà été décrite dans le groupe^(109, 110) et met en jeu la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons.^(111, 112) Initialement, cette synthèse a été mise au point par D. Prévoté⁽¹⁰⁹⁾ en utilisant du tétraéthyl-méthylène-*gem*-diphosphonate (Schéma II.5). Mais les rendements sont modestes (30-40%) à cause des pertes de produits lors de l'isolement et/ou de l'élimination des réactifs ou des sels résiduels par lavages et précipitations.

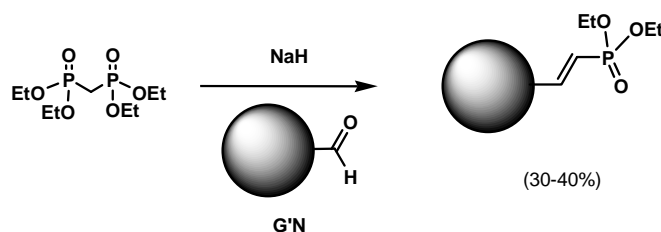


Schéma II.5 Préparation de dendrimères PPH à terminaisons vinylphosphonate par la réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons

D'autre part, le clivage des groupements éthoxy nécessite habituellement l'utilisation d'acide chlorhydrique 4 à 6M en solution dans l'eau. Malheureusement, ces conditions conduisent à la dégradation des dendrimères PPH. Pour cette raison, L. Griffe⁽¹¹³⁾ a mené une nouvelle stratégie qui consiste en l'utilisation du tétraméthyl-méthylène-*gem*-diphosphonate pour la fonctionnalisation de dendrimères PPH à cœur N_3P_3 de différentes générations puis le clivage des fonctions diméthylphosphonate par utilisation du BrTMS. Les rendements de la première étape sont supérieurs à ceux obtenus par D. Prévoté (63% pour la première génération à terminaisons vinyl diméthylphosphonate). Il faut noter que ces dendrimères à terminaisons

vinyl-diméthylphosphonate sont très solubles dans les solvants organiques, ce qui entraîne une perte de produit au cours des lavages par précipitation. Puis la déprotection des fonctions phosphonate avait conduit au clivage incomplet ou à la dégradation selon le nombre d'équivalents de BrTMS employés. Cela est probablement causé par la présence de traces d'impuretés qui accompagnent le dendrimère à terminaisons vinyl-diméthylphosphonate. Ainsi, nous avons amélioré cette étape en modifiant la technique de purification de ce dendrimère.

La première étape consiste donc en une réaction Horner-Wadsworth-Emmons entre les fonctions aldéhyde terminales du dendrimère **G1** et le tétraméthyl-méthylène-*gem*-diphosphonate en utilisant l'hydrure de sodium comme base (Schéma II.6). La réaction évolue proprement à température ambiante durant une nuit.

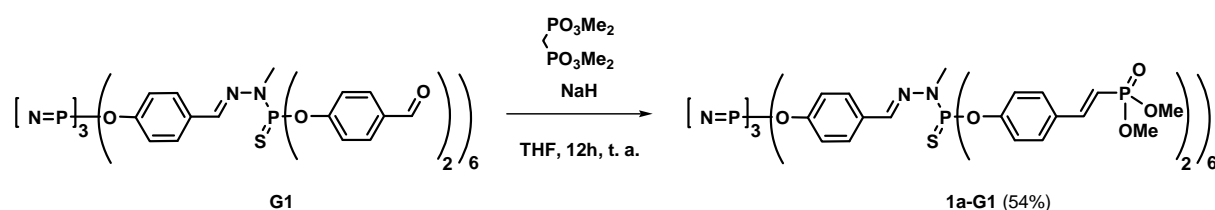


Schéma II.6 Synthèse du dendrimère à terminaisons vinyl-diméthylphosphonate **1a-G1**

La fin de la réaction est vérifiée en RMN du proton par la disparition totale des signaux correspondant aux fonctions aldéhyde du dendrimère **G1** (δ (^1H) = 9,97 ppm, δ (^{13}C) = 189,9 ppm) et par l'apparition de deux doublets dans le spectre de RMN du proton à 6,10 ppm et à 7,35 ppm ($^3J_{\text{HHtrans}} = 17,4$ Hz), correspondant respectivement aux protons $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ et CH-P du groupe vinyle. Le diméthylphosphonate de sodium est le seul produit secondaire, il est éliminé par chromatographie sur gel de silice. Le rendement légèrement inférieur à celui obtenu par L. Griffé peut être expliqué par la rétention du dendrimère vinylphosphonate **1a-G1** qui est très polaire sur le gel de silice.

II.6.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique **1b-G1**

La déprotection du groupe ester en utilisant la méthode de silylation/méthanolyse décrite précédemment est contrôlée par spectroscopie de RMN du phosphore 31. Le singulet localisé à 21,9 ppm attribué aux groupes PO_3Me_2 de **1a-G1** est remplacé par un autre singulet à 13,6 ppm correspondant aux groupes PO_3H_2 de **1b-G1** (Schéma II.7)⁽¹¹³⁾ en fin de procédure. Le taux de conversion est de 100%, mais la purification sur gel de silice conduit à une baisse très significative des rendements.

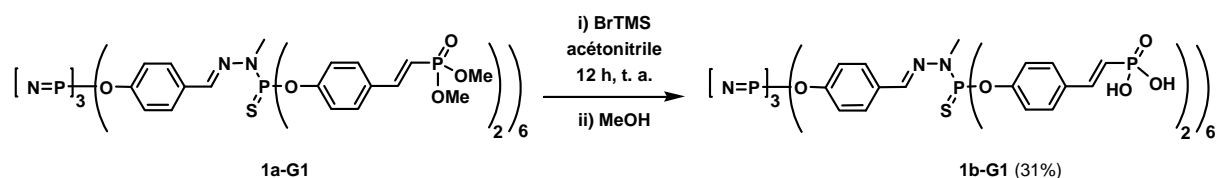


Schéma II.7 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique **1b-G1**

II.6.1.3 Synthèse du dendrimère chargé **1c-G1** et de son analogue catanionique **1d-G1**

Le sel de monosodium **1c-G1** et l'assemblage catanionique **1d-G1** sont facilement obtenus par la procédure habituelle (Schéma II.8).

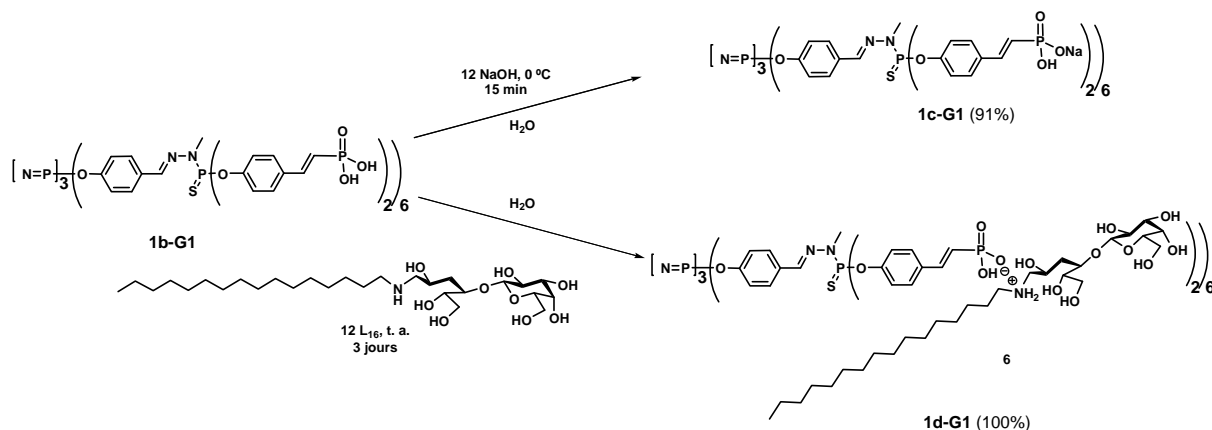


Schéma II.8 Synthèse du sel de sodium **1c-G1** et son analogue catanionique **1d-G1**

Les déplacements chimiques observés dans le spectre de RMN du phosphore 31, en particulier pour les atomes de phosphore des groupes phosphonate qui résonnent respectivement à 12,5 et à 11,0 ppm, sont cohérents avec les structures attendues. De plus, les analyses des spectres de RMN du proton et du carbone 13 confirment ces structures. On notera en particulier que les composés **Nc-G1** et **Nd-G1** ($N = 1$ à 5) présentent dans les spectres de RMN du proton dans l'eau deutérée, des signaux larges qui rendent difficile l'interprétation des spectres. En effet, les dérivés catanioniques à caractère tensioactif s'auto-associent dans le solvant deutéré pour former des systèmes organisés (micelles, vésicules, etc.), ce qui altère fortement la qualité des signaux. De façon similaire, les dendrimères poly-anioniques amphiphiles ont un intérieur lipophile qu'il est peu solvato dans l'eau. En conséquence, il relaxe mal et les signaux de RMN de cette zone sont mal résolus et larges. Cependant, l'utilisation de mélanges de solvants deutérés permet de solubiliser complètement les produits, tout en évitant la formation d'agrégats supramoléculaires et en améliorant la solvation de la structure dendritique, ce qui se traduit par une meilleure résolution des signaux. Ainsi, on utilise

le mélange $D_2O:nCD_3CDODC_3D$ (3:1, v:v) ou $D_2O:CD_3CN$ (3:1, v:v) pour les tensioactifs catanioniques dendritiques et le mélange $D_2O:CD_3CN$ (3:1, v:v) pour les sels de sodium.

II.6.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate **2x-G1**

La série de dendrimères **2x-G1** ($x = a - d$) comportant des fonctions α -hydroxyphosphonate est préparée pour étudier l'influence de l'hydrophilie à proximité de la paire d'ions et sur leur interaction avec la boucle V3.

Une des principales méthodes pour la synthèse de composés α -hydroxyphosphonate est la réaction d'Abramov-Pudovik^(38, 114) qui met en jeu l'addition nucléophile d'un phosphore (III) activé sur une fonction aldéhyde dans un milieu basique (Schéma II.9). Dans notre cas, on utilise la triéthylamine comme base en quantités catalytiques.

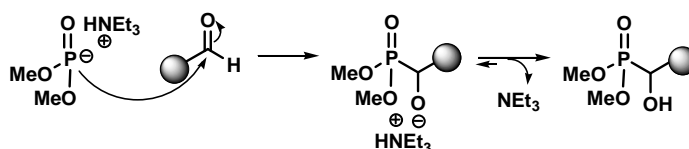
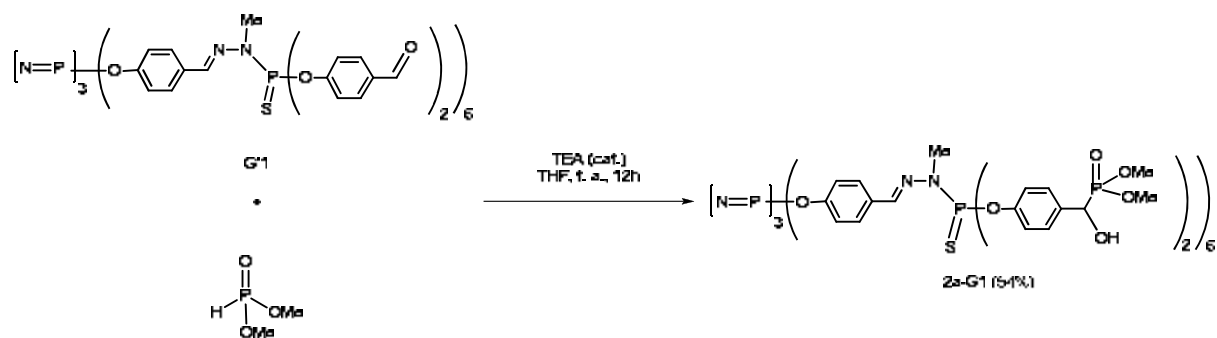


Schéma II.9 Mécanisme de la réaction d'Abramov-Pudovik

II.6.2.1 Synthèse du dendrimère à terminaisons diméthylphosphonate **2a-G1**

Cette réaction d'addition a été utilisée pour la première fois au laboratoire avec du phosphite de diéthyle sur des dendrimères de différentes générations, à cœur thiophosphate, ayant une surface des fonctions aldéhyde.⁽¹¹⁵⁾ Les rendements de cette méthode restent modestes (18-22%). De nouveau, les faibles rendements s'expliquent par la perte de produit dans l'étape de lavage/précipitation. Cette stratégie synthétique a été améliorée par L. Griffe⁽¹¹³⁾ en utilisant du phosphite de diméthyle dans l'étape d'addition sur des dendrimères à cœur N_3P_3 et à terminaisons aldéhyde (rendements 72%) et suivi par le clivage avec le bromotriméthylsilane (51%). Cette voie de synthèse a ensuite été mise à profit par G. Spataro⁽¹¹⁶⁾ pour obtenir les analogues catanioniques que nous avons re préparés dans le cadre de cette thèse. La synthèse est brièvement rappelée ci-dessous.

Le dendrimère **G1** réagit avec le diméthylphosphite en présence d'une quantité catalytique de triéthylamine pour obtenir le dendrimère **2a-G1** (Schéma II.10) avec un rendement de 54%.

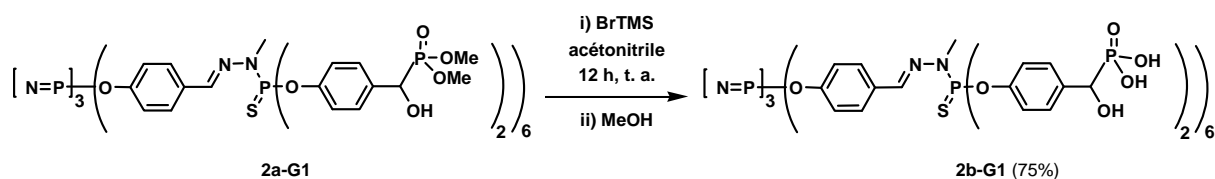
Schéma II.10 Synthèse du dendrimère **2a-G1**

La fin de la réaction est observée par spectroscopie de RMN du proton par la disparition des signaux correspondant aux fonctions aldéhyde en faveur des nouveaux multiplets à 4,85 ppm correspondant à *CH*. Le spectre de RMN du phosphore 31 montre un singulet à 8,9 ppm qui correspond aux atomes de phosphore du cœur, un singulet à 62,4 ppm appartenant aux atomes de phosphore des points de divergence et finalement deux singulets à 23,9 ppm qui correspondent aux atomes de phosphore non-équivalents des groupes phosphonate à la périphérie du dendrimère à cause de la création d'un centre stéréogénique sur la position α .

Nous avons introduit une étape de purification par chromatographie sur gel de silice afin d'éviter la présence d'impuretés qui limitent l'étape de clivage avec le BrTMS. Cette étape de purification conduit aussi à une baisse sensible des rendements.

II.6.2.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique **2b-G1**

La déprotection du dendrimère α -hydroxydiméthylphosphonate est obtenue par la méthode de silylation/méthanolyse habituelle (Schéma II.11). Le dendrimère à terminaisons acide phosphonique résultant **2b-G1** (rendement 75%) est caractérisé par deux singulets à 19,9 ppm (atomes de phosphore des groupes phosphonique à la périphérie) par spectroscopie de RMN du phosphore 31 car ces atomes de phosphore sont non-équivalents à cause de la présence d'un centre stéréogénique sur la position α .

Schéma II.11 Déprotection des fonctions phosphonate pour obtenir **2b-G1**

II.6.2.3 Synthèse du dendrimère sel de sodium **2c-G1** et son analogue catanionique **2d-G1**

Le sel de sodium de **2c-G1** et le dendrimère catanionique **2d-G1** sont respectivement obtenus par réaction acide-base en quantités stœchiométriques entre les terminaisons du dendrimère **2b-G1** et l'hydroxyde de sodium ou le N-hexadécylaminolactitol (Schéma II.12) avec un rendement quantitatif dans le dernier cas. Le spectre de RMN du phosphore de ces composés indique la formation des paires d'ions par un blindage d'environ 6 ppm des signaux du phosphore à la périphérie (Tableau II.4).

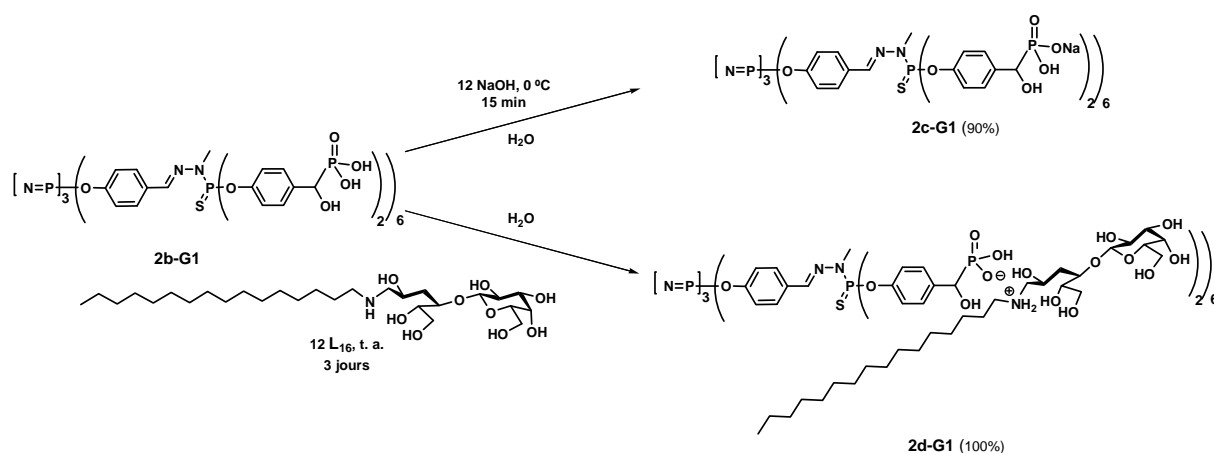


Schéma II.12 Synthèse du sel de sodium **2c-G1** et son analogue catanionique **2d-G1**

II.6.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate **3x-G1**, **4x-G1** et **5x-G1**

Ces trois séries de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate permettent de comparer les effets induits par la présence ou l'absence de la chaîne alkyle et d'étudier l'influence de l'hydrophobie dans la stabilisation de la paire d'ions et le caractère lipophile de l'ensemble sur l'inhibition de la reconnaissance cellulaire par le VIH.

La synthèse originale de cette série de dendrimères a été développée par G. Spataro⁽¹¹⁶⁾ et C. Bololoi,⁽¹⁰⁷⁾ elle est rapidement décrite ci-dessous.

II.6.3.1 Généralités

La synthèse de ces séries de dendrimères commence par la conception des phénols α -alkylphosphonate (Figure II.7) qui peuvent être greffés facilement sur les terminaisons

dichlorothiophosphorhydrazone à la surface du dendrimère **G1** par des substitutions nucléophiles.⁽¹¹⁷⁾ Ces phénols comportant des chaînes alkyle en position α du groupe phosphonate peuvent être transformés en acides phosphoniques après leur greffage à la surface du dendrimère.⁽⁶²⁾

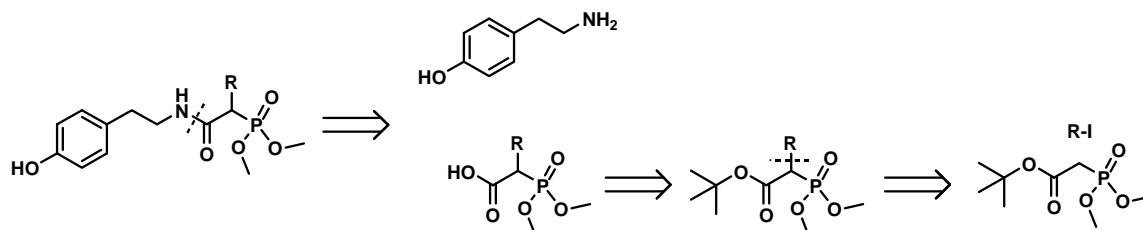


Figure II.7 Analyse rétrosynthétique des phénols α -alkylephosphonate

II.6.3.2 Synthèse de phénols : Série α -alkylphosphonate 3a, 4a et 5a

Les précurseurs acides carboxyliques avec différentes chaînes alkyle **7** et **8** (Figure II.8) sont obtenus par alkylation de la position α du P,P-diméthylphosphonoacetate de *tert*-butyle (commercial) en milieu basique par l'iodoalcane correspondant.

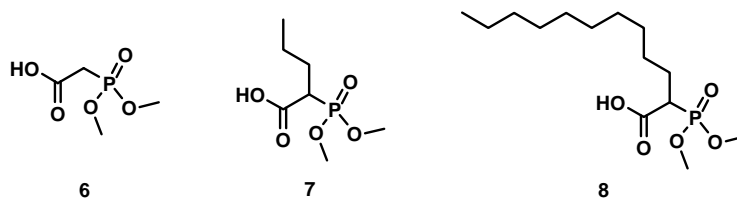


Figure II.8 Structure des acides carboxyliques précurseurs des phénols α -alkylephosphonate

Les énolates des méthylènes activés sont facilement préparés en utilisant une base comme l'hydrure de sodium. Les énolates sont de très bons nucléophiles et réagissent avec des halogénures d'alkyle par une réaction de type S_N2 de façon non stéréosélective. Cette réaction permet l'introduction des groupes alkyle dans des positions α .⁽¹¹⁸⁾ La présence de l'éther couronne 15C5 en quantités catalytiques favorise la réaction d'alkylation car il solvate de façon spécifique le cation Na^+ en permettant l'attaque nucléophile de l'énolate à l'halogénure d'alkyle (Schéma II.13, A). La déprotection des esters *tert*-butyle, diméthylphosphonoacétate de *tert*-butyle, **9** et **10** en utilisant l'acide trifluoroacétique conduit à l'obtention des acides carboxyliques **6**, **7** et **8** respectivement et de l'isobutène (Schéma II.13, B).

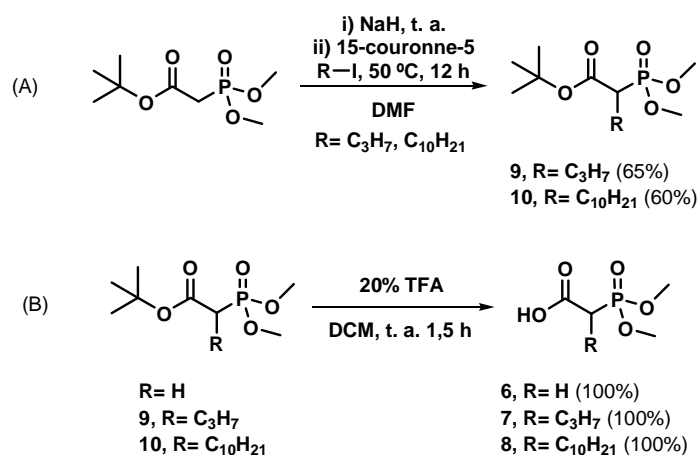


Schéma II.13 (A) Alkylation en position α d'un phosphonoacétate. (B) Déprotection de l'ester de tert-butyle en utilisant l'acide trifluoroacétique

Les phénols α -alkylphosphonate (Figure II.7) sont obtenus à partir de la tyramine. Cette dernière présente deux fonctions : le phénol qui sera greffé sur le dendrimère **G1** et la fonction amine qui portera les fonctions phosphonate.

La tyramine est couplée aux acides carboxyliques à longue chaîne portant en α une fonction phosphonate par le système DCC/HOBt (Schéma II.14).^(119, 120) Le phénol de la tyramine n'a pas besoin de protection au cours de la réaction du couplage peptidique.

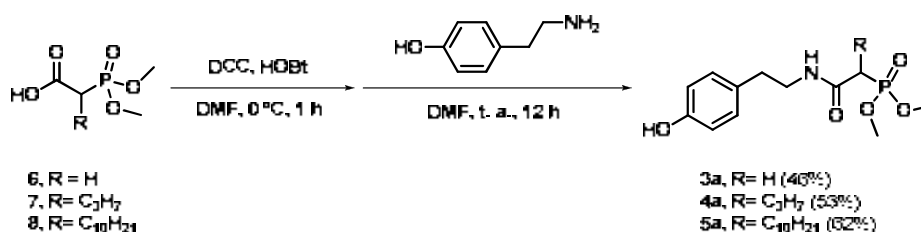


Schéma II.14 Synthèse des phénols par couplage peptidique

Afin de rendre plus facile l'étape de purification, d'autres agents de couplage ont été testés (N-hydroxysuccinimidyle/DCC et DIPEA/TBTU). Mais ces systèmes d'activation ont mené à des mélanges complexes et difficiles à purifier.

Le phénol sans chaîne alkyle latérale **3a** est obtenu par couplage de la tyramine avec l'acide P,P-diméthylphosphoacétique déprotégé en présence de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et N-hydroxybenzotriazole (HOBt) (Schéma II.14). Le composé **3a** est obtenu avec un rendement modéré (46%) après purification par chromatographie sur gel de silice. Un doublet typique à 2,84 ppm ($^2J_{\text{PH}} = 21$ Hz) caractérise le groupe méthylène activé, et l'atome de phosphore du groupe phosphonate résonne sous forme d'un singulet à 25,6 ppm. L'acide carboxylique intermédiaire **6** est

obtenu par la déprotection du P,P-diméthylphosphonoacetate de *tert*-butyle (commercial) en utilisant l'acide trifluoroacétique (Schéma II.13, B). La déprotection totale est vérifiée par spectroscopie de RMN du proton : la disparition du signal correspondant au groupe *tert*-butyle indique la fin de la réaction. De plus, l'absence d'autres signaux dans le spectre de RMN du phosphore 31 indique que la transformation en acide carboxylique n'endommage pas les fonctions diester de l'acide phosphonique.

Les phénols **4a** et **5a** sont obtenus avec des rendements modérés en 3 étapes (respectivement, 34% et 36%). La première étape consiste à greffer les chaînes alkyle sur le *tert*-butylphosphonoacetate de diméthyle par déprotonation du groupe méthylène activé avec l'hydrure de sodium. Puis le carbanion résultant réagit avec le 1-iodopropane et le 1-iododécane pour obtenir respectivement **9** et **10** (Schéma II.13, A).⁽¹²¹⁾ Dans la deuxième étape, l'élimination du groupement *tert*-butyl ester a lieu par l'action de l'acide trifluoroacétique. Finalement, les phénols **4a** et **5a** sont obtenus par l'acylation de la tyramine avec la procédure d'activation DCC/HOBt (Schéma II.14). Ce processus a lieu sans contrôle de la stéréochimie. Les composés **4a** et **5a** sont donc obtenus comme espèces racémiques. En effet, les groupes méthoxy du phosphonate sont différenciés. Ils présentent deux doublets localisés vers 3,7 ppm ($^3J_{HP} = 10$ Hz) dans le spectre de RMN du proton et deux doublets détectés vers 53 ppm ($^2J_{PC} = 7$ Hz) dans le spectre de RMN du carbone 13. Ainsi, l'influence de la chaîne alkyle est observée dans le spectre de RMN du phosphore 31 des composés **4a** et **5a**. Les déplacements chimiques de l'atome de phosphore des groupes phosphonate de **4a** et **5a** sont plus blindés et se déplacent à haut champ (environ 2,5 ppm par rapport au déplacement chimique du groupe phosphonate du composé **3a**).

II.6.3.3 Synthèse des dendrimères à terminaisons diméthylphosphonate 3a-G1, 4a-G1 et 5a-G1

Les dendrimères à extrémités phosphonate **3a-G1**, **4a-G1** et **5a-G1** sont obtenus par substitution nucléophile des 12 atomes de chlore de la surface du dendrimère **G1** en présence des phénols correspondants et du carbonate de césium qui est utilisé comme base (Schéma II.15). Nous n'avons pas trouvé d'influence de la longueur de la chaîne au cours de la réaction. De nouveau, les réactions sont contrôlées par RMN du phosphore 31 directement à partir des mélanges de réaction. Ainsi, dans le cas de **4a-G1**, un singulet à 68,4 ppm est rapidement observé, en indiquant la formation des espèces intermédiaires P(S)(OAr)Cl à la surface des dendrimères. Cela est accompagné de la disparition progressive du singulet à 62,3 ppm correspondant aux terminaisons initiales P(S)Cl₂. Puis, la disparition totale des espèces intermédiaires à 68,4 ppm et l'apparition d'un nouveau singulet

à 62,8 ppm pour les fonctions terminales $P(S)(OAr)_2$ dans le spectre de RMN du phosphore 31 indiquent la fin de la réaction après une nuit à température ambiante. Au cours de la réaction le cœur cyclotriphosphazène et les fonctions terminales phosphonate des dendrimères ne sont pas affectées. En effet, les phosphores de ces groupements résonnent à 8,4 ppm et 28,2 ppm respectivement dans le spectre de RMN du phosphore 31.

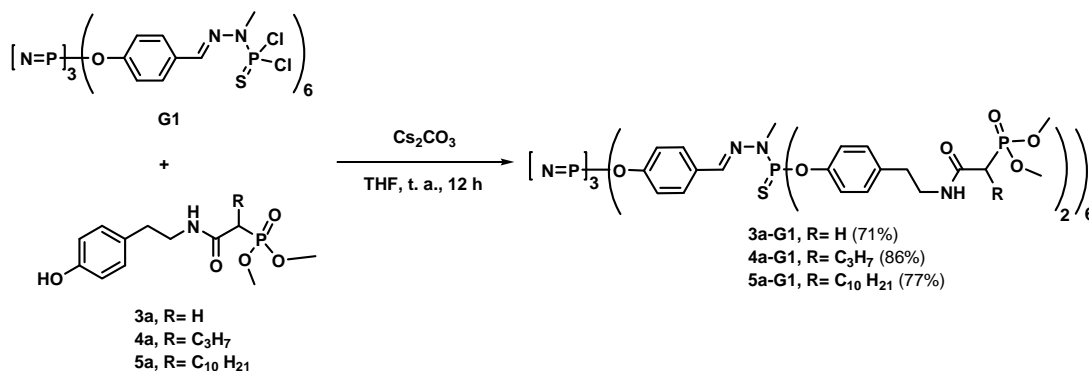


Schéma II.15 Synthèse des dendrimères α-alkylphosphonate 3a-G1, 4a-G1 et 5a-G1

La différence de solubilité entre les dendrimères PPH et les réactifs de départ permet généralement de les séparer par un simple lavage avec un mélange de solvants adéquat où les dendrimères sont à peine solubles et les impuretés ou l'excès de réactifs sont bien solubles. Dans ce cas, les phénols phosphonate **3a**, **4a** et **5a** ne présentent pas de différences de solubilité par rapport aux dendrimères **3a-G1**, **4a-G1** et **5a-G1**. Ils sont donc purifiés par chromatographie sur gel de silice. Ces composés sont complètement caractérisés par RMN du phosphore 31, du proton et du carbone 13 et des expériences en 2D.

II.6.3.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique **3b-G1**, **4b-G1** et **5b-G1**

Les dendrimères à terminaisons acide phosphonique **3b-G1**, **4b-G1** et **5b-G1** sont obtenus à partir des dendrimères à terminaisons phosphonate **3a-G1**, **4a-G1** et **5a-G1** par la méthode de silylation/méthanolyse des groupes ester phosphonate (Schéma II.16).⁽⁶⁹⁾ Les composés résultants sont à peine solubles dans l'eau et légèrement solubles dans le diméthylsulfoxyde ou le méthanol. La RMN du phosphore 31 permet d'observer la transformation complète de la surface phosphonate par la disparition totale des singulets à 25,4, 28,2, et 28,1 ppm qui correspondent respectivement aux groupes phosphonates de **3a-G1**, **4a-G1** et **5a-G1**, et l'apparition des nouveaux singulets à 19,5, 23,2

et 22,4 ppm appartenant respectivement aux groupes acide phosphonique de **3b-G1**, **4b-G1** et **5b-G1**.

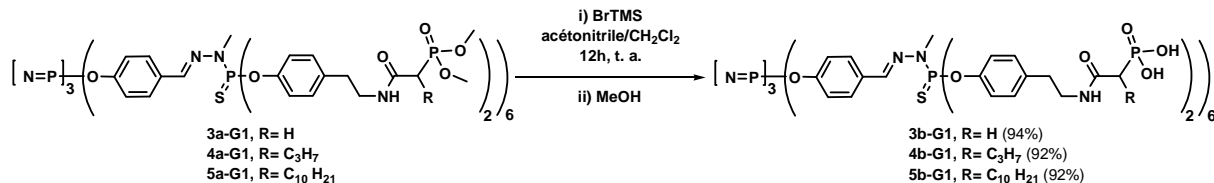


Schéma II.16 Synthèse de dendrimères à terminaisons acide phosphonique **3b-G1**, **4b-G1** et **5b-G1**

II.6.3.5 Synthèse des dendrimères sel de sodium, **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1**

Ces derniers sont transformés en leurs monosels de sodium **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1** par l'addition de quantités stœchiométriques d'hydroxyde de sodium dans l'eau, puis ils sont lyophilisés (Schéma II.17). L'analyse du spectre de RMN du phosphore 31 révèle que les déplacements chimiques des atomes de phosphore des groupes phosphonate sont modifiés vers les champs forts dans la région 13-17 ppm qui traduit la formation des nouvelles structures dendritiques **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1**. Comme nous l'avons déjà dit, le spectre de RMN du proton obtenu à partir de solutions diluées dans l'eau n'est pas bien résolu (bien qu'il permette de faire des expériences en 2D comme NOESY ¹H-¹H), à cause du manque de mobilité de l'intérieur du dendrimère, mais ce phénomène était plus prononcé dans le cas de **5c-G1** avec la chaîne alkyle à 10 atomes de carbone. L'addition d'un co-solvant (acétone ou acétonitrile) permet de caractériser complètement ces composés par spectroscopie de RMN.

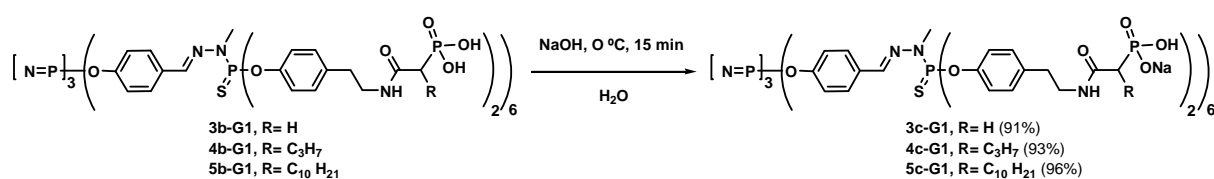


Schéma II.17 Synthèse des sels de sodium des dendrimères α -alkylphosphonate

II.6.3.6 Analyse structurale par spectroscopie de RMN 2D de **4c-G1** et **5c-G1**

Afin de connaître la localisation de la chaîne alkyle dans les dendrimères à terminaison α -alkylphosphonate **4c-G1** et **5c-G1** dans une solution aqueuse, des expériences de 2D NOESY ¹H-¹H ont été réalisées. Ces résultats permettront de rationaliser le mode d'action de ces composés dans le processus d'inhibition de reconnaissance par le VIH et le rôle de la chaîne alkyle.

Les interactions ioniques dans la reconnaissance cellulaire sont renforcées quand on utilise les composés dendritiques.^(16, 122) A ce jour, aucun des systèmes multivalents poly-ioniques anti-VIH synthétisés n'a tenu compte des interactions lipophile-lipophile qui peuvent contribuer à l'ancrage des inhibiteurs et donc à leur efficacité. L'interaction multivalente des dendrimères poly-anioniques avec la gp120 peut être modulée par des interactions lipophiles avec la partie lipophile de la boucle V3 localisée sur la gp120.⁽⁴⁾ Effectivement, nous avons vu que les analogues du GalCer, qui préviennent la reconnaissance entre la gp120 et le CD4, sont sensibles aux interactions lipophiles.⁽¹⁷⁾ En effet, la longue chaîne hydrophobe greffée sur ces analogues du GalCer joue un rôle clé dans les interactions avec la partie hydrophobe de la boucle V3 et dans l'amélioration de l'interaction dendrimère-virus.

Les expériences de 2D NOESY ^1H - ^1H sont réalisées avec un temps de mélange de 100 ms pour prévenir le phénomène de diffusion de spin qui peut fausser l'interprétation du spectre de NOESY des macromolécules. Cette technique permet l'observation de corrélations 2D qui se trouvent à une échelle de distance de 5 Å.

La première observation est la corrélation nette entre le groupe méthyle terminal et les groupes méthylènes des chaînes alkyle latérales de **4c-G1** et **5c-G1** avec des régions spécifiques de l'intérieur du squelette dendritique.

Dans le cas de **4c-G1**, les entités $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n$ apparaissent dans le spectre de RMN du proton comme deux singulets larges superposés à 0,60 ppm (CH_3) et à 0,89 ppm ($\text{(CH}_2\text{)}_n$). Le spectre de 2D NOESY montre une corrélation faible entre les entités $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n$ et les protons aromatiques OC_6H_4 de la première génération localisés à 6,8 ppm (Figure II.9, A) D'ailleurs, le groupe $\text{N(CH}_3\text{)}$ localisé à 3,20 ppm ne présente pas de corrélation avec les chaînes alkyle (Figure II.9, B). On remarque que le déplacement chimique du groupe méthyle terminal est relativement blindé ($\delta(^1\text{H}) = 0,6$ ppm) par rapport à celui du groupe méthyle terminal dans la chaîne alkyle libre ($\delta(^1\text{H}) = 0,9$ ppm). Cela est en accord avec les effets de blindage provoqués par l'intérieur hydrophobe du dendrimère.

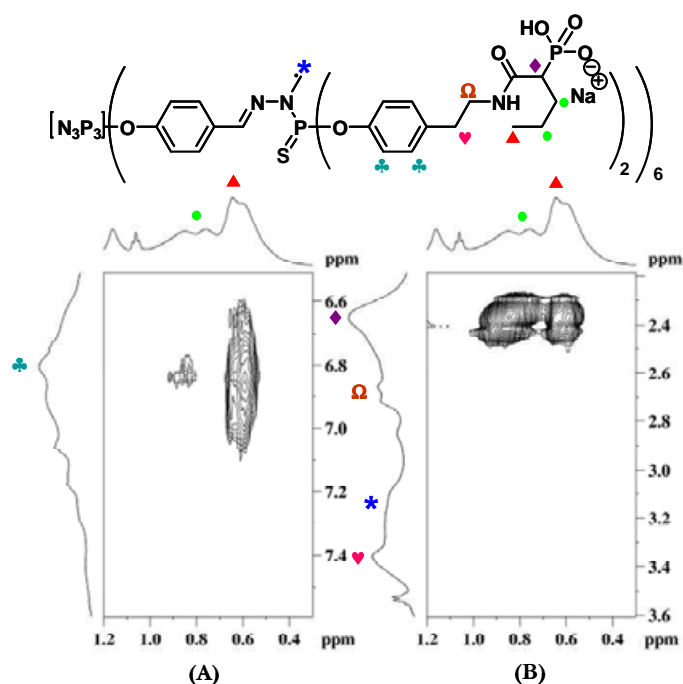


Figure II.9 Spectres de 2D NOESY ^1H - ^1H du dendrimer **4c-G1**

Dans le cas de **5c-G1**, il y a une corrélation évidente entre les protons des cycles aromatiques de la génération zéro et ceux de la génération 1, ce qui indique que ces fragments sont localisés dans une échelle de distance de 0,5 nm (Figure II.10). Elle est inférieure à la distance attendue et révèle que la structure du dendrimer est très compacte. Cette observation est cohérente avec les expériences réalisées précédemment sur des dendrimères PPH avec des groupes solubles dans l'eau à leur surface.⁽¹²³⁾

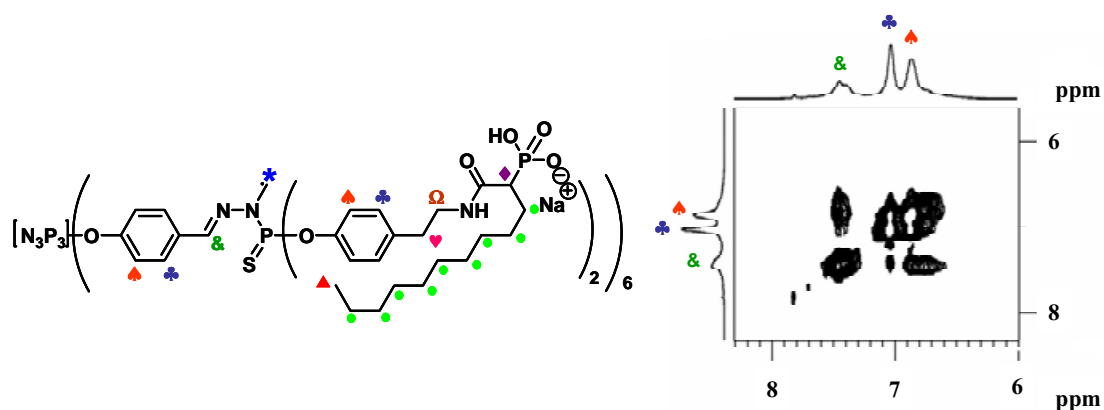


Figure II.10 Spectre de 2D NOESY ^1H - ^1H de la région aromatique de **5c-G1**

Le groupe méthyle terminal de la chaîne alkyle latérale est caractérisé par un large singulet centré à 0,49 ppm dans le spectre de RMN du proton, et les groupes méthylènes résonnent comme un multiplet non résolu (0,84-1,00 ppm). De nouveau, le signal du groupe méthyle terminal de la

chaîne alkyle subit un fort effet de blindage à haut champ car ce groupe terminal est enfermé à l'intérieur du dendrimère. En fait, le spectre de 2D NOESY montre une corrélation forte entre les groupes méthylènes de la chaîne alkyle et les systèmes aromatiques localisés à 6,70, 7,40 et 7,45 ppm attribués respectivement aux fragments C_0^2 -H, C_0^3 -H et CH=N (Figure II.11, A).

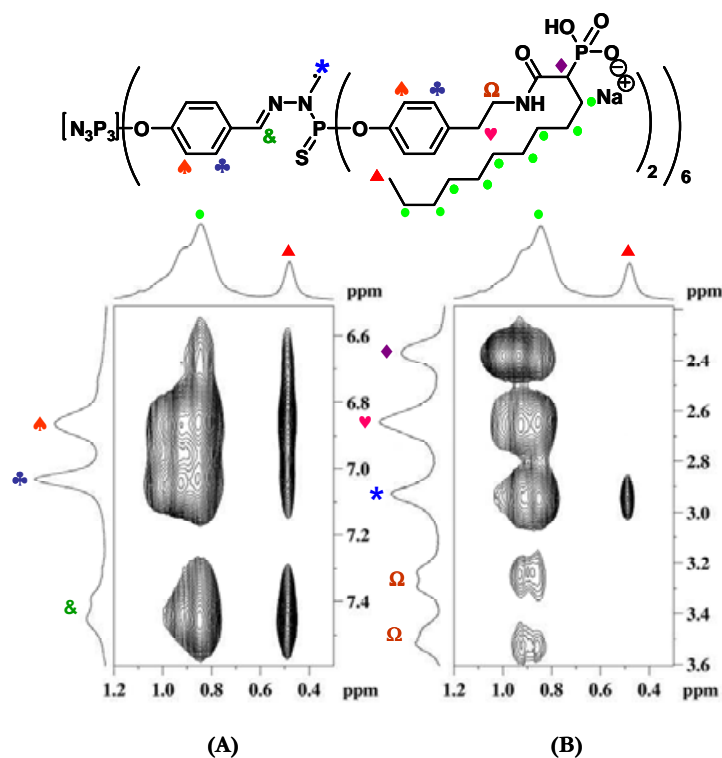


Figure II.11 Spectres de 2D NOESY 1H - 1H du dendrimère **5c-G1**

D'autres corrélations ont lieu entre les signaux de la chaîne alkyle et les signaux à 6,90 et 7,05 ppm correspondant aux groupes OC_6H_4 localisés dans la première génération. De plus, le signal du groupe méthyle terminal est corrélé avec celui des groupes $N(CH_3)$ à 2,95 ppm.

Le fait que les protons aromatiques de la génération 0 et de la génération 1 aient des interactions avec ceux des chaînes alkyle appuie l'idée que les extrémités des chaînes alkyle C_{10} latérales sont « coincées » à l'intérieur des compartiments lipophiles localisés dans la structure contractée du dendrimère (Figure II.11). De plus, la meilleure résolution du spectre obtenu dans l'eau de **5c-G1** par rapport à celle de **4c-G1** indique une interaction entre les chaînes alkyle et la structure interne du dendrimère qui a des compartiments lipophiles qui « solvantent » les chaînes alkyle.

En conclusion, l'analyse par RMN 2D montre que ces dendrimères dans l'eau possèdent des ségrégations entre leurs domaines lipophiles et hydrophiles qui impliquent que les chaînes alkyle latérales interagissent avec les domaines lipophiles de la structure du dendrimère. Dans le cas de

5c-G1, on peut proposer la présence de fortes interactions entre les chaînes alkyl C10 et l'intérieur de la structure du dendrimère PPH, alors que l'interaction entre les chaînes alkyle C3 de **4c-G1** avec l'intérieur du dendrimère est plus faible.

II.6.3.7 Synthèse des dendrimères catanioniques **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1**

Les systèmes catanioniques dendritiques **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1** sont obtenus par mélange des dendrimères à terminaisons acide phosphonique **3b-G1**, **4b-G1** et **5b-G1** avec 12 équivalents de N-hexadécylamino-lactitol dans l'eau (Schéma II.18). Le mélange réactionnel évolue à partir d'un mélange hétérogène dans lequel les dendrimères à terminaisons acide phosphonique sont en suspension à une solution limpide indiquant la formation et la solubilisation des dendrimères finaux **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1**. L'effet de la chaîne alkyle dans la formation des assemblages catanioniques n'est pas linéaire. En fait, **3d-G1** et **5d-G1** sont obtenus après 24 heures, alors que **4d-G1** est obtenu après trois jours. Dans ce contexte, on peut supposer que les interactions des chaînes alkyle C3 de **4b-G1** avec l'intérieur du dendrimère sont faibles par rapport à celles des chaînes alkyle C10 de **5b-G1**. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les chaînes alkyle C10 de **5b-G1** sont coincées à l'intérieur de la structure. Au contraire, les chaînes alkyle C3 de **4b-G1** sont moins pre-organisées dans la structure dendritique et elles ont plus de degrés de liberté. En conséquence, la formation de l'assemblage **4d-G1** pourrait être entropiquement défavorisée.

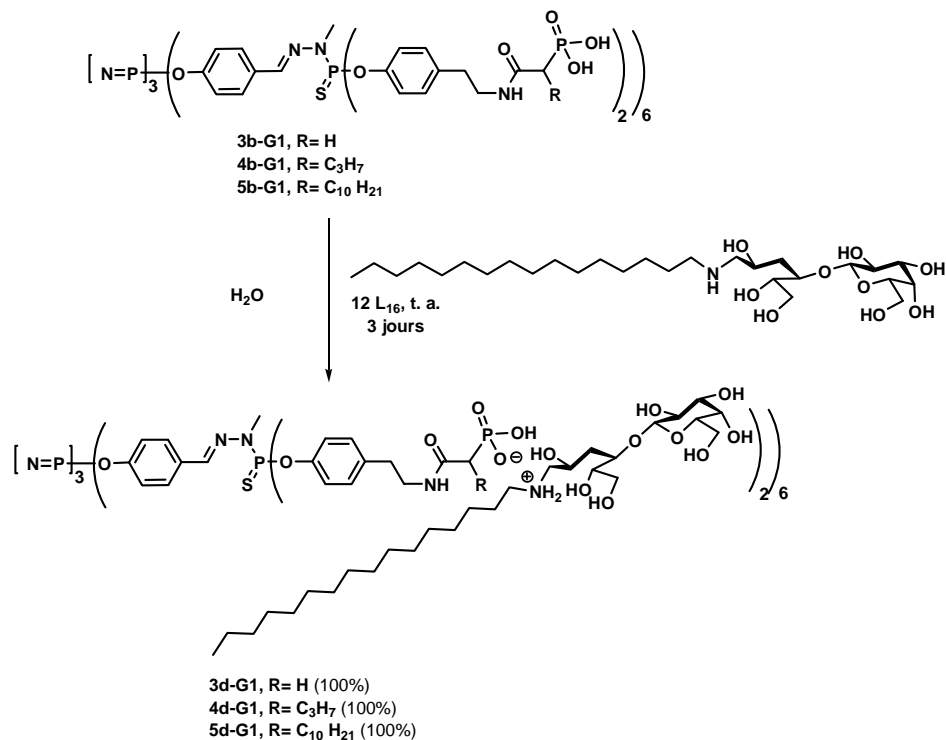


Schéma II.18 Obtention quantitative des dendrimères catanioniques α -alkylephosphonate **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1**

Finalement, la conversion des groupes acide phosphonique de départ est montrée sur le spectre de RMN du phosphore 31 par un blindage d'environ 5 ppm de l'atome de phosphore concerné. Cependant les singulets localisés vers les régions 8-9 ppm et 62-64 ppm qui sont respectivement attribués au cœur cyclotriphosphazène et aux atomes de phosphore des points de divergence ne sont pas affectés durant le processus de synthèse entier (Tableau II.4, c.f. II.7).

II.7 Compilation des données RMN

La spectroscopie de RMN constitue une bonne technique analytique pour évaluer la pureté des dendrimères phosphorés. Spécifiquement, la spectroscopie de RMN du phosphore 31 est très sensible et permet la détection d'un défaut près des atomes de phosphore. Comme chaque étape de synthèse implique une réaction qui change l'environnement d'un type d'atome de phosphore, surtout les changements à la surface du dendrimère, le contrôle de ces étapes avec la spectroscopie de RMN du phosphore 31 est très efficace. Ainsi, le Tableau II.4 montre une compilation des signaux du phosphore 31 pour les différents dendrimères synthétisés. Ces valeurs ont été discutées au cours des paragraphes précédents.

Composé	$\delta^{31}\text{P}$			$\delta^{31}\text{P}$			$\delta^{31}\text{P}$			$\delta^{31}\text{P}$		
	(CDCl ₃ , x=a)			(CD ₃ OH, x=b)			(D ₂ O/CD ₃ CN, x=c)			(D ₂ O/CD ₃ CN, x=d)		
	[P=N] ₃	PO ₃ Me ₂	PS	[P=N] ₃	PO ₃ H ₂	PS	[P=N] ₃	PO ₃ HNa	PS	[P=N] ₃	PO ₃ HL	PS
1x-G1	8,2	21,9	62,9	8,2	13,6	62,2	9,8	12,5	63,6	9,1	11,0	62,8
2x-G1	8,4	25,4	62,8	9,3	19,5	62,7	9,7	13,8	64,0	9,2	13,4	63,6
3x-G1	8,4	28,2	62,9	9,3	23,2	62,8	9,9	17,4	64,0	9,4	16,8	63,7
4x-G1	8,4	28,1	63,0	9,3	22,4	62,7	9,0	17,8	64,0	9,2	17,3	62,8
5x-G1	8,9	23,9	62,4	9,1	20,1	62,8	9,0	15,9	64,8	8,6	15,9	63,5

Tableau II.4 Déplacements chimiques de RMN du ³¹P des atomes de P des composés **1x-G1** à **5x-G1** (x = a à d)

Les dendrimères phosphorés de **Nx-G1** ne peuvent pas être analysés par spectroscopie de masse,⁽¹²⁴⁾ par conséquent la caractérisation totale de ces composés est complétée avec les spectroscopies de RMN du proton et du carbone 13.

II.8 Propriétés biologiques de nouveaux catanioniques dendritiques analogues du GalCer et de leurs précurseurs poly-anioniques

Nous avons quantifié les propriétés biologiques de ces composés grâce aux tests antiviraux réalisés *in vitro* par le Dr. Christiane Moog à l'Institut de Virologie INSERM à Strasbourg.

II.8.1 Définitions

Certains paramètres biologiques déjà présentés dans le premier Chapitre seront utilisés dans cette étude pour caractériser l'activité antivirale *in vitro* de ces produits.

- **la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)** est la concentration minimale en composé nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'un marqueur du virus (par exemple, la transcriptase inverse). *Plus la valeur de la CI₅₀ est faible, plus le produit est actif.*

- **la concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀)** est la concentration létale en produit pour 50% des cellules non infectées par le virus. *Plus la valeur de la CC₅₀ est élevée, moins le produit est toxique.*

- **l'indice thérapeutique (IT)** est le rapport entre la toxicité et l'activité inhibitrice (CC₅₀/CI₅₀). *Plus la valeur de l'IT est élevée, plus le produit est efficace.*

II.8.2 Lignée cellulaire et souche virale

Les dendrimères antiviraux que nous avons synthétisés sont des dendrimères poly-anioniques qui bloquent la gp120 de façon non spécifique et des analogues du récepteur membranaire galactosylcéramide et non du CD4. Cependant, comme nous l'avons vu dans le Chapitre I, ces composés analogues du GalCer sont capables d'empêcher aussi bien l'entrée du VIH-1 dans les cellules CD4(+) que dans les cellules GalCer(+) car ils inhibent l'interaction entre la cellule et le virus sur la boucle V3 de la gp120. Cette région est aussi impliquée dans le mécanisme de fusion entre les cellules CD4(+) et le VIH.⁽¹⁷⁾

Pour cette étude, des cellules lymphocytaires T humaines, CEM-SS et MT4 qui expriment à leur surface le récepteur CD4 (notées CD4(+)) ont été utilisées.

La souche de virus VIH utilisée dans l'étude sur des cellules MT4 est le virus VIH-1 IIIB et dans l'étude sur des cellules CEM-SS est le virus VIH-1 LAI. Ces virus sont deux isolats qui

différent par leur cytopathogénicité. Ces virus sont capables d'induire la formation de syncytia sur ce type de cellules (c.f. I.2.2.2).

II.8.3 Méthode utilisée

Pour évaluer l'activité antivirale de ces composés, les cellules CEM-SS ont été infectées par le virus VIH-1 LAI. Puis elles sont mises dans un milieu de culture où les différentes doses de composé à tester sont ajoutées préalablement. L'activité de la transcriptase inverse traduit la présence du virus relargué dans le surnageant de culture après 5 jours d'incubation. Cela permet de déterminer la concentration inhibitrice (CI_{50}) qui est calculée par rapport à celle des cellules infectées non traitées, maintenues dans les mêmes conditions de culture. De la même façon, la multiplication du VIH-1 dans les cellules MT4 est évaluée après 5 jours par suivi de la cytopathogénicité induite par le virus.

La cytotoxicité des composés est mesurée par un test colorimétrique MTT sur les cellules CEM-SS non infectées. La concentration cytotoxique (CC_{50}) est alors déterminée par rapport à celle des cellules non infectées et non traitées.

L'indice thérapeutique (IT) qui est le rapport entre la CC_{50} et la CI_{50} , est ensuite calculé pour donner des informations sur l'efficacité du dendrimère utilisé sur cellules.

II.8.4 Activité anti-VIH et viabilité cellulaire

II.8.4.1 Sel de sodium Nc-G1

Les séries de dendrimères monosel de sodium **Nc-G1** (**N** = 1 à 5) ont été testées *in vitro* pour étudier leur capacité à inhiber le VIH-1 sur des cellules CEM-SS et sur des cellules MT4 (Tableau II.5).^(125, 126)

Composé	CEM-SS				MT4			
	CI ₅₀ (µM)	RCI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IT	CI ₅₀ (µM)	RCI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IT
1c-G1	0,65	7,8	>100	>153	0,78	9,4	>100	>128
2c-G1	50	600	>100	>2	22	264	>100	>4
3c-G1	25	300	>100	>4	9,8	117,6	>100	>10
4c-G1	1,5	18	>100	>67	1,5	18	>100	>66
5c-G1	16	192	>100	>6	36	432	>100	>2

$$RCI_{50} = N \times CI_{50}; N=12$$

Tableau II.5 Résultats des tests *in vitro* des dendrimères **Nc-G1** (N = 1 à 5) pour l'inhibition de l'infection par le VIH sur des cellules CEM-SS et MT4

Les pourcentages d'inhibition sur les deux types de cellules (CEM-SS et MT4) sont montrés respectivement dans la Figure II.12 et la Figure II.13. Remarquablement, aucun de ces composés n'est toxique dans l'échelle de concentrations de 0,1 à 100 µM. En conséquence, la CI₅₀ mesurée est l'activité antivirale effective. Parmi ces séries, les valeurs de CI₅₀ sont légèrement dépendantes de l'environnement de la fonction phosphonate.

Les valeurs obtenues sur des cellules CEM-SS ont été déterminées par le dosage de la transcriptase inverse virale, un marqueur de l'activité virale. Pour confirmer ces résultats, ces dendrimères sont aussi testés sur des cellules MT4, un autre type de cellules lymphoblastoïdes T4 très sensibles à l'infection du VIH (Figure II.13). Cette lignée permet d'observer un effet cytopathogène (ECP). Cet effet cytopathogène est directement corrélé à la quantité de virus utilisée pour l'infection, à sa réplication et à l'expression des antigènes viraux par les cellules.

Le dendrimère à terminaison vinylphosphonate **1c-G1** et le dendrimère à chaîne alkyle de 3 atomes de carbone **4c-G1** (Tableau II.5) présentent les meilleures activités inhibitrices sur des cellules CEM-SS (Figure II.12). Cette activité est jusqu'à 50 fois supérieure à celle des autres dendrimères poly-anioniques. De plus, elle est du même ordre que celles du PRO2000 et du sulfate de dextrine (DS), deux composés poly-anioniques qui sont actuellement en essais cliniques.⁽²²⁾ La raison de cette activité élevée sera rationalisée plus tard par des études physicochimiques.

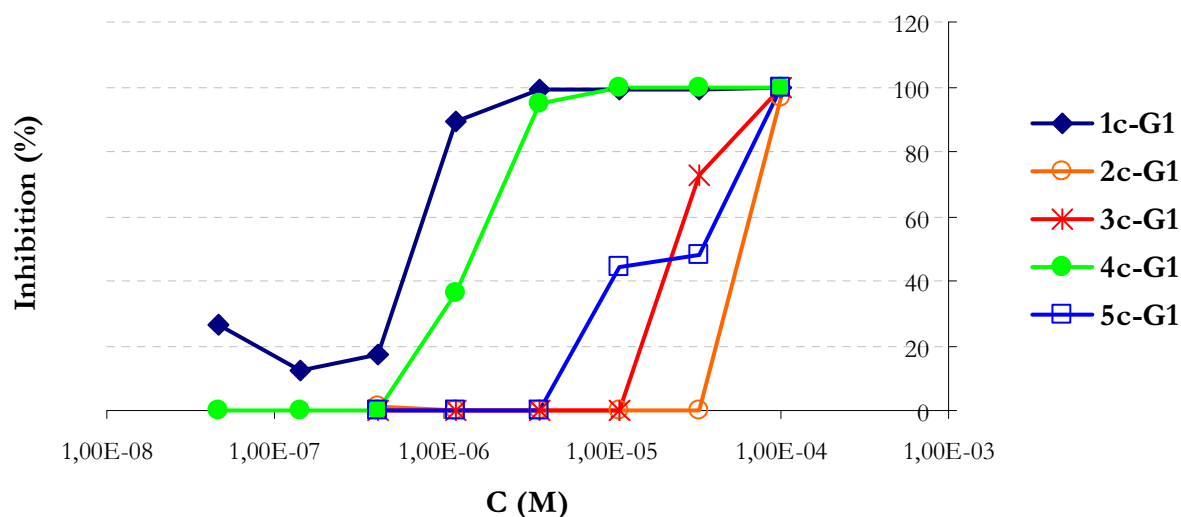


Figure II.12 Inhibition de l'infection par le VIH-1 des cellules CEM-SS par les dendrimères **Nc-G1**

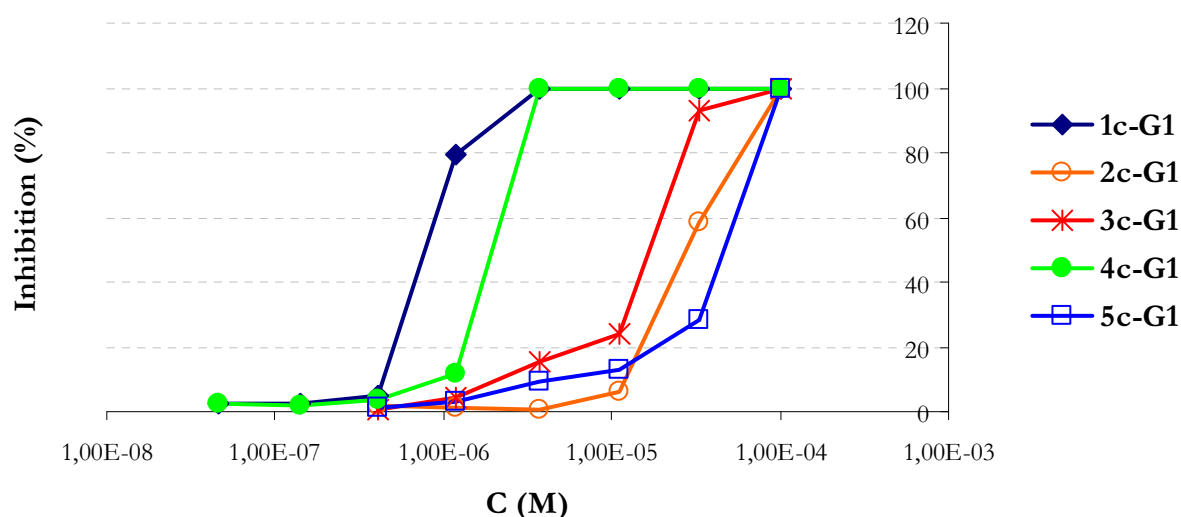


Figure II.13 Inhibition de l'infection par le VIH-1 des cellules MT4 par les dendrimères **Nc-G1**

Si l'on s'intéresse à l'influence de la chaîne alkyle sur les activités des dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate, il apparaît que les dendrimères **3c-G1** et **5c-G1** inhibent la réplication du VIH dans la même échelle de concentration respectivement, 25 et 16 μM (Tableau II.5). Au contraire, le dendrimère **4c-G1** avec la chaîne alkyl courte C3 présente une activité anti-VIH supérieure (1,5 μM). Le fait que le dendrimère **4c-G1** soit 10 fois plus actif que les dendrimères **3c-G1** (sans chaîne alkyle) et **5c-G1** (chaînes alkyle C10) peut être rationalisé par les expériences de NOESY ^1H - ^1H (c.f. II.3.5.6). En fait, on peut supposer que les chaînes alkyle C10 de **5c-G1**

interagissent fortement avec l'intérieur contracté de la structure du dendrimère comme suggéré par l'étude 2D NOESY. En conséquence, ces chaînes ne sont pas disponibles pour interagir avec la surface du virus.

Nous vérifions sur les cellules MT4 la même tendance pour l'activité. Le dendrimère **4c-G1** est plus actif que les analogues **3c-G1** et **5c-G1**. La CI_{50} pour les dendrimères **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1** est respectivement de 10, 1,5 et 35 μ M. Ces essais *in vitro* sur des cellules MT4 permettent de vérifier que les dendrimères phosphonate **1c-G1** et **4c-G1** présentent les meilleures activités inhibitrices (Figure II.13).

II.8.4.2 Dérivés catanioniques Nd-G1

Les activités inhibitrices des dendrimères **Nd-G1** (**N** = 1 à 5) contre le VIH-1 ont été évaluées *in vitro* sur des cellules CEM-SS et sur des cellules MT4, selon les mêmes procédés (Tableau II.6).⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾

Composé	N	CI_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)	RCI_{50} (μ M)	RCC_{50} (μ M)	IT
1c-G1	12	0,65	>100	7,8	>1200	>153
2c-G1	12	50	>100	600	>1200	>2
3c-G1	12	25	>100	300	>1200	>4
4c-G1	12	1,5	>100	18	>1200	>67
5c-G1	12	16	>100	192	>1200	>6
1d-G1	12	0,25	1,6	3	19,2	6,4
2d-G1	12	0,21	1,2	2,5	14,4	4
3d-G1	12	0,40	1,9	4,8	22,8	4,8
4d-G1	12	0,33	1,5	3,9	18	4,5
5d-G1	12	0,31	6,1	3,7	73,2	19,7
1'd-G1	12	0,12	3,9	1,4	16,8	32
L16	1	50	70	50	70	1,4

Tableau II.6 Résultats des tests *in vitro* des dendrimères **Nc-G1** et **Nd-G1** (**N** = 1 à 5), **1'd-G1** (le dendrimère à terminaisons acide cinnamique précédent) et **L₁₆** pour l'inhibition de l'infection par le VIH sur des cellules CEM-SS^(125, 126)

La série **Nd-G1** (**X** = 1 à 5) de composés catanioniques multivalents analogues du GalCer sont testés selon le même procédé (Tableau II.6). Tous ces composés présentent de bonnes activités

antivirales caractérisées par des concentrations inhibitrices qui varient entre 0,16 et 0,40 μM (Tableau II.6). Les pourcentages d'inhibition sur des cellules CEM-SS sont représentés dans la Figure II.14.

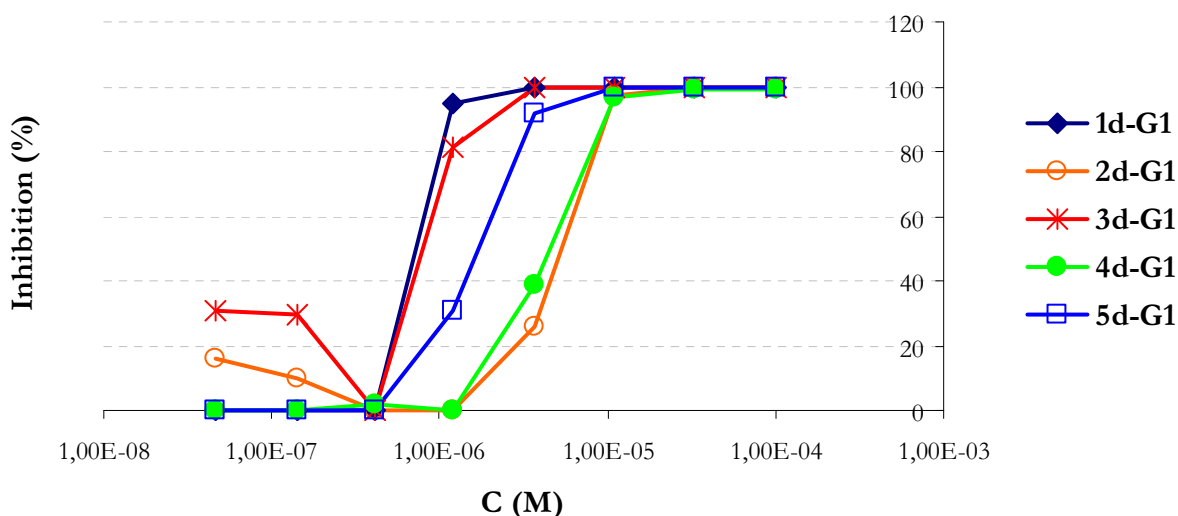


Figure II.14 Inhibition de l'infection par le VIH-1 des cellules CEM-SS par les dendrimères **Nd-G1**

Toutes ces associations dendritiques sont plus actives *in vitro* que l'aminolactitol constitutif qui possède le site de reconnaissance du virus et que les précurseurs. Ces résultats indiquent qu'il y a un effet multivalent.

Malheureusement, les index thérapeutiques sont dramatiquement affectés par une cytotoxicité non-négligeable des produits, indiquant que ces composés sont peu sélectifs (IT inférieure ou égale à 19,7). Les valeurs de RCC_{50} comprises dans une gamme de 13,2 et 73,2 μM sont à peu près égales ou égales à celle de l'aminolactitol libre (75 μM). De plus, ces nouveaux dendrimères sont relativement plus toxiques que le dendrimère à terminaisons acide cinnamique **1d-G1** (3,9 μM) synthétisé précédemment.⁽⁹⁾ Ces résultats indiquent que les modifications structurales réalisées à proximité de l'association catanionique ne réduisent pas la cytotoxicité de ces dendrimères catanioniques sauf pour le dendrimère **5d-G1** qui présente une toxicité plus basse que les autres dendrimères catanioniques. Vraisemblablement l'assemblage supramoléculaire **5d-G1** est plus stable que les autres grâce à la présence des chaînes alkyle C10 près de l'acide phosphonique, qui peuvent consolider la paire d'ions par les interactions lipophiles entre les chaînes alkyle C10 et les chaînes alkyle des unités de N-hexadécylaminolactitol. Le gain en cytotoxicité reste cependant faible. Dans tous les cas, ces dérivés catanioniques dendritiques pourraient souffrir d'un manque de stabilité des assemblages supramoléculaires dans le milieu cellulaire. Selon cette hypothèse, le système pourrait être dissocié partiellement et conduire à la libération des dendrimères constitutifs qui ne sont pas cytotoxiques (Tableau II.6, **Nc-G1**) et les unités de N-hexadécylaminolactitol qui peuvent être responsables de la

toxicité relative. En effet cet aminolactitol est toxique pour les cellules CEM-SS dans la gamme de 10 à 100 μM à cause de ses propriétés de détergence.⁽⁹⁾ Nous verrons dans la suite de cette thèse (Chapitre IV) comment vérifier cette hypothèse.

II.9 Conclusions

Les travaux antérieurs à cette thèse ont montré que les analogues multivalents du GalCer^(8, 9) sont de bons inhibiteurs du VIH-1 mais ils possèdent une toxicité cellulaire non-négligeable. Dans le but de diminuer cette cytotoxicité et d'étudier l'influence de la périphérie du dendrimère dans l'activité anti-VIH, nous avons conçu une série de dendrimères de première génération à terminaison acide phosphonique et leurs analogues catanioniques du GalCer.

Ces composés et leurs précurseurs ont été étudiés par spectroscopie de RMN du proton, du phosphore 31 et du carbone 13. En particulier la spectroscopie de RMN du phosphore 31 a été un outil efficace pour contrôler les modifications chimiques. Les déplacements chimiques pour les groupes phosphonate terminaux (ou acide phosphonique) obtenus sont cohérents avec les déplacements chimiques observés dans les travaux précédents.⁽⁶⁹⁾

De plus, l'analyse par spectroscopie de RMN de 2D NOESY ^1H - ^1H a permis d'interpréter le comportement anti-VIH des dendrimères avec des chaînes alkyle latérales près des fonctions de surface, **4c-G1** et **5c-G1**. En effet, les essais biologiques réalisés sur des cellules CEM-SS indiquent que la longueur de la chaîne influence l'efficacité de ces inhibiteurs. En fait, les dendrimères **3c-G1** (sans chaîne) et **5c-G1** (chaîne alkyle C10 greffée dans la position α des terminaisons acide phosphonique) sont très différents structurellement mais ils ont des activités anti-VIH similaires. Cependant, le dendrimère **4c-G1** avec la chaîne alkyl C3 présente une activité 10 fois supérieure. Les expériences de NOESY 2D réalisées pour ces dendrimères dans l'eau indiquent que les chaînes alkyle de **5c-G1** pourraient être plus enfermées dans le squelette dendritique. La capacité des chaînes alkyle à interagir avec la boucle V3 de la gp120 est un paramètre clé pour la conception des inhibiteurs anti-VIH. Celles de **4c-G1** sont plus disponibles, cela pourrait expliquer son activité supérieure.

Les propriétés inhibitrices *in vitro* sur cellules CEM-SS des dendrimères poly-phosphoniques sous forme de sel de sodium sont en accord avec les observations précédentes pour les dendrimères poly-anioniques ou pour les polymères linéaires poly-anioniques,⁽¹³⁰⁾ tous ces composés ayant des index thérapeutiques bas (peu sélectifs), à l'exception de **1c-G1** avec un IT de 153. Néanmoins il faut noter que ces IT obtenus pour nos composés sont comparables à ceux de certains composés classiquement employés en poly-thérapies, comme par exemple les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse comme les dérivés de la calanolide (IT >20-103).⁽¹³¹⁾

Par ailleurs, nous avons vu que l'environnement local de charges négatives influe sur les activités inhibitrices des poly-anions. Au contraire, cet environnement a un impact faible sur l'activité anti-VIH des analogues catanioniques. Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces modifications chimiques sont moins influentes lors des interactions dendrimères/VIH, puisque ces dernières sont supposées impliquer les têtes sucres qui « masquent » partiellement les modifications chimiques évoquées. Enfin, la série des analogues cationiques analogues du GalCer montre une très bonne activité, mais des index thérapeutiques bas à cause des valeurs relativement élevées de la CC_{50} . Cette toxicité est probablement liée au manque de stabilité de la paire d'ions *in vitro*.

Nous avons mis en œuvre une stratégie de synthèse qui visait à explorer l'influence de l'environnement chimique de l'acide impliqué dans la paire d'ions constitutive des ces dendrimères catanioniques. L'hypothèse centrale de cette stratégie était la possibilité d'augmenter la stabilité de la paire d'ions grâce à cette modification chimique, notamment par l'augmentation des effets hydrophobes apportés par une chaîne alkyle supplémentaire.

Nos résultats montrent que :

Dans le cas des composés poly-anioniques, l'environnement chimique de l'acide est primordial, et que la présence de chaînes alkyle « libres » peut augmenter l'activité de ces inhibiteurs en renforçant les interactions avec la poche lipophile de la boucle V3.

Dans le cas des assemblages catanioniques, la présence d'une longue chaîne alkyle a permis de diminuer la toxicité d'un facteur 5 environ. Cela nous a permis de valider partiellement l'hypothèse selon laquelle la relative toxicité des inhibiteurs catanioniques analogues du GalCer était liée à un manque de stabilité *in vitro*.

Le gain en stabilité permet d'avoir des indices thérapeutiques proches de ceux des composés testés cliniquement comme les dérivés de la calanolide. Cependant ils ne sont pas suffisants pour le développement d'un médicament. Pour cela, des index thérapeutiques supérieurs à 1000 sont nécessaires.

Cette étude mettant en parallèle structure chimique/activité inhibitrice a donc été complétée par une étude physicochimique sur les propriétés auto-associatives de ces systèmes dont les Chapitres suivants sont l'objet.

II.10 Bibliographie

- (1) Rico-Lattes, I.; Garrigues, J. C.; Perez, E.; André-Barrès, C.; Madelaine-Dupuich, C.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1995**, *19*, 341.
- (2) Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *Colloids Surf., A* **1997**, *123-124*, 37.
- (3) Fantini, J.; Hammache, D.; Delézay, O.; Yahi, N.; André-Barrès, C.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7245.
- (4) Rico-Lattes, I.; Gouzy, M. F.; Andre-Barres, C.; Guidetti, B.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1998**, *22*, 451.
- (5) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1063.
- (6) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A., *Langmuir* **1999**, *15*, 6163.
- (7) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Gulik, A., *Chem. Commun.* **2003**, 244.
- (8) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Chem. Commun.* **2002**, 1864.
- (9) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2207.
- (10) Harouse, J. M.; Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Laughlin, M.; Stefano, K.; Silbergerf, D. H.; Gonzalez-Scarano, F., *Science* **1991**, *253*, 320.
- (11) Yahi, N.; Baghdiguian, S.; Moreau, M.; Fantini, J., *J. Virol.* **1992**, *66*, 4848.
- (12) Rico-Lattes, I.; Gouzy, M. F.; André-Barrès, C.; Guidetti, B.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1998**, *22*, 451.
- (13) Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *Colloids Surf., A* **1997**, *123*, 37.
- (14) Lundquist, J. J.; Toone, E. J., *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- (15) Page, D.; Roy, R., *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 714.
- (16) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755.
- (17) Fantini, J.; Hammache, D.; Delezay, O.; Yahi, N.; AndreBarres, C.; RicoLattes, I.; Lattes, A., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7245.
- (18) Rico-Lattes, I.; Garrigues, J. C.; Perez, E.; Andrebarres, C.; Madelainedupuich, C.; Lattes, A.; Linas, M. D.; Aubertin, A. M., *New J. Chem.* **1995**, *19*, 341.
- (19) Villard, R.; Hammache, D.; Delapierre, G.; Fotiadu, F.; Buono, G.; Fantini, J., *ChemBioChem* **2002**, *3*, 517.
- (20) Kensinger, R. D.; Catalone, B. J.; Krebs, F. C.; Wigdahl, B.; Schengrund, C.-L., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1614.
- (21) Kensinger, R. D.; Yowler, B. C.; Benesi, A. J.; Schengrund, C.-L., *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 349.
- (22) Fletcher, P.; Wallace, G.; Mesquita, P.; Shattock, R., *Retrovirology* **2006**, *3*, 46.
- (23) McCarthy, T.; Karellas, P.; Henderson, S.; Giannis, M.; O'Keefe, D.; Matthews, B.; Braggs, B.; Paull, J.; Heery, G.; Krippner, G.; Holan, G., *Antivir. Res.* **2004**, *62*, 42.
- (24) Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Lu, Z.; Olson, W.; Kwong, P. D.; Sattentau, Q. J., *J. Virol.* **2000**, *74*, 1948.

- (25) Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; Gonzalezscarano, F.; Fantini, J., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24349.
- (26) Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
- (27) Launay, N.; Caminade, A. M.; Lahana, R.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1589.
- (28) Launay, N.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3282.
- (29) Caminade, A. M.; Laurent, R.; Turrin, C. O.; Rebout, C.; Delavaux-Nicot, B.; Ouali, A.; Zablocka, M.; Majoral, J. P., *C. R. Chimie* **2010**, *13*, 1006.
- (30) Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 341.
- (31) Brauge, L.; Maraval, V.; Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *ARKIVOC* **2002**, 151.
- (32) Larre, C.; Bressolles, D.; Turrin, C.; Donnadiou, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13070.
- (33) Kanibolotsky, A.; Roquet, S.; Cariou, M.; Leriche, P.; Turrin, C. O.; de Bettignies, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Khodorkovsky, V.; Gorgues, A., *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2109.
- (34) Caminade, A. M.; Laurent, R.; Chaudret, B.; Majoral, J. P., *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178*, 793.
- (35) Turrin, C. O.; Maraval, V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Mehdi, A.; Reye, C., *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3848.
- (36) Turrin, C. O.; Maraval, V.; Leclaire, J.; Dantras, E.; Lacabanne, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3965.
- (37) Magro, G.; Donnadiou, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2151.
- (38) Poupot, M.; Griffe, L.; Marchand, P.; Maraval, A.; Rolland, O.; Martinet, L.; L'Faqihi-Olive, F. E.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Fournie, J. J.; Majoral, J. P.; Poupot, R., *FASEB J.* **2006**, *20*, 2339.
- (39) Soler-Illia, G.; Rozes, L.; Boggiano, M. K.; Sanchez, C.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4250.
- (40) Caminade, A. M.; Maraval, V.; Laurent, R.; Turrin, C. O.; Sutra, P.; Leclaire, J.; Griffe, L.; Marchand, P.; Baudoin-Dehoux, C.; Rebout, C.; Majoral, J. P., *C. R. Chim.* **2003**, *6*, 791.
- (41) Feng, C. L.; Zhong, X. H.; Steinhart, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Knoll, W., *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1933.
- (42) Majoral, J. P.; Caminade, A. M.; Maraval, V., *Chem. Commun.* **2002**, 2929.
- (43) Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3643.
- (44) Caminade, A. M.; Turrin, C. O.; Laurent, R.; Rebout, C.; Majoral, J. P., *Polym. Int.* **2006**, *55*, 1155.
- (45) Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 491.
- (46) Prevote, D.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4834.
- (47) Lartigue, M. L.; Slany, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1417.
- (48) Launay, N.; Slany, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3799.
- (49) Brauge, L.; Veriot, G.; Franc, G.; Deloncle, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11891.
- (50) Majoral, J. P.; Caminade, A. M., *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 845.
- (51) Balueva, A.; Merino, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.* **2002**, *643*, 112.
- (52) Servin, P.; Rebout, C.; Laurent, R.; Peruzzini, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 579.
- (53) Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3282.

- (54) Deloncle, R.; Coppel, Y.; Rebout, C.; Majoral, J. P.; Caminade, A. M., *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 493.
- (55) Padie, C.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Furer, V. L.; Vandyukova, II; Kovalenko, V. I., *Russ. J. Gen. Chem.* **2008**, *78*, 2257.
- (56) Merino, S.; Brauge, L.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Taton, D.; Gnanou, Y., *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3095.
- (57) Darcos, V.; Dureault, A.; Taton, D.; Gnanou, Y.; Marchand, P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Destarac, M.; Leising, F., *Chem. Commun.* **2004**, 2110.
- (58) Caminade, A. M.; Turrin, C. O.; Sutra, P.; Majoral, J. P., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 282.
- (59) Marchand, P.; Griffe, L.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Destarac, M.; Leising, F., *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1309.
- (60) Fuks-Janczarek, I.; Nunzi, J. M.; Sahraoui, B.; Kityk, I. V.; Berdowski, J.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Martineau, A. C.; Frere, P.; Roncali, J., *Opt. Commun.* **2002**, *209*, 461.
- (61) Sebastian, R. M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Levillain, E.; Huchet, L.; Roncali, J., *Chem. Commun.* **2000**, 507.
- (62) Griffe, L.; Poupot, M.; Marchand, P.; Maraval, A.; Turrin, C. O.; Rolland, O.; Metivier, P.; Bacquet, G.; Fournie, J. J.; Caminade, A. M.; Poupot, R.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2523.
- (63) Le Derf, F.; Levillain, E.; Trippe, G.; Gorgues, A.; Salle, M.; Sebastian, R. M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 224.
- (64) Maraval, V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blais, J. C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1822.
- (65) Lacour, M. A.; Zablocka, M.; Caminade, A. M.; Taillefer, M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4870.
- (66) Marchand, P.; Griffe, L.; Poupot, M.; Turrin, C. O.; Bacquet, G.; Fournie, J. J.; Majoral, J. P.; Poupot, R.; Caminade, A. M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3963.
- (67) Caminade, A. M.; Wei, Y. Q.; Majoral, J. P., *C. R. Chimie* **2009**, *12*, 105.
- (68) Terenziani, F.; Parthasarathy, V.; Pla-Quintana, A.; Maishal, T.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8691.
- (69) Rolland, O.; Griffe, L.; Poupot, M.; Maraval, A.; Ouali, A.; Coppel, Y.; Fournie, J. J.; Bacquet, G.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Poupot, R., *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4836.
- (70) Rolland, O.; Turrin, C. O.; Bacquet, G.; Poupot, R.; Poupot, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2078.
- (71) Caminade, A. M.; Servin, P.; Laurent, R.; Majoral, J. P., *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 56.
- (72) Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6503.
- (73) Prevote, D.; Donnadiou, B.; Moreno-Manas, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1701.
- (74) Koprowski, M.; Sebastian, R. M.; Maraval, V.; Zablocka, M.; Cadierno, V.; Donnadiou, B.; Igau, A.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Organometallics* **2002**, *21*, 4680.
- (75) Fuchs, S.; Pla-Quintana, A.; Mazeres, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4751.
- (76) Ouali, A.; Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Taillefer, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15990.

- (77) Krishna, T. R.; Parent, M.; Werts, M. H. V.; Moreaux, L.; Gmouh, S.; Charpak, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4645.
- (78) Leclaire, J.; Coppel, Y.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2304.
- (79) Solassol, J.; Crozet, C.; Perrier, V.; Leclaire, J.; Beranger, F.; Caminade, A. M.; Meunier, B.; Dormont, D.; Majoral, J. P.; Lehmann, S., *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 1791.
- (80) Reinert, P.; Chane-Ching, J. Y.; Bull, L.; Dagiral, R.; Batail, P.; Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1259.
- (81) Schmid, G.; Meyer-Zaika, W.; Pugin, R.; Sawitowski, T.; Majoral, J. P.; Caminade, A. M.; Turrin, C. O., *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1693.
- (82) Loup, C.; Zanta, M. A.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Meunier, B., *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3644.
- (83) Martinez-Ferrero, E.; Franc, G.; Mazeres, S.; Turrin, U. O.; Boissiere, U.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Sanchez, C., *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7658.
- (84) Franc, G.; Mazeres, S.; Turrin, C. O.; Vendier, L.; Duhayon, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8707.
- (85) Marmillon, C.; Gauffre, F.; Gulik-Krzywicki, T.; Loup, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Vors, J. P.; Rump, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2626.
- (86) El Ghzaouit, A.; Gauffre, F.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Lannibois-Drean, H., *Langmuir* **2004**, *20*, 9348.
- (87) Goller, R.; Vors, J. P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3587.
- (88) Servin, P.; Laurent, R.; Gonsalvi, L.; Tristany, M.; Peruzzini, M.; Majoral, J. P.; Caminade, A. M., *Dalton Trans.* **2009**, 4432.
- (89) Badetti, E.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Moreno-Manas, M.; Sebastian, R. M., *Langmuir* **2008**, *24*, 2090.
- (90) Klajnert, B.; Cangiotti, M.; Calici, S.; Ionov, M.; Majoral, J. P.; Caminade, A. M.; Cladera, J.; Bryszewska, M.; Ottaviani, M. F., *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1087.
- (91) Cadierno, V.; Igau, A.; Donnadieu, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Organometallics* **1999**, *18*, 1580.
- (92) Slany, M.; Bardaji, M.; Caminade, A. M.; Chaudret, B.; Majoral, J. P., *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1939.
- (93) Benito, M.; Rossell, O.; Seco, M.; Segales, G.; Maraval, V.; Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.* **2001**, *622*, 33.
- (94) Slany, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9053.
- (95) Severac, M.; Leclaire, J.; Sutra, P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3019.
- (96) Mongin, O.; Krishna, T. R.; Werts, M. H. V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M., *Chem. Commun.* **2006**, 915.
- (97) Mongin, O.; Pla-Quintana, A.; Terenziani, F.; Drouin, D.; Le Droumaguet, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M., *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1354.
- (98) Gissibl, A.; Padie, C.; Hager, M.; Jaroschik, F.; Rasappan, R.; Cuevas-Yanez, E.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Reiser, O., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2895.
- (99) Turrin, C. O.; Chiffre, J.; Daran, J. C.; de Montauzon, D.; Caminade, A. M.; Manoury, E.; Balavoine, G.; Majoral, J. P., *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2521.
- (100) Maraval, V.; Laurent, R.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Organometallics* **2000**, *19*, 4025.

- (101) Routaboul, L.; Vincendeau, S.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Daran, J. C.; Manoury, E., *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1064.
- (102) Hadad, C.; Majoral, J. P.; Muzart, J.; Caminade, A. M.; Bouquillon, S., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1902.
- (103) Khan, A.; Marquès, E., *Specialist Surfactant*. Blackie Academic and Professional, London, 1997, 37 p.
- (104) Kaler, E. W.; Murthy, A. K.; Rodriguez, B. E.; Zasadzinski, J. A. N., *Science* **1989**, *245*, 1371.
- (105) Menger, F. M.; Binder, W. H.; Keiper, J. S., *Langmuir* **1997**, *13*, 3247.
- (106) Jokela, P.; Jönsson, B.; Khan, A., *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3291.
- (107) Bololoi, C. *Nouveaux amphiphiles catanioniques analogues du galactosylceramide: corrélation structure, propriétés physico-chimiques et activité anti-VIH*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2008**.
- (108) Garelli-Calvet, R.; Latgé, P.; Rico, I.; Lattes, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1109*, 55.
- (109) Prévoté, D. *Synthèse et réactivité de dendrimères phosphorés*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **1997**.
- (110) Prevote, D.; LeRoyGourvennec, S.; Caminade, A. M.; Masson, S.; Majoral, J. P., *Synthesis* **1997**, 1199.
- (111) Ando, K., *J. Synt. Org. Chem. Jap.* **2000**, *58*, 869.
- (112) Rein, T.; Pedersen, T. M., *Synthesis* **2002**, 579.
- (113) Griffe, L. *Dendrimères et dendrons phosphorés, de la chimie des matériaux à la biologie*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2004**.
- (114) Murphy, P. J., *Organophosphorus reagents: a practical approach in chemistry*. Oxford University Press, 2004, 275 p.
- (115) Lartigue, M. L.; Donnadiou, B.; Galliot, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Fayet, J. P., *Macromolecules* **1997**, *30*, 7335.
- (116) Spataro, G. *Elaboration de dendrimères phosphorés : applications en biologie*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2007**.
- (117) Caminade, A. M.; Turrin, C. O.; Laurent, R.; Maraval, A.; Majoral, J. P., *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2333.
- (118) March, J., *Advanced organic chemistry : reactions, mechanisms and structure* John Wiley & sons 1999, 1495 p.
- (119) Han, S. Y.; Kim, Y. A., *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- (120) Montalbetti, C.; Falque, V., *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.
- (121) Tius, M. A.; Fauq, A. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1035.
- (122) Kitov, P. I.; Bundle, D. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271.
- (123) Leclaire, J.; Dagiral, R.; Fery-Forgues, S.; Coppel, Y.; Donnadiou, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15762.
- (124) Blais, J.-C.; Turrin, C.-O.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5097.
- (125) Perez-Anes, A.; Spataro, G.; Coppel, Y.; Moog, C.; Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Rico-Lattes, I.; Majoral, J. P., *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3491.
- (126) Perez-Anes, A.; Stefaniu, C.; Moog, C.; Majoral, J. P.; Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Rico-Lattes, I., *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *18*, 242.
- (127) Moog, C.; Wick, A.; Leber, P.; Kirn, A.; Aubertin, A. M., *Antivir. Res.* **1994**, *24*, 275.
- (128) Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; Declercq, E., *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309.

- (129) Peytou, V.; Condom, R.; Patino, N.; Guedj, R.; Aubertin, A. M.; Gelus, N.; Bailly, C.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D., *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4042.
- (130) Weber, J.; Desai, K.; Darbyshire, J., *PLoS Med.* **2005**, *2*, 392.
- (131) Yang, S. S.; Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Bader, J. P., *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 265.

**Chapitre III : Etude
physicochimique des
dendrimères catanioniques et
de leurs précurseurs**

CHAPITRE III : ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DES DENDRIMERES CATANIONIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS	153
III.1 INTRODUCTION.....	156
III.2 RAPPEL SUR L'AGREGATION DES TENSIOACTIFS EN SOLUTION	156
III.2.1 Les tensioactifs catanioniques	159
III.3 AGREGATION DANS L'EAU DES DERIVES CATANIONIQUES DENDRIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS	165
III.3.1 Sels de sodium des dendrimères PPH à terminaisons acide	165
<i>III.3.1.1 Concentration d'agrégation critique</i>	<i>166</i>
III.3.1.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface	166
III.3.1.1.2 Influence de la nature de la branche terminale	169
<i>III.3.1.2 Taille et forme des objets</i>	<i>170</i>
III.3.2 Dendrimères PPH catanioniques.....	170
<i>III.3.2.1 Concentration d'agrégation critique</i>	<i>170</i>
III.3.2.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface	171
III.3.2.1.2 Influence de la chaîne alkyle latérale	172
<i>III.3.2.2 Corrélation des propriétés d'agrégations et des propriétés biologiques des catanioniques Nd-G1</i>	<i>174</i>
<i>III.3.2.3 Taille et forme des objets</i>	<i>177</i>
III.3.2.3.1 Etude de la distribution de la taille des agrégats	177
III.3.2.3.2 Etude par microscopie électronique	179
III.3.2.3.3 Etude des objets par cryofracture	180
III.4 CONCLUSIONS	182
III.5 BIBLIOGRAPHIE.....	185

III.1 Introduction

Pour déterminer l'origine de la cytotoxicité de ces dendrimères catanioniques analogues du GalCer, il est nécessaire avant toute chose de connaître le comportement de ces systèmes en solution.

En effet, le comportement de ces tensioactifs à structure dendritique en solution va différer de celui des amphiphiles ioniques en raison de la présence d'un contre ion organique. Pour cela, l'étude physicochimique vise à déterminer les concentrations d'agrégation critiques, les modes d'autoorganisation ainsi que la forme et la taille des objets formés.

Enfin, nous explorerons les aptitudes de ces familles de tensioactifs dendritiques à former des objets à des concentrations pour lesquelles elles sont biologiquement actives.

III.2 Rappel sur l'agrégation des tensioactifs en solution

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles formées de deux parties d'affinité différentes (hydrophobe et hydrophile). Les plus simples sont constituées d'une tête polaire et d'une longue chaîne alkyle.

Ces molécules amphiphiles présentent la particularité de s'auto-organiser en construisant des interfaces. En effet, les tensioactifs sont capables de s'adsorber et de s'orienter à l'interface eau-air, en abaissant la tension superficielle. A faible concentration, les molécules amphiphiles sont dispersées dans l'eau à l'état non agrégé mais à partir d'une concentration limite, ces molécules forment des agrégats supramoléculaires. Cette agrégation résulte d'une compétition entre les différentes interactions, principalement attractives entre les chaînes (effet hydrophobe) ou répulsives entre les têtes (répulsion coulombienne ou dipôle-dipôle).

Ainsi, l'effet hydrophobe est gouverné par un équilibre entre l'entropie et l'enthalpie du processus d'agrégation.

- La diminution de la mobilité des molécules amphiphiles au sein de l'agrégat provoque une diminution de l'entropie du système. Par contre, l'auto-association des amphiphiles implique le relargage des molécules d'eau qui forment une couche d'hydratation très organisée autour des parties hydrophobes des molécules. Cela augmente l'entropie du système.

- Le transfert des chaînes hydrophobes du solvant polaire vers l'environnement hydrophobe de l'agrégat entraîne une variation favorable de l'enthalpie libre qui est l'origine du phénomène d'agrégation. Par contre, les liaisons hydrogène dans la sphère d'hydratation entre les amphiphiles et les molécules d'eau disparaissent à cause de la formation des agrégats. Cela conduit à une variation défavorable d'enthalpie libre du système.

Les variations de ces deux grandeurs thermodynamiques dépendent fortement du système, de la température et de la concentration.

Finalement, les propriétés physiques de la solution varient fortement à partir d'une certaine concentration. La méthode la plus utilisée pour la détermination des valeurs de CAC d'un tensioactif est de faire varier une propriété physique du tensioactif en solution en fonction de la concentration. Le point de rupture ou d'inflexion sur la courbe ainsi obtenue donne la valeur de la CAC du tensioactif. ⁽¹⁾

D'autre part, la géométrie des objets ainsi formés en solution va alors dépendre essentiellement de deux facteurs : la structure moléculaire du tensioactif de départ et la nature du milieu environnant.

Pour prédire la géométrie des agrégats, le modèle thermodynamique d'Israelachvili peut être appliqué. ⁽²⁾ Dans ce modèle, la morphologie des agrégats est reliée à la structure du tensioactif à travers le paramètre d'empilement moléculaire P , donné par l'équation III.1 où v est le volume de la partie hydrophobe, a_0 est l'aire de la tête polaire et l_c est la longueur critique de la chaîne hydrophobe.

$$P = \frac{v}{a_0 l_c}$$

Equation III.1 Paramètre d'empilement

Le Tableau III.1 montre les relations entre quelques formes de tensioactifs et les morphologies des agrégats correspondants. Par exemple, les micelles sont formées par des tensioactifs de géométrie conique qui se caractérisent par un $P \approx 1/3$ tandis que les vésicules sont souvent obtenues pour un tensioactif à géométrie de cône tronqué, soit $P \approx 1/2$.

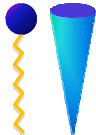


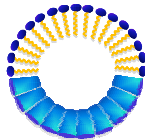
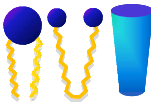
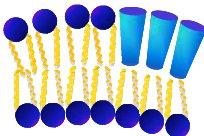
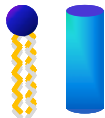
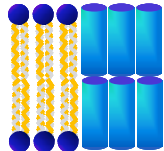
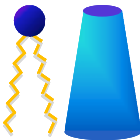
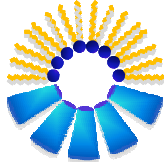
Amphiphile	P	Forme géométrique	Organisation	Phase
<i>Tensioactif monocaténaire à large tête polaire</i>	$P > 1/2$			Micelles directes
<i>Tensioactif monocaténaire type non ionique</i>	$P \approx 1/2$			Micelles globulaires Phase Hexagonale I
<i>Tensioactif bolaforme ou bicaténaire à large tête polaire</i>	$1/2 < P < 1$			Phase lamellaire flexible = vésicules
<i>Tensioactif Bicaténaire</i>	$P \approx 1$			Phase cubique Q_{II} Phase Lamellaire
<i>Tensioactif bicaténaire à tête polaire petite</i>	$P > 1$			Micelles inverses Phase hexagonale II

Tableau III.1 Morphologie des agrégats en fonction de la valeur du paramètre d'empilement des tensioactifs

Dans ce contexte, les tensioactifs cationiques sont obtenus par mélange de deux tensioactifs ioniques de charge opposée⁽³⁾ ou par réaction acide-base.⁽⁴⁻⁸⁾ Il faut rappeler que le modèle thermodynamique d'Israelachvili s'applique à des systèmes covalents. Les systèmes cationiques sont une extension de ce modèle. La paire d'ions agit ainsi comme un tensioactif bicaténaire zwitterionique, qui forme spontanément des vésicules dans l'eau.⁽⁹⁾ En effet, les tensioactifs cationiques montrent des propriétés uniques en solution aqueuse. Ils diminuent ainsi les concentrations à partir desquelles se forment les agrégats par rapport aux concentrations micellaires critiques des tensioactifs individuels. De plus, ils possèdent une activité de surface supérieure à celle des tensioactifs constitutifs.

Ces propriétés résultent des interactions hydrophobes entre les deux chaînes puis de l'interaction électrostatique entre les deux têtes polaires de charge opposée. Ces interactions mènent à la formation de paires d'ions agrégées dont la cohésion est assurée par des interactions hydrophobes stabilisantes entre l'ensemble des chaînes hydrocarbonées au sein de l'agrégat. L'aire par tête polaire de l'association catanionique résultante est fortement réduite ce qui permet de considérer la nouvelle espèce comme un tensioactif avec une petite tête polaire et avec une chaîne hydrophobe volumineuse (Figure III.1).

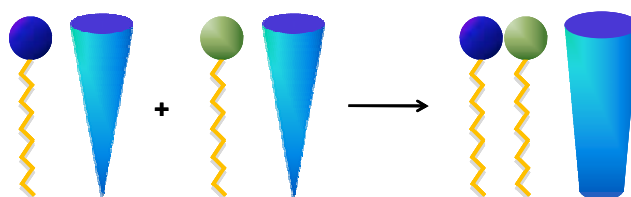


Figure III.1 Evolution du paramètre d'empilement lors de la formation de tensioactifs catanioniques

La modification du paramètre d'empilement des tensioactifs conduit à de nouvelles formes d'agrégats. En effet, les systèmes catanioniques forment spontanément des vésicules^(4, 9) mais ils peuvent aussi former des micelles allongées,^(10, 11) des lamelles,^(12, 13) des nanodisques,⁽⁵⁾ des icosaèdres⁽⁶⁾ ou des mésophases cubiques et hexagonales⁽¹⁴⁾ pour des conditions particulières.

III.2.1 Les tensioactifs catanioniques

Les tensioactifs catanioniques peuvent former spontanément des vésicules dans l'eau.^(9, 15) Cependant, les tensioactifs catanioniques précipitent généralement quand les deux amphiphiles de charge opposée sont mélangés en quantités équimoléculaires.⁽⁹⁾ En effet, l'interaction électrostatique entre les charges conduit à la réduction de la tête polaire et en conséquence à une diminution de l'hydrophilie du système. La diminution de la sphère de solvation provoque des problèmes de solubilisation. Pour cela, les vésicules catanioniques sont généralement formées avec un excès de charge positive ou négative. La variation de la stoechiométrie permet d'obtenir différentes phases comme des vésicules, des lamelles, des micelles ou des régions biphasiques.⁽¹⁶⁾

Nous allons ensuite voir quelques exemples de vésicules obtenues par mélange équimoléculaire de tensioactifs de charge opposée libres de sels résiduels. Cependant, il est nécessaire d'apporter de l'énergie comme les ultrasons pour la solubilisation du tensioactif.

Ainsi, Fukuda *et al.* ont préparé un tensioactif cationique par mélange d'hydroxyde de triméthyl-n-héxadécylammonium avec un équivalent d'acide palmitique (Figure III.2). L'application d'ultrasons sur une solution du tensioactif dans l'eau conduit à la formation de vésicules de diamètres compris entre 20 et 100 nm.⁽¹⁷⁾

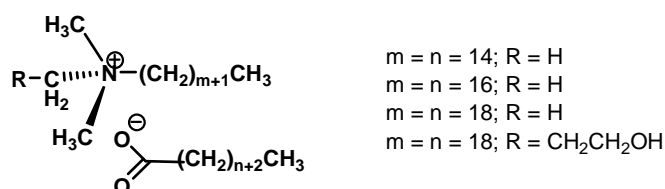


Figure III.2 Structures des tensioactifs cationiques dérivés de l'acide palmitique

Un autre exemple concerne les tensioactifs cationiques synthétisés par Bhattacharya *et al.* pour l'encapsulation de rivoflavine.⁽¹⁸⁾ Ces systèmes consistent en des mélanges de tensioactifs bolaamphiphiles portant deux groupes acides et deux équivalents de CTAOH (Figure III.3).

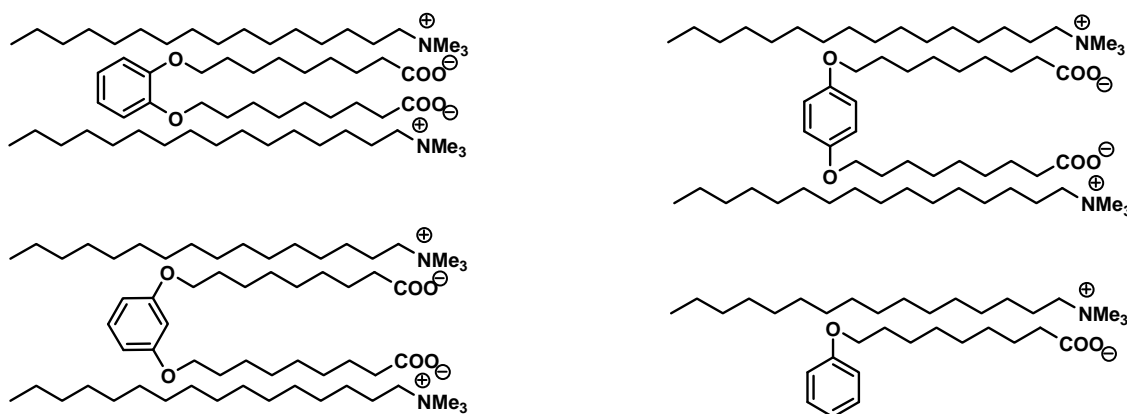


Figure III.3 Structure des tensioactifs cationiques bolaamphiphiles

Les systèmes cationiques avec deux groupes acides carboxyliques forment principalement des vésicules multilamellaires avec des diamètres d'environ 50 nm pour le composé *ortho*, 100 nm pour le composé *meta* et 120 nm pour le composé *para*. Par contre, le composé avec un seul groupe acide forme des vésicules unilamellaires avec un diamètre d'environ 80 nm.

Parmi les mélanges cationiques, les dérivés des sucres présentent de bons avantages car ils sont biodégradables et augmentent la solubilité dans l'eau des mélanges cationiques en conduisant à des systèmes équimolaires solubles dans l'eau sans un excès d'un tensioactif anionique ou cationique.^(4, 19)

En 1997, Menger *et al.*⁽¹⁹⁾ ont obtenu le premier exemple d'un tensioactif catanionique soluble dans l'eau à la stœchiométrie en l'absence de sels résiduels. Ce tensioactif est formé par un amphiphile glycosidique (Figure III.4).

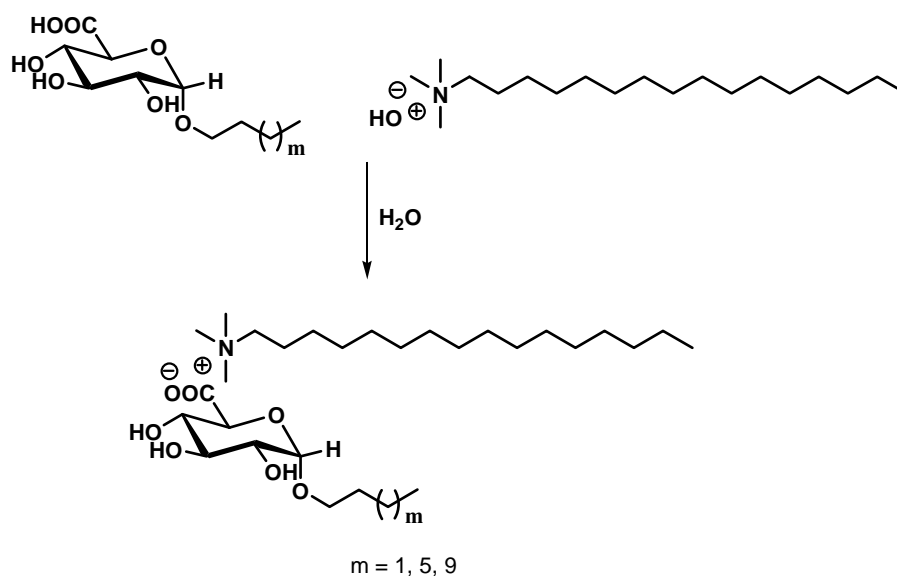


Figure III.4 Structure du premier tensioactif catanionique dérivé d'un sucre

Les études par diffusion de la lumière révèlent que seulement le tensioactif catanionique avec $m = 9$ forme des vésicules de taille très polydispense (30-500 nm).

En 1999, notre groupe de recherche a mis au point la synthèse générale d'amphiphiles catanioniques à partir de carbohydrates non protégés.⁽⁸⁾ Cette méthode de synthèse conduit à l'obtention quantitative d'une grande diversité de tensioactifs catanioniques : bicaténaires, gemini, tricaténaires, bolaformes et dendrimères (Figure III.5 et III.7)^(4, 8, 20-24) qui forment une grande variété de microstructures (micelles, vésicules spontanées, phases lamellaires, ...).^(25, 26)

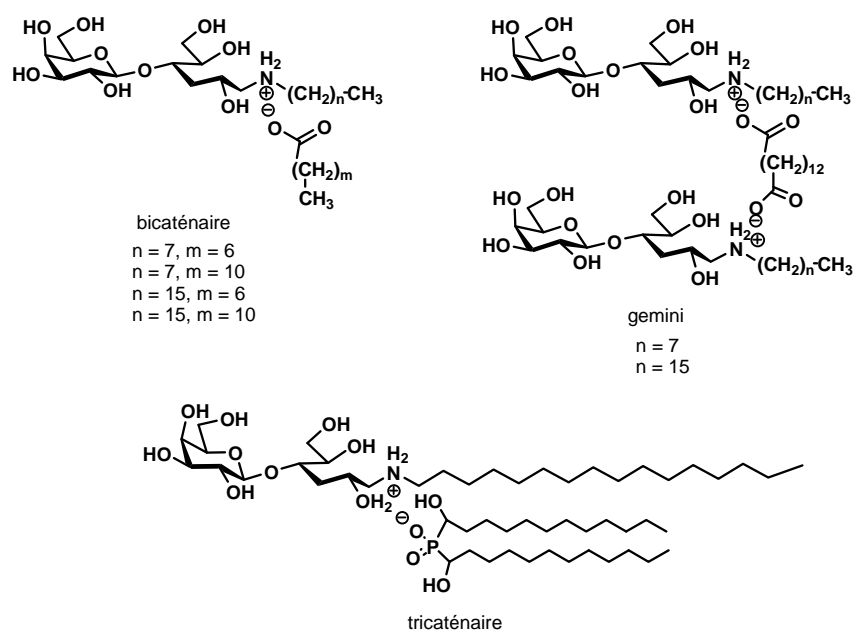


Figure III.5 Structures des analogues cationiques du GalCer, bicaténaires et geminis

Les tensioactifs cationiques^(4, 6, 27-29) forment spontanément des auto-assemblages en milieu aqueux. Ces structures macroscopiques et microscopiques ont été élucidées par cryofracture à des concentrations supérieures à leurs CAC.⁽²²⁾ Les composés bicaténaires forment des vésicules unilamellaires, dont la bicouche est fracturable. Cependant une organisation différente est constatée pour les composés gemini (Figure III.6).

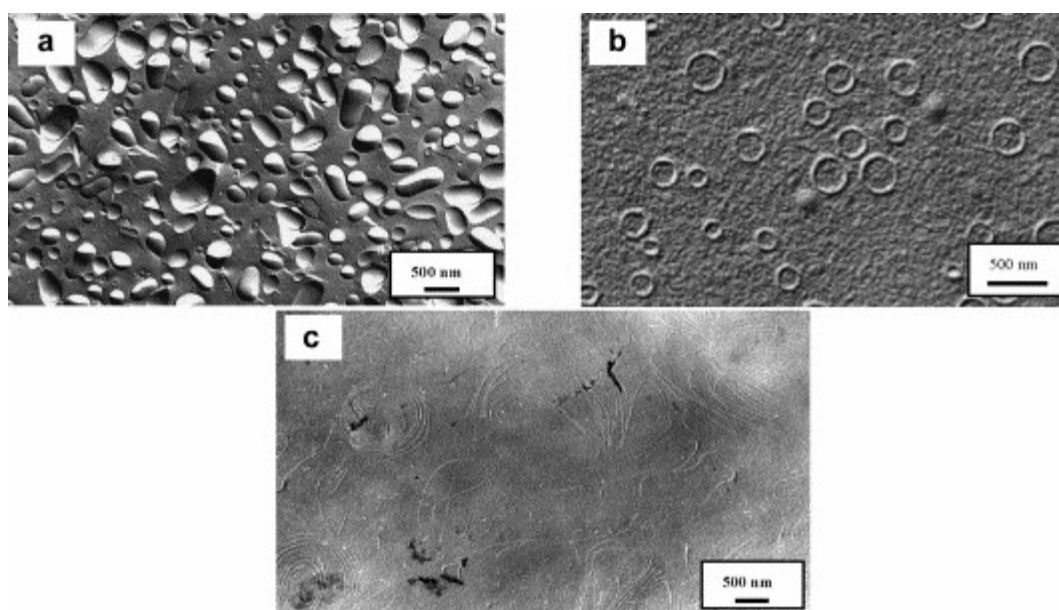


Figure III.6 Clichés de cryofracture des composés cationiques dérivés du GalCer. (a) composé bicaténaire, (b) composé gemini $n = 7$, (c) composé gemini $n = 15$

Le composé gemini avec $n = 7$ forme des vésicules tandis que son analogue avec $n = 15$ forme essentiellement des lamelles ($P \approx 1$). Ces deux composés montrent différents types d'agrégats. L'absence d'un plan fracturable dans la membrane donne des indications sur l'arrangement de l'espaceur gemini dans la bicouche. En effet, l'espaceur alkyle des analogues gemini peut être replié ou étiré.^(30, 31) Les images obtenues par cryofracture des amphiphiles gemini suggèrent que les tensioactifs geminis sont arrangés avec un espaceur étiré et qu'ils forment une membrane monocouche en évitant ainsi sa fracture (Figure III.6). De plus, un mélange partiel des deux arrangements est possible (espaceur replié et étiré). En effet, les défauts générés par la présence des espaceurs repliés dans l'organisation transmembranaire peuvent expliquer la courbure de la monocouche pour former des vésicules dans le cas du gemini à $n = 7$.

D'autre part, deux familles de dendrimères (à cœur trifonctionnel et à cœur hexafonctionnel) ont été préparées (Figure III.7).^(23, 32)

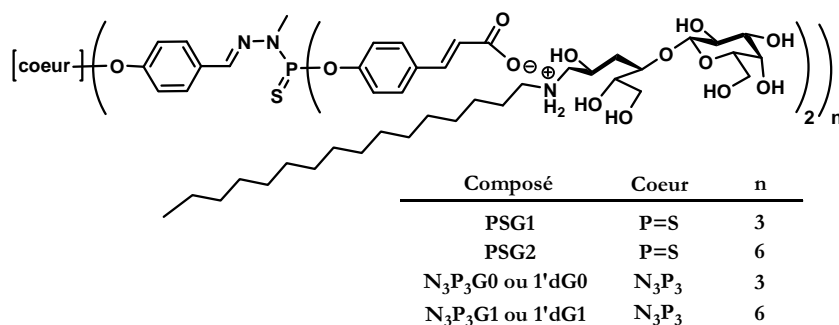
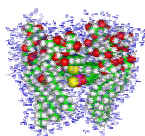


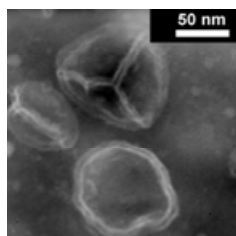
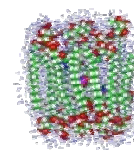
Figure III.7 Structure des premiers dendrimères catanioniques analogues du GalCer

Ces dendrimères en solution montrent la formation spontanée de vésicules par étude de diffusion de la lumière, par MET et par cryofracture (Figure III.8).

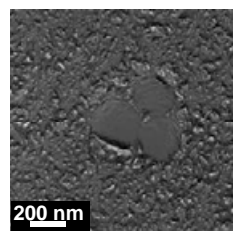
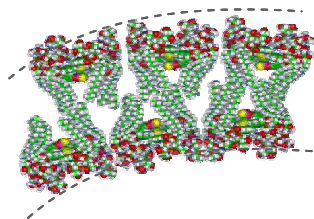
(A) Modèle Moléculaire
du dendrimère à cœur
trifonctionnel:
Surface en forme de
Chou-fleur



(B) Modèle Moléculaire
du dendrimère à cœur
hexafonctionnel:
Surface cylindrique



MET



Cryo fracture

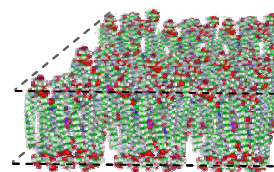


Figure III.8 Différentes structures adoptées par les dendrimères phosphorés en fonction de leur cœur. (A) Le cœur trifonctionnel adopte une structure en forme de chou-fleur : Formation d'une bicouche qui conduit à des vésicules spontanées. (B) Le cœur hexafonctionnel adopte une structure cylindrique : Formation d'une monocouche. Des défauts dans la monocouche permettent la formation de vésicules

Comme nous l'avons déjà vu dans le Chapitre II (c.f. II-2), la forte dépendance de l'activité de ces dendrimères en fonction de leur cœur ainsi que les modèles moléculaires et les expériences de cryofracture révèlent que les dendrimères à cœur trifonctionnel adoptent une structure en forme de chou-fleur qui leur permet de s'organiser en vésicules ($P < 1$) où la bicouche est fracturable, ce qui est en accord avec leur arrangement en chou-fleur. Dans cette structure, les chaînes alkyles s'arrangent autour du squelette dendritique lipophile avec une certaine mobilité qui permet la disposition interdigitée des chaînes dans le dendrimère qui conduit à la formation spontanée de vésicules. Par contre, les dendrimères phosphorés à cœur hexafonctionnel adoptent une structure différente. L'analyse des expériences de cryofracture montre une bicouche non fracturable, ce qui indique une structure plus cylindrique pour ces dendrimères. Dans ce cas, les dendrimères s'organisent en monocouche avec les parties hydrophiles de part et d'autre de la monocouche et les parties hydrophobes à l'intérieur. Les défauts dans la couche permettent la formation spontanée de vésicules.

Comme nous l'avons vu précédemment (c.f. Chapitre I), les composés géminis qui adoptent une structure cylindrique ($P \approx 1$) montrent une cytotoxicité plus faible probablement grâce à leur faible interaction avec les membranes. Cependant, dans le cas des dendrimères à cœur hexafonctionnel, la toxicité reste élevée malgré leur arrangement plus cylindrique comme celui adopté par le composé gemini.

Afin de vérifier l'éventuelle désorganisation des membranes cellulaires, C. Bololoi⁽³³⁾ a mené, lors de sa thèse, des études d'incorporation des dendrimères α -alkylphosphonate **4d-G1** (chaîne alkyle latérale à 3 atomes de carbone) et **5d-G1** (chaîne alkyle latérale à 10 atomes de carbone) dans un modèle membranaire. L'analyse des spectres IRRAS a permis d'observer que ces dendrimères catanioniques ne perturbent pas l'organisation des chaînes alkyles de la DPPC. En conséquence, les résultats de cette étude sur les monocouches de DPPC montrent que la cytotoxicité de ces dendrimères n'est liée ni à leur hydrophobie ni à leur incorporation dans la membrane plasmique (résultats non publiés).

Pour ces raisons, nous voulons déterminer et évaluer les propriétés physico-chimiques de ces dérivés catanioniques afin d'identifier l'origine de leur toxicité. Pour cela, il est fondamental de savoir s'ils sont toxiques à l'état isolé ou bien l'état agrégé.

L'étude physicochimique sur les propriétés auto-associatives de ces systèmes est l'objet de ce chapitre afin de corrélérer structure, activité et propriétés physicochimiques.

III.3 Agrégation dans l'eau des dérivés catanioniques dendritiques et de leurs précurseurs

L'étude physicochimique vise à déterminer les concentrations d'agrégation critiques (CAC), la forme et la taille des objets formés en solution dans l'eau des dendrimères sel de sodium **Nc-G1** ($N = 1 - 5$) et de leurs analogues catanioniques **Nd-G1** ($N = 1 - 5$).

III.3.1 Sels de sodium des dendrimères PPH à terminaisons acide

Les tensioactifs amphiphiles ioniques dendritiques ont été étudiés par tensiométrie en solution aqueuse afin de déterminer les concentrations d'agrégation critiques, les propriétés tensioactives et le comportement d'adsorption à l'interface eau-air. Pour cela, les mesures de tension de surface ont été réalisées à température ambiante par la méthode de la goutte pendante avec des solutions à différentes concentrations de ces composés dendritiques, obtenues par dilution.

Une autre méthode plus consommatrice de composé est la méthode de l'anneau selon Du Noüy. Les deux méthodes ont été comparées et on constate que les valeurs de CAC et de la tension superficielle sont sensiblement les mêmes pour les deux techniques (c.f. III.3.2.1).

III.3.1.1 Concentration d'agrégation critique

III.3.1.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface

Tout d'abord nous nous sommes intéressés à l'effet de la nature de la fonction acide sur les propriétés tensioactives de ces composés. L'étude par tensiométrie de ces composés dendritiques révèle qu'ils sont capables de réduire la tension superficielle de l'eau de façon très différente (Figure III.9). L'allure de la variation de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration en tensioactif anionique présente une rupture de pente qui est associée à une organisation du tensioactif dans l'eau.

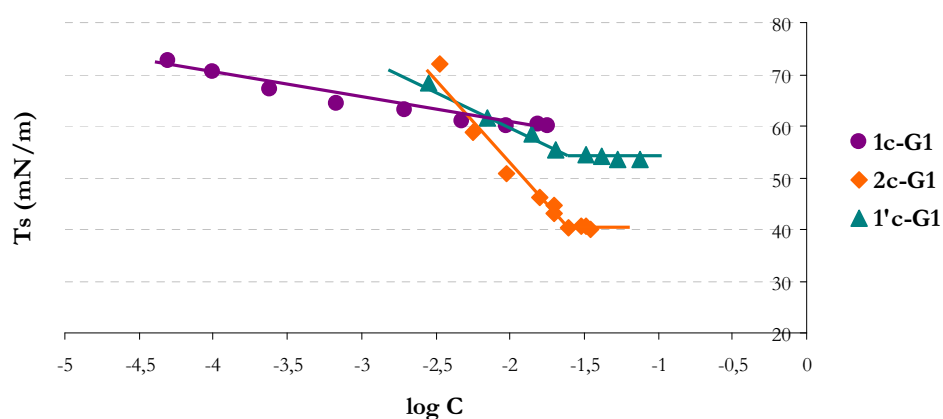


Figure III.9 Courbes de variation de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration des sels de sodium des dendrimères PPH à terminaisons acide phosphonique, **1c-G1**, **2c-G1** et terminaisons acide carboxylique **1'c-G1** à 25°C dans l'eau

Composé	CAC (mM)	Tension de surface sur le palier (mN/m)
1c-G1	-	62,2
1'c-G1	23,8	54,5
2c-G1	23,2	40,4

Tableau III.2 Valeurs de CAC et Ts pour les dendrimères anioniques **1c-G1**, **1'c-G1** et **2c-G1**

Les valeurs des concentrations d'agrégation critiques et des tensions superficielles mesurées par tensiométrie dans l'eau à 25 °C pour les dendrimères sont réunies dans le Tableau III.2.

Ainsi, quand nous comparons les composés **1c-G1** et **1'c-G1** avec le même type de branche de dendrimère et différentes fonctions superficielles, respectivement phosphonate et carboxylate, nous constatons que **1c-G1** n'a pas de propriétés tensioactives (abaissement de la tension de surface

supérieure à 60 mN/m). Par contre, **1c-G1** possède des propriétés tensioactives. Cela est traduit par un abaissement de la tension superficielle et l'apparition d'un point de rupture dans la courbe de la tension superficielle en fonction de la concentration qui donne la valeur de la CAC. Ces différences importantes entre ces deux dendrimères peuvent trouver leurs origines dans la nature de la fonction de surface. En effet, la présence du groupe phosphonate, PO(OH)(ONa) peut favoriser la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre des groupes terminaux appartenant à des dendrimères différents. C'est-à-dire, le dendrimère **1c-G1** pourrait subir une perte d'hydrophilie à cause de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires et donc une perte de caractère amphiphile, ce qui ne devrait pas avoir lieu dans le cas de **1c-G1** à terminaisons carboxylate.⁽³⁴⁾

Lorsque nous comparons les composés **1c-G1** et **2c-G1** avec le même acide phosphonique en surface, PO(OH)(ONa), **2c-G1** possède aussi des propriétés tensioactives, il diminue la tension superficielle à 40 mN/m bien qu'il ait la même fonction de surface que **1c-G1**. Nous pouvons supposer que dans le cas de **2c-G1**, il ne forme pas de liaisons hydrogène intermoléculaires ou bien que la présence de la fonction hydroxyle suffit à compenser la perte d'hydrophilie de la tête. En conséquence, il ne subit pas une perte du caractère amphiphile.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'infrarouge en faisant varier la concentration des solutions aqueuses de **1c-G1** et de **2c-G1** car les liaisons hydrogène intermoléculaires doivent disparaître par dilution.⁽³⁴⁾ Ainsi, par spectroscopie IR, la bande d'élongation caractéristique de la liaison P=O à 25 °C, à 985 cm⁻¹ est déplacée à 1020 cm⁻¹ quand on dilue le composé **1c-G1** (Figure III.10). Cela peut indiquer que la liaison P=O n'est plus engagée dans des liaisons hydrogène intermoléculaires. Par contre, cet effet n'est pas constaté quand on dilue les solutions de **2c-G1** à des concentrations inférieures à sa CAC, la bande d'élongation reste à 960 cm⁻¹, ce qui indique que ce composé forme des liaisons hydrogène qui sont ici intramoléculaires, lesquelles ne sont pas altérées par dilution (Figure III.11). Ces résultats mettent en évidence la présence des liaisons hydrogène intermoléculaires pour le dendrimère **1c-G1** tandis que le composé **2c-G1** forme des liaisons hydrogène intramoléculaires.

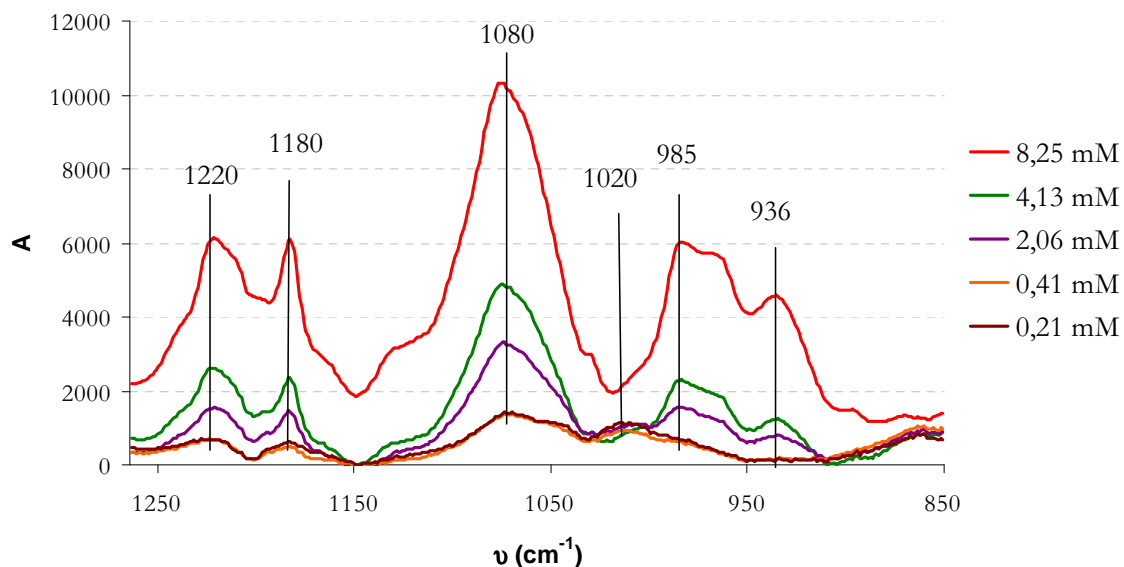


Figure III.10 Spectres d'infrarouge à différentes concentrations de **1c-G1** dans l'eau

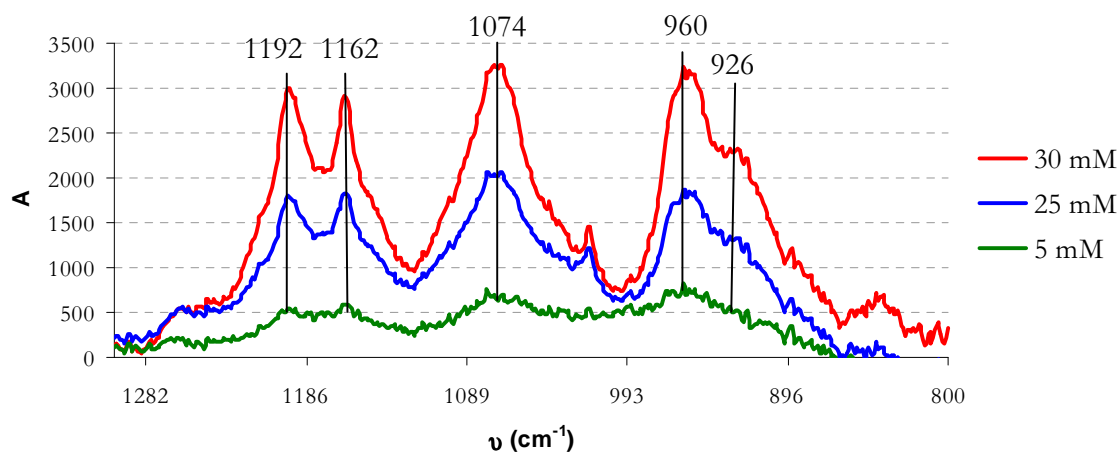


Figure III.11 Spectres d'infrarouge à différentes concentrations de **2c-G1** dans l'eau

On peut conclure que le caractère tensioactif vient de la différence de polarité entre la tête polaire et la queue hydrophobe. Dans notre cas, la faible polarité de la fonction PO(OH)(ONa) de **1c-G1** à cause de la présence des liaisons hydrogène intermoléculaires explique le faible caractère tensioactif. Cependant l'augmentation de la polarité par introduction d'un groupe hydroxyle sur le dendrimère **2c-G1** augmente le caractère amphiphile de la molécule, ce qui se traduit par un caractère tensioactif plus marqué.

III.3.1.1.2 Influence de la nature de la branche terminale

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à l'influence de la chaîne alkyle sur les propriétés tensioactives. Les résultats de ces mesures tensiométriques montrent que ces dérivés dendritiques présentent des propriétés tensioactives car ils abaissent la tension de surface de la solution aqueuse (Figure III.12).

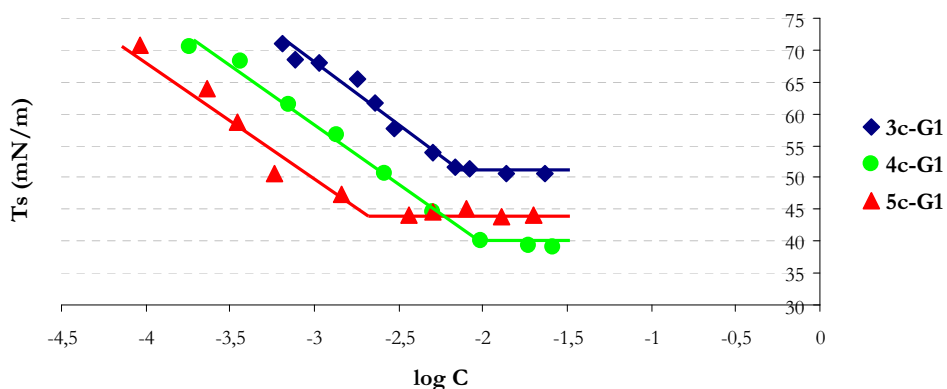


Figure III.12 Courbes de variation de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration des sels de sodium des dendrimères PPH à terminaisons acide α -alkylephosphonique, **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1** à 25°C dans l'eau

Composé	CAC (mM)	Tension de surface sur le palier (mN/m)
3c-G1	7,5	51,4
4c-G1	9,6	40,1
5c-G1	1,6	44,6

Tableau III.3 Valeurs de CMC et Ts pour les dendrimères anioniques **3c-G1**, **4c-G1** et **5c-G1**

Si on compare les trois dendrimères, ils ont un comportement non linéaire que ce soit au niveau de la CAC ou de la tension superficielle. On attend qu'une augmentation du caractère hydrophobe entraîne une diminution des valeurs de CAC et de tension superficielle. En effet, le tensioactif **4c-G1** possède une CAC à peu près égale à celle de **3c-G1** qui est pourtant moins hydrophobe mais surtout a une tension superficielle au palier de 40 mN/m, qui est légèrement inférieure à celle du dendrimère **5c-G1** qui est plus hydrophobe (Tableau III.3). Ceci peut s'expliquer par la présence de la chaîne C3 à l'extérieur du squelette dendritique qui peut perturber la surface du dendrimère. Il est en conséquence plus fortement présent à l'interface eau-air, abaissant ainsi plus la tension superficielle. Ce comportement a pu être partiellement rationalisé par des expériences de RMN 2D ^1H - ^1H -NOESY (c.f. II.3.5.6). L'analyse par RMN 2D montre que ces dendrimères dans l'eau possèdent des ségrégations entre leurs domaines lipophiles et hydrophiles qui impliquent que les

chaînes alkyles latérales interagissent avec les domaines lipophiles de la structure du dendrimère. Dans le cas de **5c-G1**, on constate la présence de fortes interactions entre les chaînes alkyl C10 et l'intérieur de la structure du dendrimère PPH, alors que l'interaction entre les chaînes alkyle C3 de **4c-G1** avec l'intérieur du dendrimère est plus faible, ce qui peut expliquer que cette chaîne en C3 puisse perturber la surface du dendrimère.

III.3.1.2 Taille et forme des objets

L'étude de la distribution de la taille par diffusion quasi élastique de la lumière et l'observation de ces dendrimères par microscopie électronique à des concentrations supérieures aux CAC correspondant ne révèlent rien de significatif. Ces composés forment probablement des micelles dans l'eau. Pour vérifier ce fait, nous devons faire des expériences de SANS (small-angle neutron scattering). D'autre part, la mesure des coefficients de diffusion par RMN à gradients de champs pulsés à des concentrations faibles n'apporte pas d'informations. En effet, cette technique aurait nécessité de travailler à forte concentration (au moins 10 à 50 fois la CAC) ce qui n'a pas pu être réalisé par manque de produit.

III.3.2 Dendrimères PPH cationiques

III.3.2.1 Concentration d'agrégation critique

Les tensioactifs dendrimères cationiques ont été étudiés par tensiométrie en solution afin de déterminer les concentrations d'agrégation critiques (CAC), les propriétés tensioactives et le comportement d'adsorption aux interfaces. Dans ce cas, les mesures de tension de surface ont été réalisées à 25°C par la méthode de l'anneau selon Du Noüy avec des solutions de composés dendritiques à différentes concentrations obtenues par dilution. Nous avons changé la méthode de mesure car celle de la goutte pendante n'est pas adaptée pour la mesure de la tension superficielle des composés cationiques. Ces derniers s'adsorbent sur l'aiguille utilisée pour former la goutte. En conséquence, la mesure ne peut pas être réalisée correctement.

Tout d'abord, nous avons validé la méthode par mesure de la tension de surface du composé sel de sodium **2c-G1** (Figure III.13).

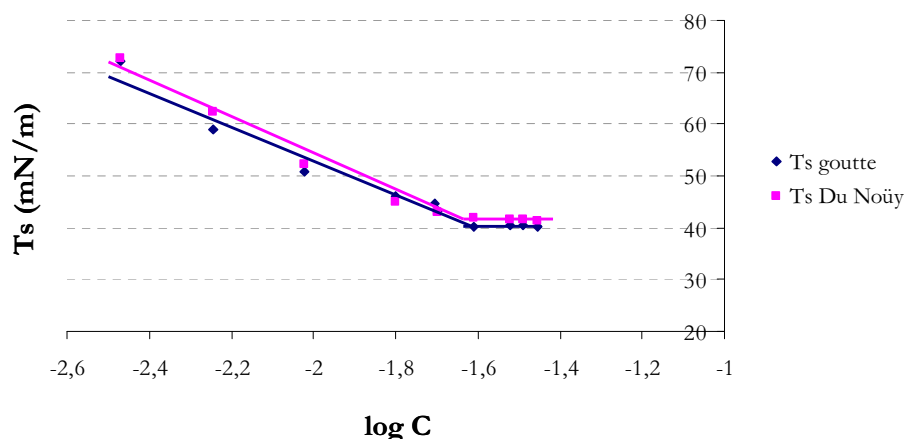


Figure III.13 Validation de la méthode Du Noüy en utilisant le composé **2c-G1**

Nous constatons qu'on retrouve sensiblement les mêmes valeurs de CAC et de la tension superficielle en employant les deux méthodes. Nous pouvons donc continuer le reste de l'étude des dendrimères catanioniques par la méthode Du Noüy.

III.3.2.1.1 Influence de la nature de la fonction acide de surface

Tout d'abord nous nous sommes intéressés, comme dans le cas des sels de sodium, à l'influence de la nature de la fonction acide de surface. Pour cela, nous avons mesuré les concentrations d'agrégation critiques des dendrimères catanioniques **1d-G1**, **1'd-G1**, **2d-G1** ainsi que celle de l'aminolactitol **L16** par tensiométrie dans l'eau à 25°C (Figure III.14).

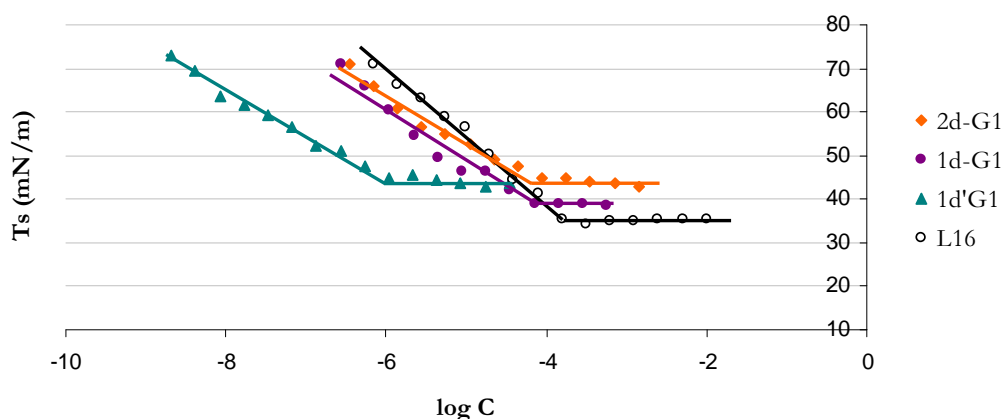


Figure III.14 Concentration d'agrégation critique des dendrimères catanioniques **1d-G1**, **1'd-G1**, **2d-G1** et **L16**

Composé	CAC (μM)	Ts sur le palier (mN/m)
1d-G1	42,7	38,9
1'd-G1	0,7	45,6
2d-G1	60,1	45,2
L16	89,1	36,8
1c-G1	-	62,2
1'c-G1	23800	54,5
2c-G1	23200	40,4

Tableau III.4 Valeurs des CAC, des Ts pour les dérivés catanioniques : **1d-G1**, **1'd-G1**, **2d-G1**, l'aminolactitol **L16** et les précurseurs anioniques **1c-G1**, **1'c-G1** et **2c-G2**

Dans un premier temps, nous avons comparé les dérivés catanioniques avec leurs précurseurs anioniques. Nous constatons que les dérivés catanioniques présentent tous un caractère tensioactif plus marqué. D'autre part, si l'on s'intéresse aux dendrimères **1'd-G1** et **2d-G1**, on peut voir qu'ils abaissent la tension superficielle de façon similaire (Tableau III.4). Au niveau de la CAC nous constatons le comportement classique. Le dendrimère le plus hydrophile **2d-G1** présente une CAC plus élevée que celle de **1'd-G1**, plus hydrophobe. Lorsque nous les comparons avec le vinylphosphonate **1d-G1**, ce dernier a un comportement différent. En effet, le vinylphosphonate **1d-G1** diminue plus la tension de surface. Cependant nous avons vu que son précurseur anionique **1c-G1** subit une perte de caractère tensioactif à cause d'une perte de polarité par formation de liaisons hydrogène intermoléculaires. En effet, le dendrimère **1d-G1** présente une activité de surface proche de celle de l'aminolactitol **L16**. Dans ce cas particulier, on peut donc penser que l'abaissement de la tension superficielle n'est pas provoqué par l'effet synergique des deux parties constitutives de l'entité catanionique si non par la présence de l'aminolactitol qui a des propriétés tensioactives.

III.3.2.1.2 Influence de la chaîne alkyle latérale

Ensuite, nous avons étudié les propriétés tensioactives pour la même famille de α -alkylphosphonate catanionique pour comparer l'effet de la chaîne alkyle latérale. On a obtenu à 25°C, les courbes Ts vs log C suivantes (Figure III.15).

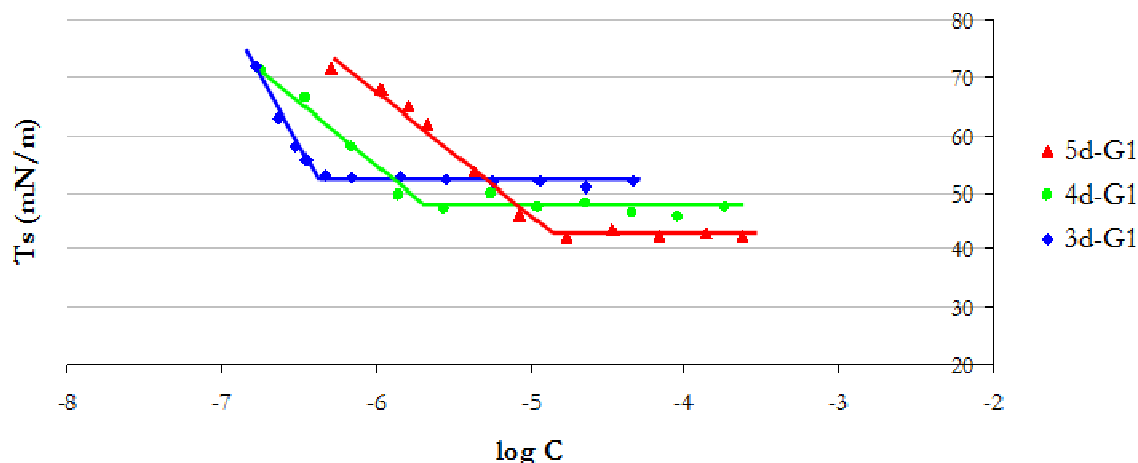


Figure III.15 Concentration d'agrégation critique des dérivés α -alkylphosphonate catanioniques

Nous avons donc répertorié dans le Tableau III.5 les concentrations à partir desquelles les différents dérivés dendritiques s'organisent en solution aqueuse.

Composé	CAC (μM)	Ts sur le palier (mN/m)
3d-G1	0,38	52,8
4d-G1	1,75	47,6
5d-G1	13,9	42,6

Tableau III.5 Valeurs des CAC et des Ts pour les dérivés catanioniques : **3d-G1**, **4d-G1**, et **5d-G1**

Toutes les associations de cette famille présentent une activité à la surface eau-air, à peu près similaire. Par contre, nous trouvons un comportement surprenant au niveau de la CAC. Plus le dendrimère est hydrophobe, plus sa CAC est élevée. Ce comportement peu classique peut éventuellement s'expliquer par une différence dans le mode d'agrégation. En effet, nous avons observé lors de la réalisation des mesures de tensiométrie, que les composés **3d-G1** et **4d-G1** forment des solutions mères dans l'eau très visqueuses contrairement à **5d-G1**. Nous pouvons supposer que la façon de préparer les échantillons pour la mesure de la tension superficielle a pu fausser les résultats. En effet, nous avons préparé les échantillons par dilution successive à partir d'un liquide visqueux. Le réseau probablement stable à la dilution peut en effet perdurer. Cela nous amène à des concentrations de CAC plus basses pour les composés **3d-G1** et **4d-G1** que pour le composé **5d-G1** qui est plus hydrophobe mais par contre sa solution mère n'est pas visqueuse. Les études par microscopie et par cryofracture pourront nous éclairer si cette hypothèse est vérifiée. Une autre

façon de valider notre hypothèse est de réaliser des expériences de tensiométrie par pesée mais cette technique est très consommatrice de produit.

III.3.2.2 Corrélation des propriétés d'agrégations et des propriétés biologiques des cationiques Nd-G1

Les résultats obtenus par ces mesures de tensiométrie permettent de corréler les propriétés d'agrégations (CAC) et les propriétés biologiques (CI_{50} et CC_{50}) de ces dendrimères cationiques. Mais tout d'abord nous devons vérifier que le comportement de ces dendrimères dans l'eau est similaire à celui qu'ils peuvent présenter dans le milieu biologique. Pour cela, nous avons testé deux produits pour vérifier qu'ils ont la même tendance dans l'eau que dans une solution de PBS 0,15M, dont la force ionique est la même que celle utilisée lors des tests biologiques (Figure III.16).

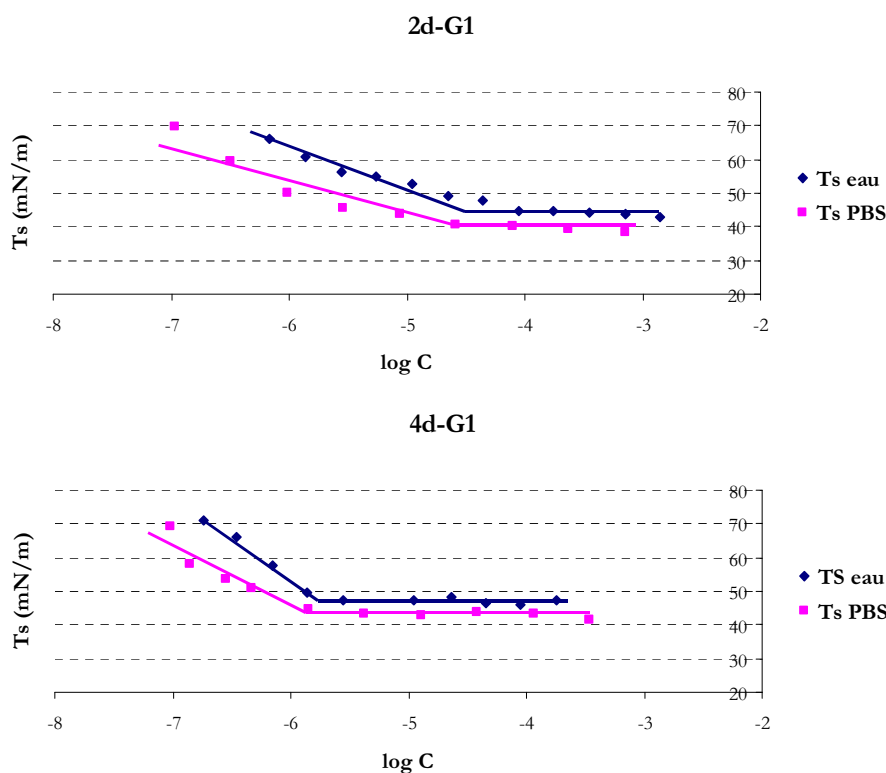


Figure III.16 Courbes de la tension superficielle en fonction de la concentration de **2d-G1** de **4d-G1** dans l'eau et dans une solution de PBS 0,15M

Composé	CAC (μ M) eau	CAC (μ M) PBS	Ts (mN/m) eau	Ts (mN/m) PBS
2d-G1	60,1	11,7	45,2	41,7
4d-G1	1,75	0,54	47,8	45,6

Tableau III.6 Valeurs de CAC et Ts des composés **2d-G1** et **4d-G1** dans l'eau et dans une solution de PBS

Effectivement, si on compare dans les deux cas, **2d-G1** et **4d-G1**, il y a un léger effet de « salting out ». Cet effet est classique en présence de sels, pour des tensioactifs chargés, mais peu marqué ici avec des tensioactifs catanioniques. Nous pouvons donc utiliser les données de CAC obtenues dans l'eau pour corrélérer les propriétés biologiques mais ceci bien sûr avec une certaine précaution.

Ces dendrimères catanioniques possèdent de bonnes activités (CI_{50}) avec une cytotoxicité (CC_{50}) non négligeable (Tableau III.7). Il est donc important de comprendre l'origine d'une telle toxicité *in vitro*.

Composé	CI_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	CAC (μM) dans l'eau
1d-G1	0,25	1,6	42,7
2d-G1	0,21	1,2	60,1
3d-G1	0,40	1,9	0,38
4d-G1	0,33	1,5	1,75
5d-G1	0,31	6,1	13,9

Tableau III.7 Valeurs de l'activité anti-VIH, de la toxicité dans le milieu de culture et de la CAC dans l'eau des dérivés catanioniques

Ces résultats tendent à montrer que les associations dendritiques sont actives à l'état non agrégé, car les CI_{50} sont inférieures à leurs CAC à l'exception du dendrimère **3d-G1** dont les valeurs de CAC et de CI_{50} sont similaires (respectivement 0,38 et 0,40 μM). Il faut souligner que pour ce composé la CAC peut être faussée par la dilution d'une solution mère très visqueuse.

En ce qui concerne leur toxicité, nous pouvons remarquer de manière générale, que les dendrimères sont toxiques à l'état non agrégé car leurs CC_{50} sont inférieures à leurs CAC sauf pour les dendrimères **3d-G1** et **4d-G1** (Figure III.17). Cela indique que ces composés deviennent toxiques à des concentrations avoisinant leurs concentrations d'agrégation critique mais il faut rappeler que la CAC déterminée pour ces deux composés peut être faussée par le mode de préparation des échantillons.

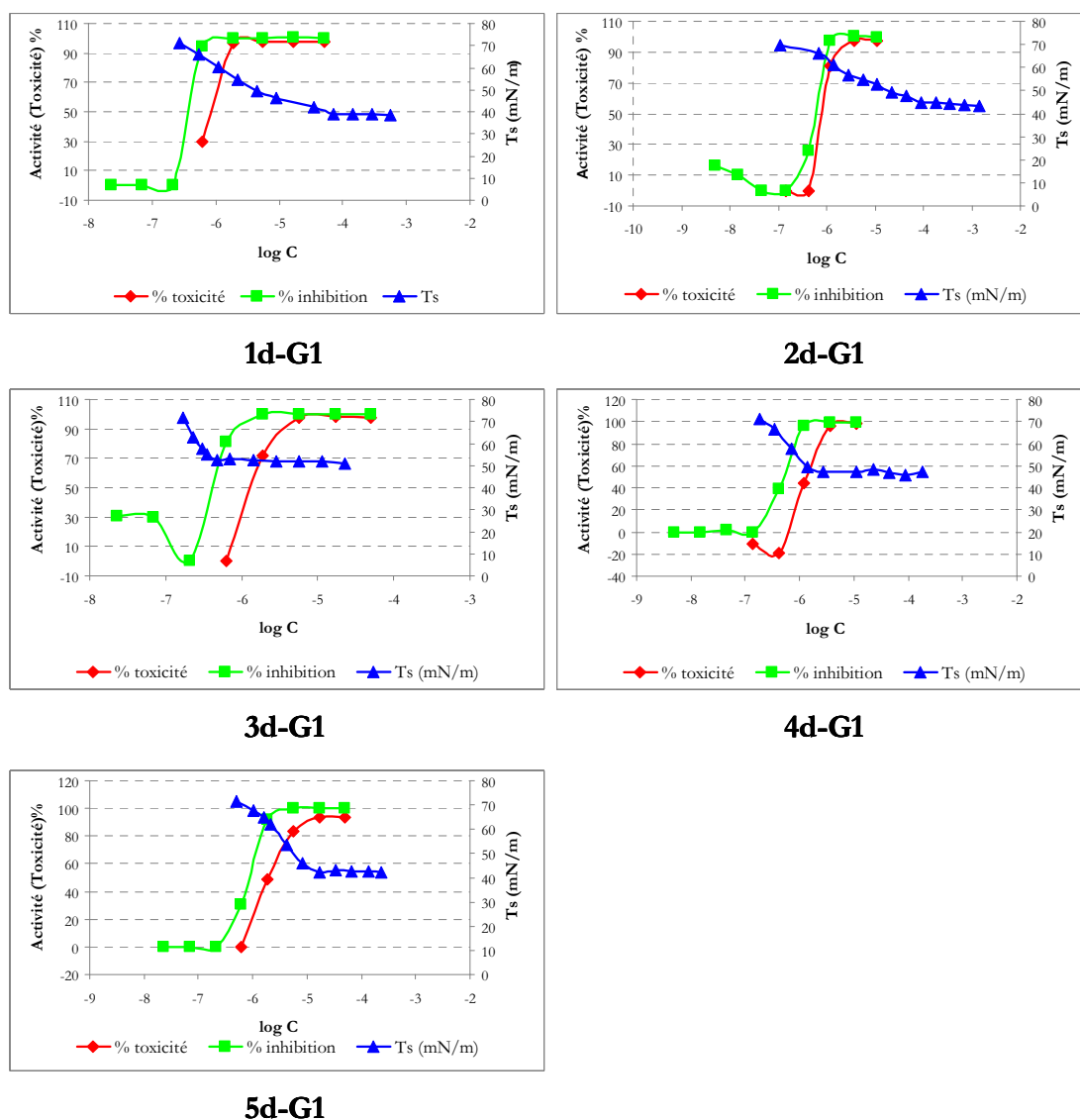


Figure III.17 Corrélation des propriétés biologiques et des propriétés d'agrégation

Ces résultats indiquent que le phénomène d'agrégation ne joue pas un rôle déterminant sur la cytotoxicité de ces analogues catanioniques dendritiques car ils présentent déjà une toxicité à l'état non agrégé. Nous pouvons donc envisager que l'origine de la toxicité cellulaire de ces associations catanioniques dendritiques est liée à une dissociation partielle de la paire d'ions en milieu biologique. Nous allons essayer de rationaliser et quantifier la dissociation de la paire d'ions dans le Chapitre IV.

III.3.2.3 Taille et forme des objets

Pour déterminer la taille et la forme des objets qui forment ces composés dendritiques catanioniques, des mesures de diffusion de la lumière, de microscopie électronique et de cryofracture ont été réalisées.

III.3.2.3.1 Etude de la distribution de la taille des agrégats

L'étude par diffusion de la lumière de ces produits en solution dans l'eau montre la présence d'objets pour des concentrations supérieures à leur CAC (Figure III.18 et III.19).

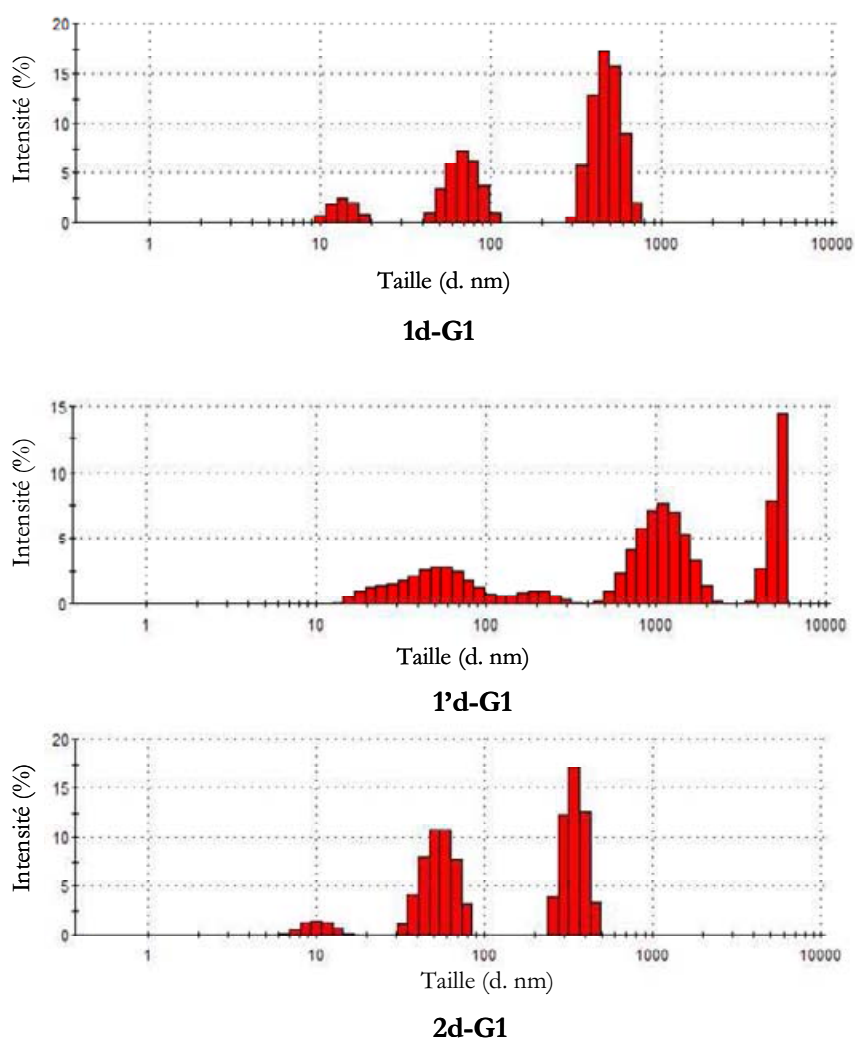


Figure III.18 Distribution de taille des objets formés par **1d-G1**, **1'd-G1** et **2d-G1** par diffusion dynamique de la lumière à 25°C

Nous constatons que les composés **1d-G1**, **1'd-G1** et **2d-G1** ont des distributions de taille très polydisperses. Ces composés forment des objets de différentes tailles, allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres, quel que soit le composé (Figure III.18).

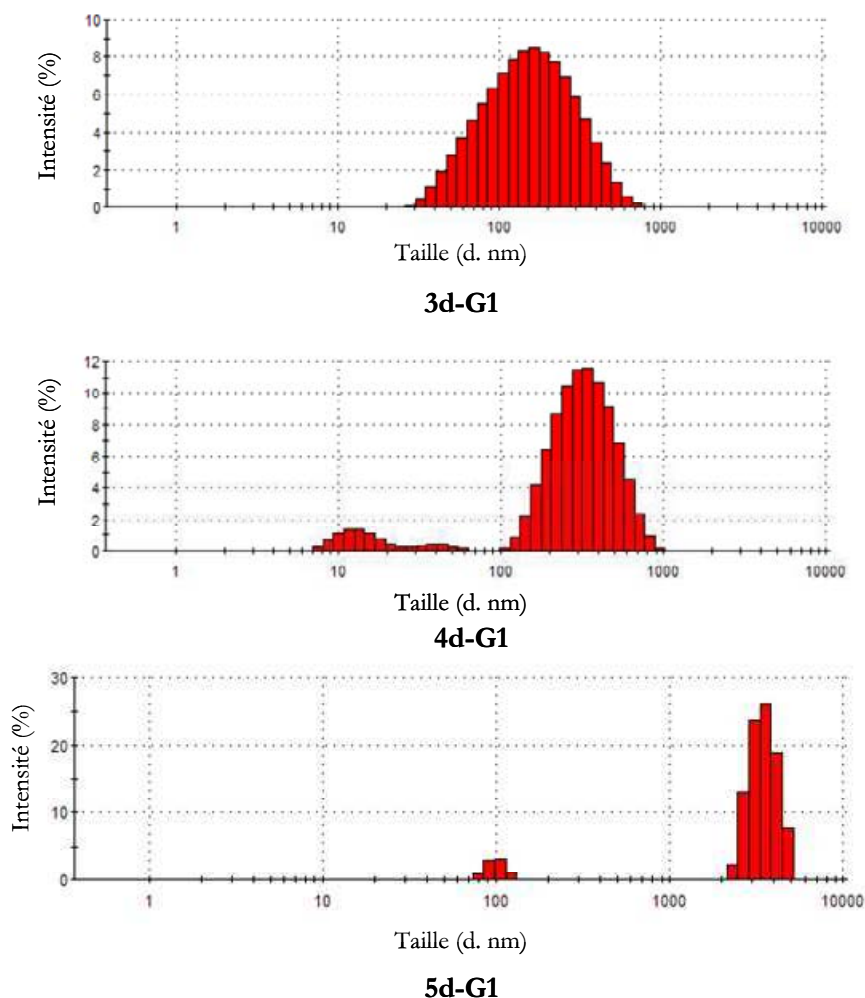


Figure III.19 Distribution de taille des objets formés par **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1** par diffusion dynamique de la lumière à 25°C

Par contre, la série de dendrimères α -alkylphosphonate présente des distributions qui sont moins polydisperses (Figure III.19). Ainsi, on trouve une seule population d'objets pour le **3d-G1** centrée sur 200 nm. Dans le cas de **4d-G1** et **5d-G1**, nous trouvons deux populations centrées respectivement à 40 et 350 nm pour le **4d-G1** et à 100 et 3500 nm pour le **5d-G1**. Mais la différence de taille des objets de cette famille suggère que la présence et la longueur de la chaîne alkyle greffée sur le dendrimer confèrent probablement aux objets formés une organisation interne différente.

III.3.2.3.2 Etude par microscopie électronique

Afin de déterminer la forme et la nature des objets formés par ces composés catanioniques, nous avons réalisé des expériences de microscopie électronique à transmission (MET) de solutions aqueuses des associations catanioniques. Pour notre système, la MET nécessite l'emploi d'un agent de contraste : le phosphotungstate de sodium. Sa forte polarité le rend affiné pour les régions polaires, et permet de révéler ces dernières. Les solutions observées ont été préparées à concentrations supérieures à leur CAC (Figure III.20).

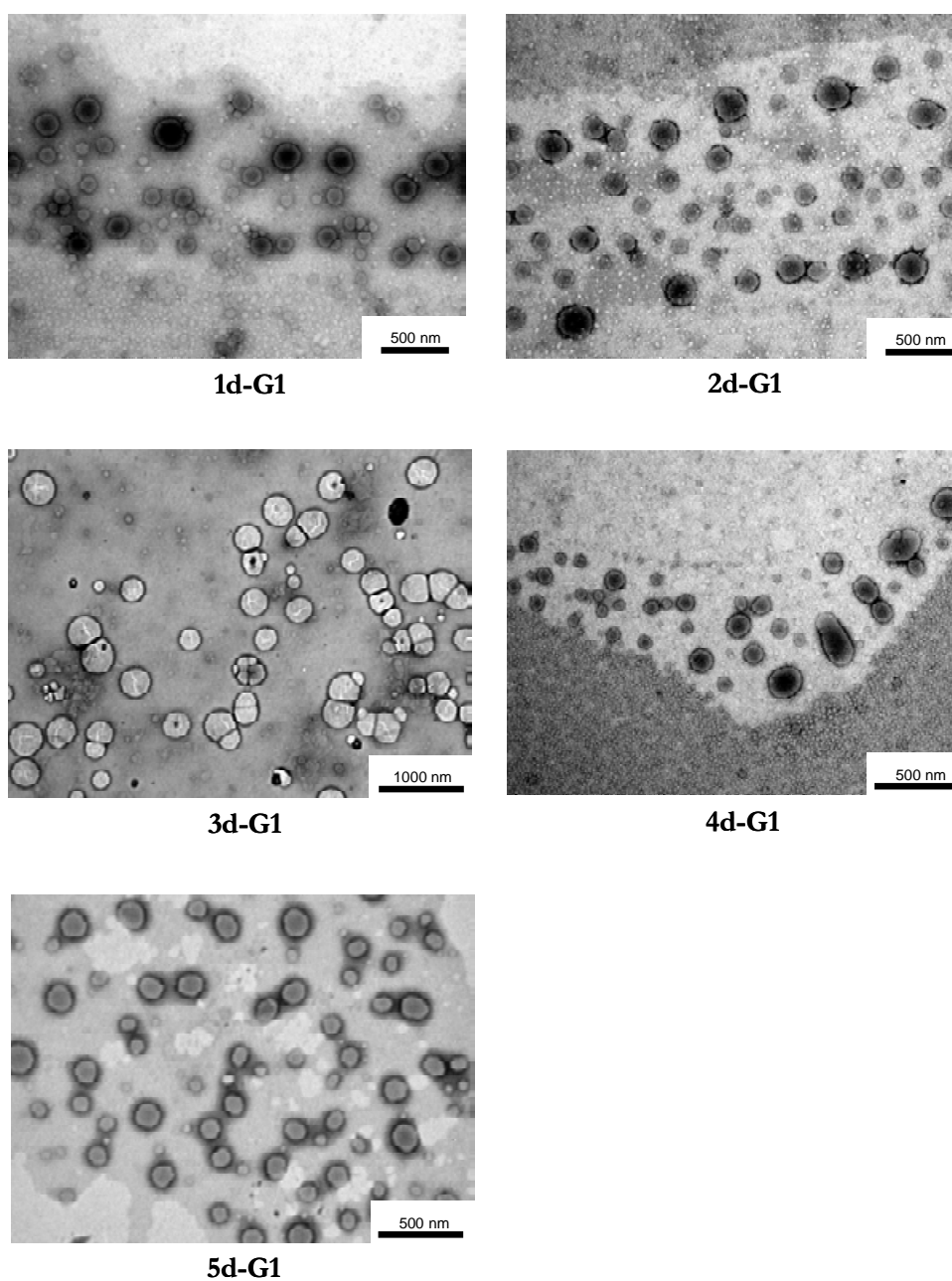


Figure III.20 Clichés de microscopie électronique à transmission des composés catanioniques **Nd-G1**

Les observations réalisées en MET pour les systèmes catanioniques montrent, quel que soit le produit, la présence de structures sphériques de taille polydisperse. Ces valeurs corrélerent avec celles obtenues par diffusion de la lumière à l'exception du **5d-G1**, où la présence d'énormes objets n'a pas été observée. Cependant, la déshydratation de l'échantillon ainsi que l'utilisation d'un contrastant pour délimiter la forme des agrégats peuvent perturber l'environnement des vésicules et fausser leur observation. Afin de confirmer les résultats obtenus, des études de cryofracture ont été réalisées par C. Bololoi et Mme. Tiersche au Max Planck Institut à Golm (Allemagne). Cette technique permet de travailler sans contrastant et de visualiser une réplique des objets figés en solution.

III.3.2.3.3 Etude des objets par cryofracture

Ces études ont été réalisées pour la famille de dendrimères α -alkylphosphonate, **3d-G1**, **4d-G1** et **5d-G1** afin de connaître l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la formation des objets.

Dendrimère **3d-G1**

En cryofracture nous observons que ce dendrimère catanionique est capable de former spontanément des vésicules avec des diamètres de 100 à 300 nm dans l'eau à 10^{-3} M

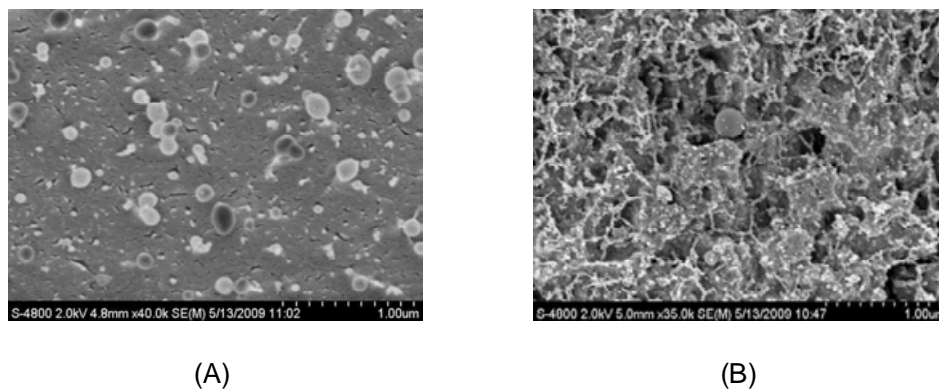


Figure III.21 (A) Vésicules spontanées formées par le dérivé **3c-G1** (10^{-3} M). (B) Vésicules attrapées dans le liquide visqueux formé par **3c-G1** (10^{-3} M)

Nous pouvons également observer que ce composé forme un gel (Figure III.21). Ces résultats confirment les suppositions faites quant à la possible formation d'une solution visqueuse, qui pourrait fausser les valeurs de CAC, obtenues par dilution. En effet, les solutions préparées pour les mesures de tensiométrie ont été obtenues par dissolution d'une solution mère très visqueuse. La dilution ne suffit pas pour détruire les réseaux formés par le gel.

Dendrimère 4d-G1

Quand l'hydrophobie du système catanionique augmente, il semble que les propriétés d'autoassemblage ne changent pas. Des vésicules de taille similaire (130 nm) et des filaments sont obtenus spontanément dans l'eau. De nouveau, nous avons observé que les solutions sont très visqueuses comme déjà observé lors des expériences de tensiométrie (Figure III.22).

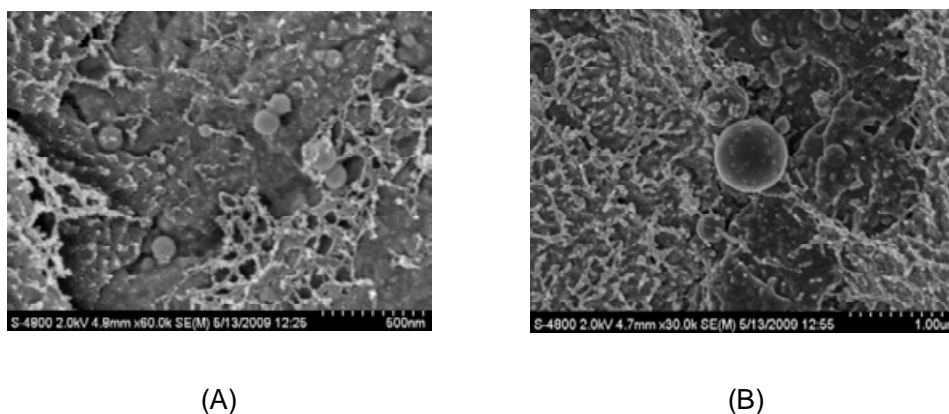


Figure III.22 (A) Vésicules et filaments obtenus pour **4d-G1** ($10^{-3}M$). (B) Vésicule attrapée dans le réseau formé par le liquide visqueux ($10^{-3}M$)

Dendrimère 5d-G1

Ce dendrimère qui est le plus hydrophobe présente un comportement complètement différent. Il forme de grosses vésicules multilamellaires d'environ 5 μM , qui cotoient des lamelles et des petites vésicules de quelques centaines de nanomètres (Figure III.23).

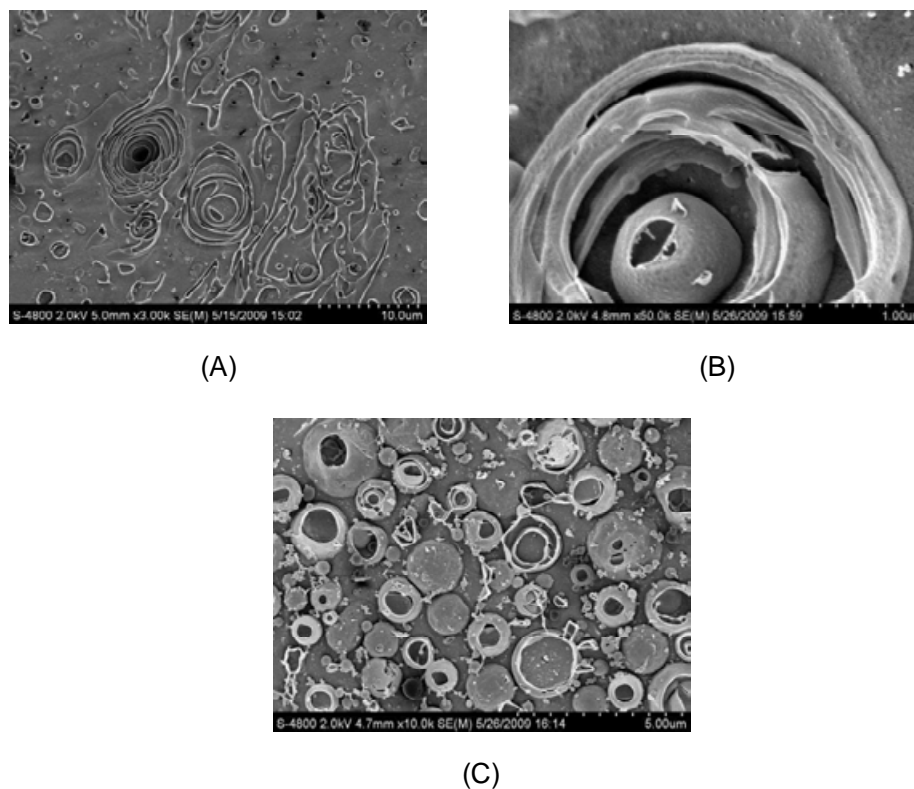


Figure III.23 Différents objets formés par **5d-G1**. (A) Lamelles, vésicules géantes et petites vésicules. (B) Vésicules géantes multilamellaires. (C) Différentes vésicules. ($10^{-3}M$)

Les tailles des objets formés corrént avec celles obtenues par diffusion de la lumière.

Le comportement singulier de **5d-G1** semble indiquer que l'arrangement interne du dendrimère catanionique s'approche d'une géométrie cylindrique (c.f. Tableau III.1). En effet, dans ce cas la courbure de la bicouche est peu favorisée ; ce qui explique la présence de lamelles et de vésicules géantes.

Dans tous les cas, nous voyons que quel que soit l'arrangement des tensioactifs catanioniques et le type d'objet qu'ils forment, la toxicité est sensiblement la même, ce qui nous amène de nouveau à penser que l'origine de la toxicité n'est pas liée à l'agrégation mais à la dissociation de la paire d'ions par un manque de stabilité.

III.4 Conclusions

Afin de vérifier que l'origine de la cytotoxicité des dendrimères catanioniques analogues du GalCer n'est pas due à un phénomène d'agrégation, nous avons étudié le comportement de ces

composés dans l'eau. Pour cela, il est nécessaire de savoir s'ils sont toxiques à l'état isolé ou bien à l'état agrégé.

Nos systèmes sont des molécules amphiphiles. Ce type de molécules dans l'eau est capable de s'auto-organiser, de s'adsorber et de s'orienter à l'interface eau-air, en abaissant la tension superficielle. A faibles concentrations, les molécules amphiphiles sont dispersées dans l'eau à l'état non agrégé mais à partir d'une concentration limite, ces molécules forment des agrégats supramoléculaires. De plus, la morphologie des agrégats est reliée à la structure du tensioactif.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement des dendrimères précurseurs anioniques. Nous avons constaté par tensiométrie une influence de la nature de la fonction des branches dendritiques sur les propriétés tensioactives. De cette façon, nous trouvons que le dendrimère **1c-G1** ne présente pas de caractère tensioactif car les fonctions PO(OH)(ONa) forment des liaisons hydrogène intermoléculaires. Cela est traduit par une perte du caractère amphiphile du dendrimère et en conséquence des propriétés tensioactives. L'augmentation de la polarité par introduction d'un groupe hydroxyle sur le dendrimère **2c-G1** augmente cependant le moment dipolaire ce qui augmente aussi le caractère amphiphile de la molécule. Pour cette raison, le dendrimère **2c-G1** présente un caractère tensioactif plus marqué.

Quant à la famille de précurseurs anioniques avec une chaîne alkyle latérale, nous retrouvons un comportement différent pour celui qui possède une chaîne alkyle à 3 atomes de carbone, **4c-G1**. Il diminue plus la tension de surface que le dendrimère **5c-G1** qui est plus hydrophobe. La chaîne C3 perturbe la surface du dendrimère. Cela est en accord avec les observations faites par RMN où on a observé que la chaîne C3 peut sortir à l'extérieur, ce qui le rend aussi plus actif biologiquement, car la chaîne peut interagir avec la surface virale.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé le comportement des dendrimères catanioniques dans l'eau. Le fait d'avoir un contre-ion organique change le comportement des dendrimères catanioniques par rapport à celui de leurs précurseurs anioniques. Nous constatons que le pouvoir tensioactif des catanioniques est plus marqué. Dans le cas des dendrimères de la série α -alkylphosphonate, nous trouvons un comportement non classique au niveau de la CAC, plus le dendrimère est hydrophobe, plus sa CAC est élevée. Ce fait peut s'expliquer par une différence dans le mode d'agrégation. En effet, nous avons observé que les solutions mères des composés **3d-G1** et **4d-G1** sont des liquides visqueux contrairement à celle de **5c-G1**. Le réseau probablement stable peut perdurer à la dilution durant la préparation des échantillons. Cela nous amène à des valeurs de CAC plus basses pour ces deux composés que pour le composé **5c-G1** qui est le plus hydrophobe. Nous avons vérifié par cryofracture que ce comportement est dû à la façon de préparer les échantillons par dilution. La CAC s'en trouve donc probablement faussée.

Malgré ce problème de dilution et de détermination de CAC, ces résultats nous permettent de comparer les tendances d'agrégation de ces produits en solution avec les tendances de leurs propriétés biologiques. Quand nous comparons les valeurs de CI_{50} et CC_{50} avec celles de CAC, nous trouvons que les associations catanioniques sont actives à l'état non agrégé car les CI_{50} sont inférieures à leurs CAC. En ce qui concerne la toxicité, nous remarquons de manière générale que les dendrimères sont toxiques à l'état non agrégé car leurs CC_{50} sont inférieures à leurs CAC sauf pour les dendrimères **3d-G1** et **4d-G1**. Si les valeurs de CAC pour ces deux dendrimères ont été faussées, leurs vraies CAC sont plus élevées, il est donc très probable qu'ils soient toxiques à l'état non agrégé, en suivant la tendance générale de ces dérivés catanioniques.

D'autre part, les études par diffusion quasi élastique de la lumière et l'observation des dendrimères anioniques par MET à des concentrations supérieures aux CAC correspondantes ne révèlent rien de significatif. Ces composés forment probablement des micelles dans l'eau. Par contre, les dendrimères catanioniques forment spontanément des vésicules dans l'eau à la différence des précurseurs anioniques. De plus, le dendrimère **5d-G1** avec la chaîne C10 forme aussi des vésicules multilamellaires géantes et des lamelles. Ce comportement particulier de **5d-G1** semble indiquer que son arrangement interne s'approche d'une géométrie cylindrique. Dans ce cas, la courbure de la bicouche est peu favorisée. De plus, il faut rappeler que ce dendrimère présente l'index thérapeutique, le plus élevé de toute la série de dendrimères catanioniques ce qui indique que les interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles du dendrimère et l'aminolactitol renforcent vraisemblablement la paire d'ions.

Ces résultats indiquent que le phénomène d'agrégation n'est pas le responsable de la cytotoxicité de ces analogues catanioniques dendritiques car ils présentent déjà une toxicité à l'état non agrégé. Nous pouvons donc envisager que l'origine de la toxicité cellulaire de ces associations catanioniques dendritiques est liée à une dissociation partielle de la paire d'ions en milieu biologique. Nous allons essayer de rationaliser et quantifier la dissociation de la paire d'ions dans le Chapitre IV.

III.5 Bibliographie

- (1) Preston, W. C., *J. Phys. Colloid Chem.* **1948**, *52*, 84.
- (2) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525.
- (3) Khan, A.; Marques, E., *Specialist Surfactants*. Blackie Academic and Professional/Chapman & Hall, London, 1997, 37 p.
- (4) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A., *Langmuir* **1999**, *15*, 6163.
- (5) Zemb, T.; Dubois, M.; Deme, B.; Gulik-Krzywicki, T., *Science* **1999**, *283*, 816.
- (6) Dubois, M.; Deme, B.; Gulik-Krzywicki, T.; Dedieu, J. C.; Vautrin, C.; Desert, S.; Perez, E.; Zemb, T., *Nature* **2001**, *411*, 672.
- (7) Dubois, M.; Lizunov, V.; Meister, A.; Gulik-Krzywicki, T.; Verbavatz, J. M.; Perez, E.; Zimmerberg, J.; Zemb, T., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 15082.
- (8) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1063.
- (9) Kaler, E. W.; Kamalakara Murphy, A.; Rodriguez, B. E.; Zasadzinski, J. A. N., *Science* **1989**, *245*, 1371.
- (10) Raghavan, S. R.; Gerhard, F.; Kaler, E. W., *Langmuir* **2002**, *18*, 3797.
- (11) Koehler, R. D.; Raghavan, S. R.; Kaler, E. W., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11035.
- (12) Jokela, P.; Jönsson, B.; Khan, A., *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3291.
- (13) Dubois, W.; Zemb, T., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 27.
- (14) Minardi, R. M.; Schulz, P. C.; Vuano, B., *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276*, 589.
- (15) Bramer, T.; Dew, N.; Edsman, K., *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1319.
- (16) Kaler, E. W.; Herrington, K. L.; Zasadzinski, J. A. N., *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, *248*, 3.
- (17) Fukuda, H.; Kawata, K.; Okuda, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1635.
- (18) Bhattacharya, S.; De, S.; Subramanian, M., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7640.
- (19) Menger, F. M.; Binder, W. H.; Keiper, J. S., *Langmuir* **1997**, *13*, 3247.
- (20) Blanzat, M. *Premiers analogues catanioniques du Galactosylcéramide. Synthèse ciblée et évaluation de leurs propriétés anti-VIH*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2000**.
- (21) Blanzat, M.; Massip, S.; Spéziiale, V.; Perez, E.; Rico-Lattes, I., *Langmuir* **2001**, *17*, 3512.
- (22) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Gulik, A., *Chem. Commun.* **2003**, 244.
- (23) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2207.
- (24) Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I., *Langmuir* **2008**, *24*, 2326.
- (25) Brasher, L. L.; Kaler, E. W., *Langmuir* **1996**, *12*, 6270.
- (26) Salkar, R. A.; Mukesh, D.; Samant, S. D.; Manohar, C., *Langmuir* **1998**, *14*, 3778.
- (27) Bhattacharya, S.; De, S., *Langmuir* **1999**, *15*, 3400.
- (28) Tondre, C.; Caillet, C., *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *93*, 115.
- (29) Chung, Y. C.; Lee, H. J.; Park, J. Y., *Bull. Korean Chem. Soc.* **1998**, *19*, 1249.
- (30) Guilbot, J.; Benvegnu, T.; Legros, N.; Plusquellec, D.; Dedieu, J. C.; Gulik, A., *Langmuir* **2001**, *17*, 613.

- (31) Zana, R., *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248*, 203.
- (32) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Chem. Commun.* **2002**, *17*, 1864.
- (33) Bololoi, A. M. C. *Nouveaux amphiphiles catanioniques analogues du galactosylcéramide: Corrélation Structure, Propriétés Physico-Chimiques et Activité Anti-VIH*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2008**.
- (34) Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C., *Spectrometric identification of organic compound*. 5th ed. Brisbane: John Wiley & Sons, New York, 1991, p.
- (35) Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 520.

Chapitre IV : Etude de la stabilité par fluorescence

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA STABILITE PAR FLUORESCENCE.....	187
IV.1 INTRODUCTION.....	190
IV.2 RAPPELS SUR LES DENDRIMERES DE TYPE PPH FLUORESCENTS ET SOLUBLES DANS L'EAU.....	191
IV.2.1 Exemple d'utilisation d'un dendrimère PPH fluorescent pour la colocalisation de récepteur par FRET.....	192
IV.2.2 Exemple d'un dendrimère PPH fluorescent utilisé pour la cytométrie en flux.....	194
IV.3 RAPPELS SUR LES DERIVES DE SUCRE FLUORESCENTS.....	196
IV.4 RAPPELS SUR LES SYSTEMES CATIONIQUES FLUORESCENTS.....	198
IV.5 STRATEGIE POUR LA MESURE DE LA STABILITE DES PAIRES D'IONS.....	204
IV.6 SYNTHÈSE DES MARQUEURS FLUORESCENTS	206
IV.6.1 Synthèse du dendrimère fluorescent à cœur julolidine 11-Df	206
IV.6.2 Synthèse de l'aminosucres fluorescent 18 ou Lf	212
IV.6.3 Synthèse des assemblages fluorescents 25-(Df(Na)₁₀) , 26-(Df(L16)₁₀) , 27-(Df(L8)(L16)₉) et 28-(Df(Lf)(L16)₉)	216
IV.7 ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ASSEMBLAGES CATIONIQUES FLUORESCENTS..	219
IV.7.1 Etude par tensiométrie.....	219
IV.7.2 Etude de la taille et de la forme des objets supramoléculaires fluorescents.....	222
IV.8 ETUDE DE LA STABILITE DES COMPLEXES D'ASSOCIATION DES ASSEMBLAGES CATIONIQUES PAR FLUOROMETRIE	224
IV.8.1 Etude de la stabilité de la paire d'ions par FRET.....	224
IV.8.2 Détermination des constantes de dissociation par fluorimétrie.....	225
IV.9 CONCLUSIONS	229
IV.10 BIBLIOGRAPHIE	231

IV.1 Introduction

Malgré les modifications structurales réalisées sur les dendrimères pour des assemblages catanioniques afin de renforcer la paire d'ions, nous avons constaté que tous ces nouveaux inhibiteurs d'entrée du VIH présentent une certaine cytotoxicité. L'étude physico-chimique a révélé que cette toxicité ne semble pas liée aux phénomènes d'agrégation à des concentrations où les essais biologiques ont été réalisés. Ce fait suggère que l'origine de la toxicité peut se trouver dans le manque de stabilité de la paire d'ions à des concentrations faibles dans le milieu biologique comme nous avons déjà proposé au début de ces études. Si la paire d'ions est dissociée dans le milieu biologique, l'aminosucré libéré peut provoquer la lyse des cellules.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons mis en œuvre deux méthodes pour évaluer la stabilité de la paire d'ions avec des analogues fluorescents des dendrimères catanioniques (Figure IV.I). Leurs propriétés physico-chimiques ont été étudiées en milieu aqueux.

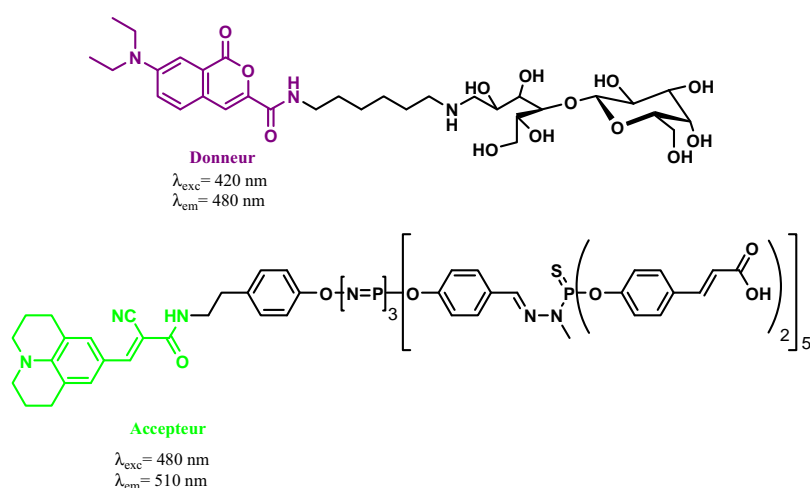


Figure IV.I Structure des analogues fluorescents de l'aminosucré et du dendrimère

Ces analogues fluorescents ont été synthétisés pour tenter de mesurer les constantes d'association entre le dendrimère et l'aminosucré à longue chaîne par spectrofluorimétrie.

IV.2 Rappels sur les dendrimères de type PPH fluorescents et solubles dans l'eau

La plupart des fluorophores sont des systèmes lipophiles. Deux voies générales de synthèse ont été développées au sein de notre laboratoire pour concevoir des marqueurs fluorescents solubles dans l'eau en utilisant des dendrimères de type PPH.⁽¹⁾ La première approche consiste à greffer à la périphérie du dendrimère des groupes chromophores et des groupes chargés qui rendent le dendrimère soluble dans l'eau (Figure IV.2). Cette stratégie peut impliquer l'utilisation de bis-dendrons (Figure IV.2, A). L'autre stratégie implique des dendrimères avec le chromophore au cœur (Figure IV.2, B) ou dans les branches (Figure IV.2, C) et avec des groupes chargés à la périphérie.

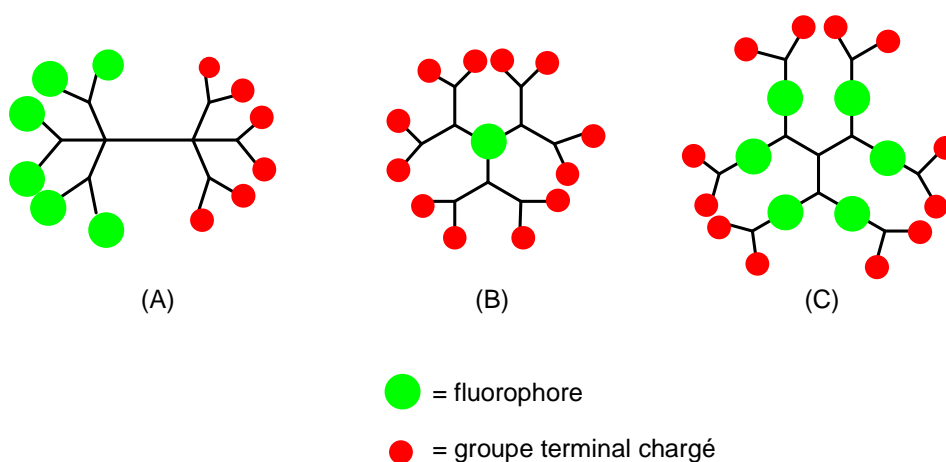


Figure IV.2 Stratégies employées pour la synthèse de marqueurs fluorescents solubles dans l'eau

L'utilisation de bis-dendrons a permis la synthèse de dendrimères de type «Janus» non symétriques avec des groupes dansyle et amine terminaux qui possèdent une forte fluorescence et qui peuvent être utilisés pour l'étude d'événements biologiques.^(2, 3) Un autre exemple de bis-dendrimer fluorescent concerne un dendrimère de type «Janus» à terminaisons maleimide et phosphonate préparé pour le développement de matériaux hybrides capables de détecter certains composés phénoliques dangereux.⁽⁴⁾

Quant au développement de dendrimères PPH à cœur fluorescent et solubles dans l'eau, plusieurs approches ont été réalisées au laboratoire. Par exemple, les dendrimères à cœur phthalocyanine avec des groupes ammonium terminaux ont été synthétisés,⁽⁵⁾ ils peuvent agir en tant qu'agents de transfection d'oligodéoxynucléotides.⁽⁶⁾ Pour l'imagerie in vivo, des dendrimères

solubles dans l'eau avec un cœur chromophore absorbant à deux photons (TP) ont été conçus.⁽⁷⁾ La position centrale du chromophore prévient la diminution du rendement quantique par processus non radiatifs provoqués par les molécules d'eau et par processus d'agrégation. Ces marqueurs fluorescents sont aussi une alternative possible aux quantum dots semi-conducteurs.

En résumé, ces deux stratégies synthétiques permettent la conception de dendrimères PPH fluorescents solubles dans l'eau pour l'étude d'événements biologiques et pour le développement de nouveaux matériaux. Enfin, il faut retenir que les propriétés fluorescentes des chromophores ne doivent pas être modifiées par la structure dendritique et que les propriétés biologiques du dendrimère ne doivent pas être altérées par la présence des chromophores.

IV.2.1 Exemple d'utilisation d'un dendrimère PPH fluorescent pour la colocalisation de récepteur par FRET

Le dendrimère fluorescent de la Figure IV.3, contient un groupe 3,4-diphénylmaleimide greffé au cœur.⁽⁸⁾ Ce composé est un analogue fluorescent d'un composé immunomodulateur étudié dans l'équipe (Figure IV.3).⁽⁹⁾ Il a permis d'identifier un des récepteurs impliqués dans l'activation des monocytes par ce composé.

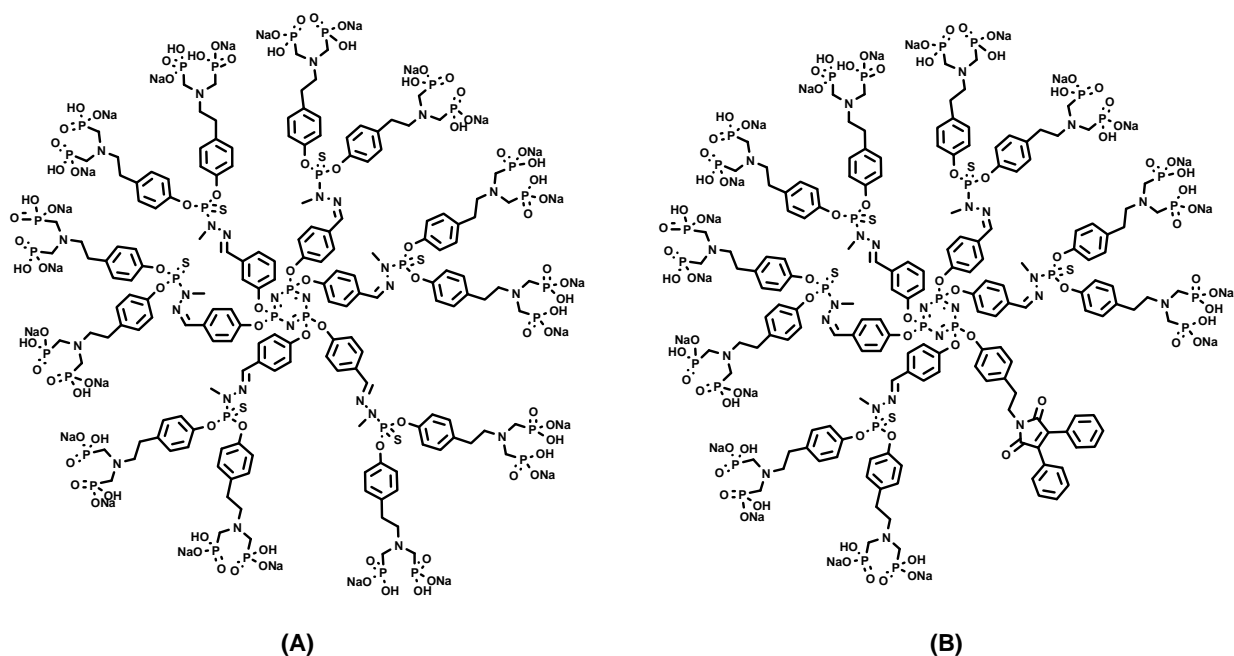


Figure IV.3 Dendrimère immunomodulateur (A) et un analogue fluorescent (B)

Pour cela, la technique du FRET (Förster Resonance Energy Transfert) permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes. Le « donneur » est excité et va libérer des photons à une longueur d'onde $L1$ qu'on peut détecter. Cependant il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation à une seconde molécule fluorescente, le « receveur », qui libérera aussi des photons mais à une longueur d'onde qui lui est propre $L2$. Puisqu'il y a transfert entre le donneur et le receveur, plus ils sont proches, plus le transfert est efficace et plus le receveur émet de photons. Le FRET est utilisé dans de nombreuses problématiques en biologie, notamment pour l'étude des interactions ligand-récepteur, protéine-protéine, protéine-acide nucléique ou encore des changements de conformation des molécules.

Parmi les conditions requises pour observer du FRET, il faut qu'il y ait chevauchement entre le spectre d'absorption de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur. Cela est particulièrement important dans le choix des couples de donneur-accepteur en fluorescence. En effet, l'efficacité de FRET peut-être améliorée en choisissant un couple donneur-accepteur avec un fort recouvrement de leurs spectres d'absorption-émission. Par exemple, pour le couple dendrimère 3,4-diphénylmaleimide –PE (phycoerythrin), le spectre d'absorption de l'accepteur (PE) chevauche le spectre d'émission du donneur (dendrimère). Il apparaît aussi une zone de chevauchement du spectre d'émission de la dendrimère dans le spectre d'absorption de PE (Figure IV.4).

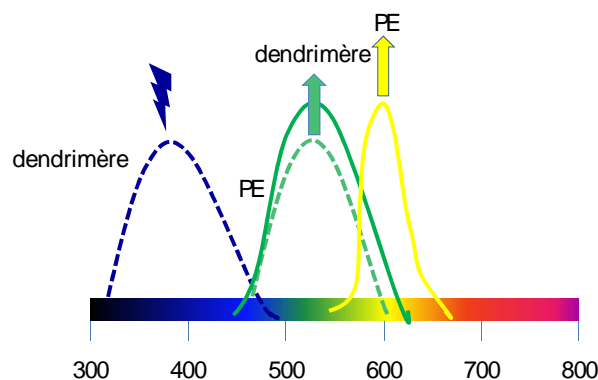


Figure IV.4 Spectres d'excitation et d'émission du couple dendrimère (pointillé)-PE (trait plein)

En outre, le rayon de Förster R_0 est aussi fondamental. Ce rayon correspond à la distance entre le donneur et l'accepteur pour laquelle l'efficacité (E) du FRET est de 50% (50% de l'énergie d'excitation absorbée par le donneur est transférée à l'accepteur). R_0 est généralement compris entre 10 et 100 Å. Si la distance R entre le donneur et l'accepteur est 1,5 fois supérieure au rayon de Förster R_0 , il n'y a pas de transfert d'énergie : le donneur est excité et fluoresce seul. Par contre, si la distance R entre le donneur et l'accepteur est 1,5 fois inférieure au rayon de Förster R_0 , il y a

transfert d'énergie : le donneur est excité, une partie de l'énergie est transférée, l'accepteur et le donneur fluorescent.⁽¹⁰⁾

L'efficacité E du transfert d'énergie est définie comme étant le rapport entre l'énergie transférée du donneur à l'accepteur sur l'énergie absorbée par le donneur. Cette efficacité de transfert décroît rapidement avec l'augmentation de la distance R entre le donneur et l'accepteur.

Une dernière condition est que l'interaction au niveau moléculaire étant du type dipôle-dipôle, l'efficacité de transfert sera d'autant plus grande que les deux dipôles seront orientés dans le même sens.

Dans l'exemple cité, les monocytes marqués avec le dendrimère sont incubés avec des anticorps contre plusieurs récepteurs de monocytes marqués avec la phycoérythrine (PE). Ainsi, après excitation au λ_{exc} du dendrimère, la fluorescence de PE sera obtenue par FRET si le dendrimère est suffisamment proche des anticorps. Parmi tous les anticorps testés, celui contre le récepteur TLR2 (toll-like receptor 2) a été identifié comme participant à la reconnaissance et la transduction de signaux entre le dendrimère et les monocytes.

IV.2.2 Exemple d'un dendrimère PPH fluorescent utilisé pour la cytométrie en flux

Par ailleurs, dans le cadre de ces études sur les propriétés immunomodulatrices de dendrimères PPH, un autre analogue fluorescent a été préparé pour les études en cytométrie en flux et en microscopie confocale (Figure IV.5).⁽⁹⁾ Ce système a été utilisé dans notre étude et sa synthèse est rappelée ici.

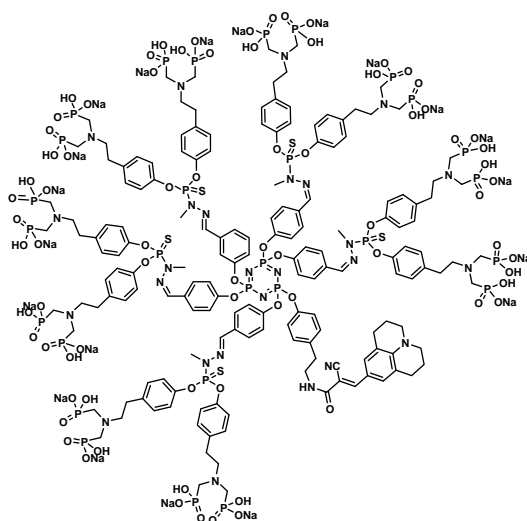


Figure IV.5 Dendrimère fluorescent employé pour étudier son interaction avec les monocytes humains

La synthèse commence par la préparation du phénol dérivé de la julolidine. La première étape est la formylation de la julolidine commerciale pour obtenir quantitativement la 4-formyljulolidine.⁽¹¹⁾ Le 1-cyano-N-acyl tyramine est aussi obtenu quantitativement à partir de la tyramine et le cyanométhylacétate. Le méthylène activé par les deux groupes électro-attracteurs réagit facilement avec le 4-formyljulolidine pour obtenir l'entité push-pull conjuguée du phénol fluorescent. Cette condensation de Knoevenagel a lieu avec des rendements élevés (Schéma IV.1).

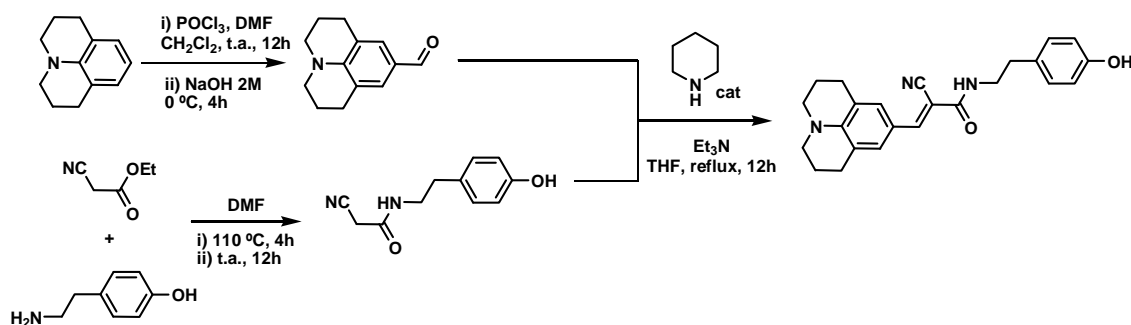


Schéma IV.1 Synthèse de la sonde fluorescente dérivée de la julolidine

En parallèle, la pentasubstitution du 4-hydroxybenzaldéhyde sur l'hexachlorocyclo(triphosphazène) a conduit à l'obtention du penta(4-formylphénoxy)-chlorocyclo(triphosphazène)⁽¹²⁾ et l'atome de chlore qui reste est substitué par le phénol fluorescent (Schéma IV.2).

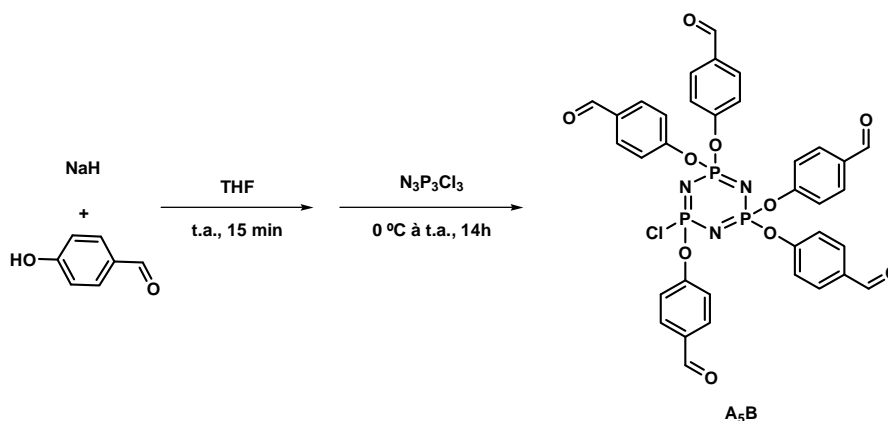


Schéma IV.2 Synthèse du cœur dendritique de type A_5B

On utilise ensuite le protocole classique pour l'obtention du dendrimère phosphonate.^(13, 14)

Les propriétés fluorescentes du fragment julolidine ne sont pas modifiées. En effet, les modifications à la surface ne modifient pas les fonctions du cœur. Par exemple, les spectres d'excitation et d'émission du phénol julolidine et du dendrimère julolidine ont presque les mêmes

spectres de fluorescence. La longueur d'onde d'excitation maximale du phénol julolidine est centrée à 450 nm et elle est déplacée vers 470 nm après le greffage au squelette dendritique tandis que la longueur d'onde d'émission maximale est déplacée de 500 à 507 nm dans le composé final (Figure IV.6).

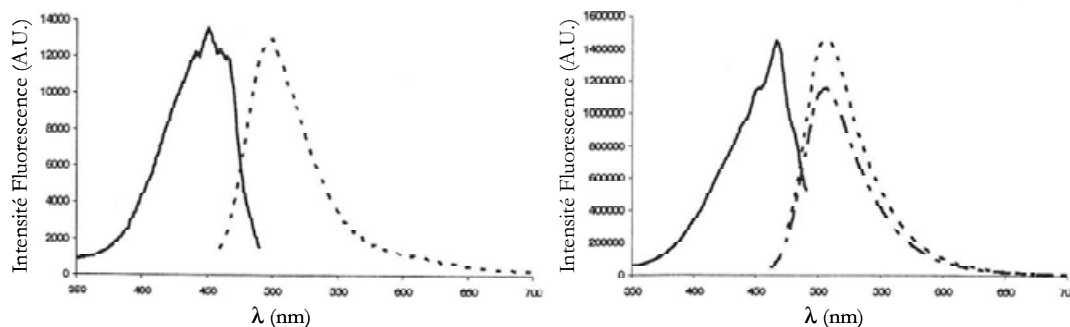
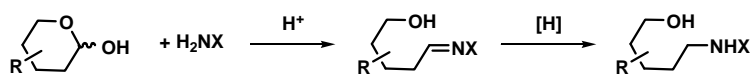


Figure IV.6 (A) Spectres d'excitation et d'émission du phénol julolidine ($\lambda_{\text{excitation}} = 450 \text{ nm}$) (B) Spectres d'excitation et d'émission du dendrimère fluorescente *azo-bisphosphonate* final ($\lambda_{\text{excitation}} = 470 \text{ nm}$). La fluorescence du phénol julolidine y est aussi reportée pour comparaison⁽¹⁵⁾

IV.3 Rappels sur les dérivés de sucre fluorescents

La préparation d'aminosucres fluorescents a été très utilisée pour la séparation chromatographique, pour l'électrophorèse et pour la détection de mono- et oligosaccharides.⁽¹⁶⁾ Les caractéristiques du marqueur dépendent de la technique de séparation appliquée, par exemple, l'électrophorèse capillaire a besoin des marqueurs chargés et l'HPLC a besoin des marqueurs lipophiles.

La méthode principale pour introduire le marqueur fluorescent sur l'aminosucres est l'amination réductrice.⁽¹⁶⁾ Par cette méthode, l'imine formée par condensation entre le groupe carbonyle de l'oligosaccharide réducteur et l'amine primaire est réduite pour obtenir l'aminosucres marqué (Schéma IV.3).



R = résidu oligosaccharide ou aminooligosaccharide
X = marqueur fluorescent

Schéma IV.3 Réaction d'amination réductrice d'oligosaccharides

Les marqueurs fluorescents les plus utilisés par cette méthode sont réunis dans la Figure IV.7.

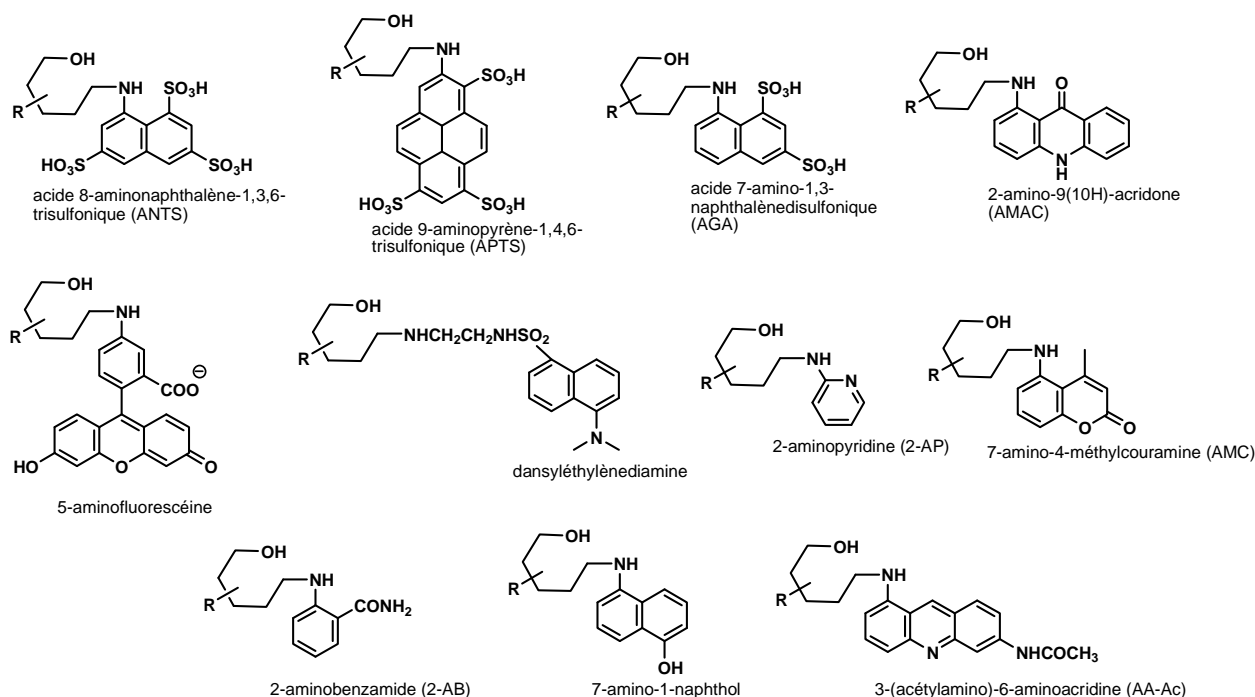


Figure IV.7 Fluorophores introduits sur l'aminosucré par amination réductrice⁽¹⁶⁾

Cette technologie permet l'introduction du chromophore proche du sucre.

Une autre méthode consiste en des N-acylations des groupes amine libres sur la structure du sucre⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ ou bien en des O-acylations de sucres protégés.⁽²⁰⁾ Par exemple, Katritzky *et al.* ont récemment préparé le marquage de sucres protégés avec du diisopropylidène par O-acylation et des aminosucres protégés avec pivaloyde par N-acylation en utilisant comme agents d'acylation : (1) N-(coumarine-3-carbonyl)benzotriazole et (2) des benzotriazoles dérivés de N^c-coumarine (Figure IV.8).⁽²¹⁾ Ces réactions d'acylation sont menées à 60 °C ou à température ambiante sous irradiation microonde.

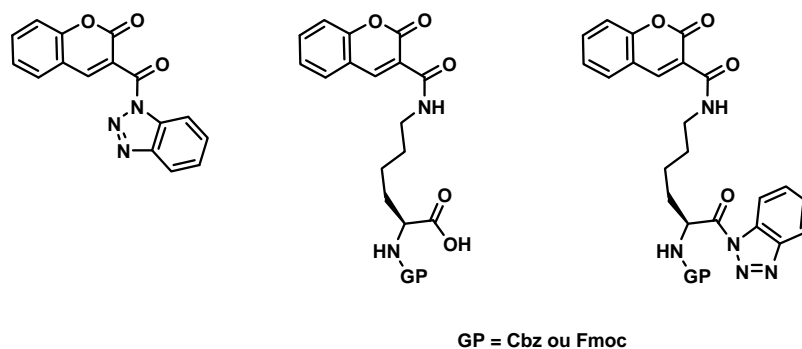


Figure IV.8 Agents acylants pour le marquage fluorescent de sucres protégés

Après la déprotection des groupes hydroxyles du résidu sucre en utilisant le TFA, on obtient de nouveaux dérivés de sucres fluorescents solubles dans l'eau (Figure IV.9).

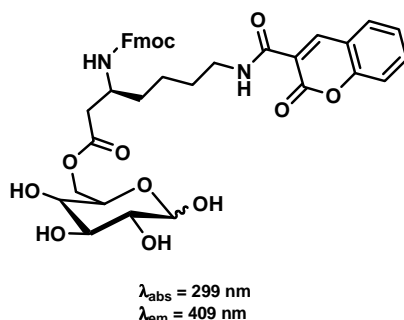


Figure IV.9 Sucre fluorescent obtenu par acylation

Cette méthode permet le marquage fluorescent des carbohydrates par acylation ce qui peut être utilisé pour la séquenciation de carbohydrates, on notera que l'utilisation de fluorophores adaptés peut permettre d'éloigner ce dernier du sucre pour éviter de perturber les interactions biologiques dans lesquelles il peut être impliqué.

IV.4 Rappels sur les systèmes catanioniques fluorescents

Comme nous l'avons déjà vu dans le Chapitre III, les systèmes catanioniques forment des vésicules qui possèdent des microenvironnements différents pour l'encapsulation de petites molécules. En solution aqueuse, les substances hydrophiles peuvent être encapsulées à l'intérieur aqueux et les substances hydrophobes et amphiphiles peuvent être hébergées dans la bicouche lipidique. Les régions interfaciales qui sont composées par les têtes polaires des tensioactifs définissent les surfaces intérieure et extérieure de la bicouche. Ces interfaces offrent des sites additionnels pour les interactions hôte/invité qui sont gouvernées par des forces électrostatiques, par des interactions dipôle-dipôle et par des liaisons hydrogènes.

En appliquant ces principes et en utilisant un marqueur fluorescent, de nombreuses études par fluorescence ont été menées sur les systèmes catanioniques pour évaluer différents événements physicochimiques et biologiques.

La sonde fluorescente, en fonction de sa nature, peut donc être distribuée dans l'assemblage catanionique en solution aqueuse :

- (1) à l'intérieur ou à l'extérieur des surfaces,
- (3) dans la sphère d'hydratation de la vésicule,
- (4) dans l'intérieur aqueux de la vésicule,

- (2) dans la bicouche créée par les queues hydrophobes des tensioactifs, ou
 (5) comme composant de l'assemblage catanionique.

Ce type d'expériences avec de systèmes catanioniques fluorescents permet la caractérisation des interactions entre des vésicules catanioniques et des cellules,⁽²²⁾ l'étude de l'agrégation de vésicules,^(23, 24) de la stabilisation de vésicules,⁽²⁵⁾ de l'encapsulation de médicaments,⁽²⁶⁾ de la transfection d'ADN,⁽²⁷⁾ de la polarité et la viscosité de différents microdomaines de l'assemblage catanionique,⁽²⁸⁾ de la transition micelle-vésicule⁽²⁹⁾ ainsi que la détermination de la taille de pore d'agrégats.⁽³⁰⁾ Nous allons ensuite présenter quelques exemples.

Karukstis *et al.*⁽²⁴⁾ ont utilisé la spectroscopie de fluorescence pour caractériser la structure et la morphologie des vésicules catanioniques formées par le système DDAB/AOT (bromure de didodecyldiméthylammonium/dioctylsulfosuccinate de sodium). Pour cela, une sonde fluorescente anionique a été utilisée, le TNS (2-(*p*-toluidino)naphtalène-6-sulfonate) (Figure IV.10).

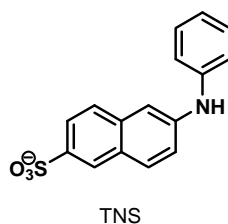


Figure IV.10 Structure chimique de sonde fluorescente TNS

La molécule TNS est peu fluorescente dans l'eau mais elle montre une intensité de fluorescence élevée quand elle interagit avec la surface supramoléculaire. En effet, quand la surface est chargée négativement, elle peut repousser la sonde anionique vers la région aqueuse où le rendement quantique de la sonde est faible. L'intensité de fluorescence de TNS peut donc augmenter en présence d'objets supramoléculaires chargés positivement.

De plus, les interactions hydrophobes entre le TNS et le tensioactif peuvent placer le TNS dans un environnement plus hydrophobe et augmenter ainsi son rendement quantique. Cette augmentation de l'intensité de fluorescence peut être accompagnée par un effet hypsochrome (un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale vers le bleu).

Ces études montrent que l'utilisation de sondes fluorescentes permet d'analyser les aspects dynamiques de la structure et de la morphologie des agrégats formés par des systèmes catanioniques.

L'utilisation de systèmes cationiques fluorescents permet aussi l'étude des monocouches des associations cationiques par la balance de Langmuir. Un exemple concerne le système développé par Coppock *et al.*⁽³¹⁾ pour étudier la monocouche formée par le système cationique DODAB (bromure de dioctadecyldiméthylammonium)/SDS (dodécylsulfate de sodium). Pour cela, ils ont utilisé comme sonde le NBD C₁₂-HPC (2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), Figure IV.11).

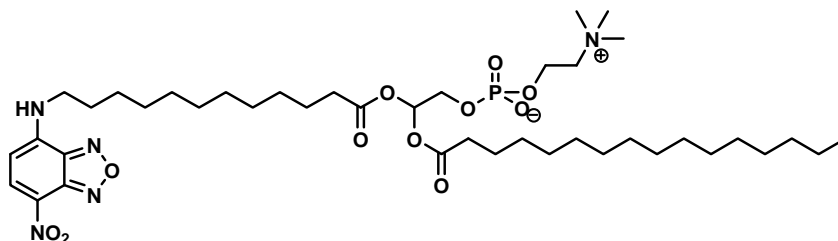


Figure IV.11 Structure chimique de NBD C₁₂-HPC

Quand une quantité équimolaire de SDS pure est ajoutée sur la monocouche DODAB en présence de NBD C₁₂-HPC, le SDS qui est soluble dans l'eau, interagit avec ce dernier et l'ensemble s'incorpore à la monocouche DODAB. Cela est suivi par microscopie de fluorescence.

Une autre approche a consisté en la préparation de vésicules cationiques photosensibles pour la transfection d'ADN.⁽²⁷⁾ Ces systèmes sont constitués par azoTAB (bromure de azobenzènetriméthylammonium, Figure IV.12)/SDBS (dodécylbenzènesulfonate de sodium).

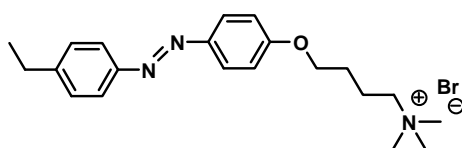


Figure IV.12 Structure chimique d'azoTAB

La comparaison des efficacités de relargage d'ADN des vésicules cationiques azoTAB/SBDS avec ou sans irradiation UV permet d'envisager l'utilisation de ce type de vésicules pour la transfection d'ADN.

Dans ce contexte, d'autres stratégies ont été réalisées pour la transfection d'ADN en employant des associations cationiques. Dans ces cas, l'ADN est marqué avec la sonde fluorescente.⁽³²⁻³⁸⁾ Ces travaux étudient l'adsorption électrostatique des molécules organiques et d'ADN à l'extérieur des surfaces des vésicules cationiques. Des ions organiques et des

polyélectrolytes peuvent s'attacher à l'extérieur des surfaces chargées des vésicules par des interactions avec des ions de tensioactif non associées présents dans la bicouche de la vésicule. La séquestration d'ions organiques par des vésicules catanioniques est très efficace et peut être utilisée pour la séparation de molécules organiques chargées. D'autre part, une sonde fluorescente attachée à l'ADN permet de montrer que l'ADN s'attache plus fortement à la surface extérieure des vésicules catanioniques chargées positivement. De plus, cela peut stabiliser les vésicules à des concentrations de tensioactif faibles, proches de la concentration d'agrégation critique.

L'analyse de différents événements physico-chimiques comme l'étude des transitions micelle-vésicule,^(29, 39) qui ont lieu dans les systèmes catanioniques, peuvent être réalisés en utilisant des modèles fluorescents. Dans ce contexte, Gao *et al.*⁽³⁹⁾ ont synthétisé un nouveau type de sonde fluorescente : 12-(N-dansyl)aminododecanate de sodium nommé 12-DAN-ADA (Figure IV.13).

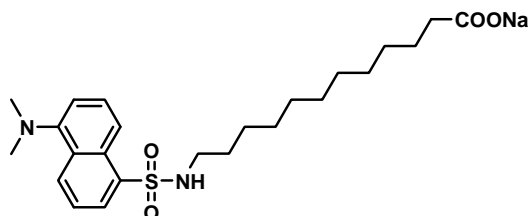


Figure IV.13 Structure chimique de 12-DAN-ADA

L'utilisation de cette sonde fluorescente avec les systèmes SOS/CTAB et SDBS/DTAB montre que le tensioactif fluorescent peut former deux types d'agrégats avec des mélanges catanioniques et avec des systèmes cationiques à double chaîne. Les changements des propriétés fluorescentes de cette molécule permettent d'évaluer la transition de micelles à vésicules. Ces changements sont liés aux arrangements moléculaires et à une diminution de la polarité de son microenvironnement. De plus, cette nouvelle molécule est plus adaptée pour ce type d'études que des autres sondes fluorescents couramment employées comme le pyrène ou le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène).

L'étude du processus de vésiculation et d'interaction entre vésicules des systèmes catanioniques peut aussi être réalisée par des expériences de fluorescence. Par exemple, l'étude de l'interaction du système formé par le copolymère HSMA (anhydride maléique-styrène) et $C_{12}Et_3$ (bromure de dodecyltriéthylammonium) a été réalisée par FRET en utilisant la paire donneur/accepteur NBD-PE/Rh-PE (N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole phosphatidylethanolamine/rhodamine-phosphatidyléthanolamine).⁽²³⁾

D'autre part, la détermination de la microviscosité des membranes bimoléculaires MGCA (chlorure de monoglycerylcetyldiméthylammonium)/SOS (octylsulfate de sodium) a été réalisé par mesure de la polarisation de fluorescence en employant DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) comme marqueur fluorescent.⁽²⁸⁾ Une augmentation de la polarisation de fluorescence correspond à une augmentation de la microviscosité de la partie hydrophobe de la membrane.

Il est aussi possible de déterminer la taille du pore des agrégats cationiques icosaèdre formés par le système acide myristique/bromure de cetyltriméthylammonium par FRAP.⁽³⁰⁾ Pour cela, le marqueur Oregon Green 488 isothiocyanate (F₂FITC) a été utilisé. Le F₂FITC est chargé négativement et soluble dans l'eau. L'augmentation de l'intensité de fluorescence observée sur les surfaces des hexagones et des pentagones des agrégats icosaèdres résulte de l'adsorption de molécules de F₂FITC sur la surface des agrégats. L'intensité de fluorescence détectée dans les cavités montre que la sonde est capable de pénétrer dans les agrégats ce qui indique la présence de pores.

Dans notre laboratoire, quelques exemples ont aussi été développés. La stratégie consiste en le greffage de sondes fluorescentes sur l'un des composants de l'entité cationique. La sonde fluorescente participe ainsi au phénomène d'agrégation. Dans ce contexte, Blanzat *et al.* ont mis au point un système cationique fluorescent dans lequel le fluorophore fait partie du système cationique (Figure IV.14).⁽⁴⁰⁾ La préparation de ce tensioactif cationique fluorescent consiste en le mélange stœchiométrique d'un aminolactitol et d'un acide gras dérivé de la coumarine.

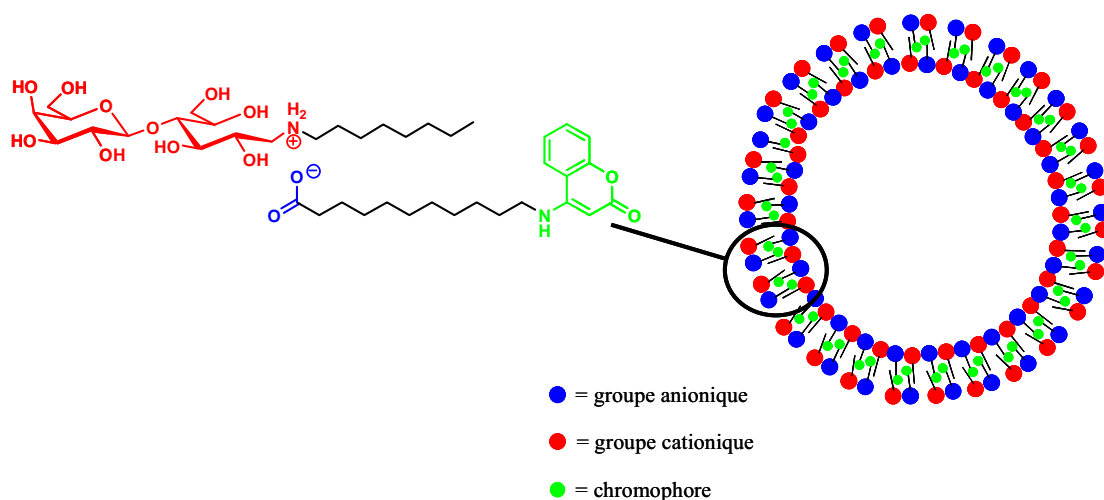


Figure IV.14 Système cationique fluorescent dérivé de la coumarine

Ce système catanionique fluorescent présente différentes morphologies dans l'eau : des vésicules, des hélices, des transitions hélice/tubule, des tubules. Cette grande variété de morphologies est surprenante par rapport aux systèmes catanioniques non fluorescents développés au laboratoire^(41, 42) qui forment spontanément des vésicules et des phases lamellaires dans l'eau. La présence d'un groupement chiral comme un sucre n'est pas suffisante pour induire la formation d'hélices ou de tubules. Dans ce cas, il existe un effet double, la chiralité du résidu sucre et les interactions π - π stacking entre les groupes coumarine qui conduit à l'immobilisation des chaînes et à l'augmentation de l'hélicité.

Enfin, Soussan *et al.*^(26, 43) ont synthétisé un tensioactif catanionique tricaténaire dérivé de sucre pour l'encapsulation de principes actifs nommé **TriCat** (Figure IV.15). En effet, les trois chaînes hydrophobes permettent la formation spontanée de vésicules.

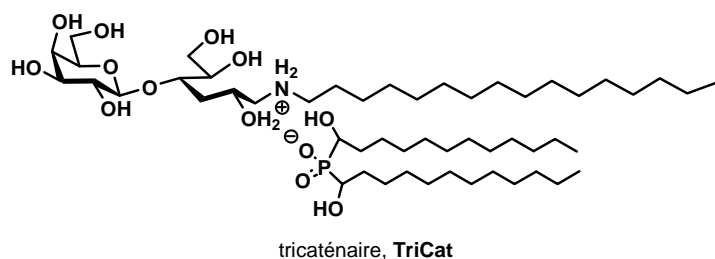


Figure IV.15 Structure chimique du tensioactif catanionique **TriCat**

Un autre tensioactif catanionique fluorescent a été mis au point par Soussan *et al.*^(26, 43) afin de jouer le rôle de principe actif et de marquer la bicouche des vésicules formées par le composé catanionique **TriCat**.

Afin d'étudier le mécanisme d'interaction de ces vésicules catanioniques avec des cellules, un tensioactif catanionique fluorescent a été mis au point par Soussan *et al.*^(26, 43) pour marquer la bicouche des vésicules formées par le composé catanionique **TriCat**.

Ce tensioactif fluorescent a été élaboré par addition de l'acide 12-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodécanoïque à une solution aqueuse de N-hexadécylamino-1-déoxylactitol dans l'eau (Figure IV.16).

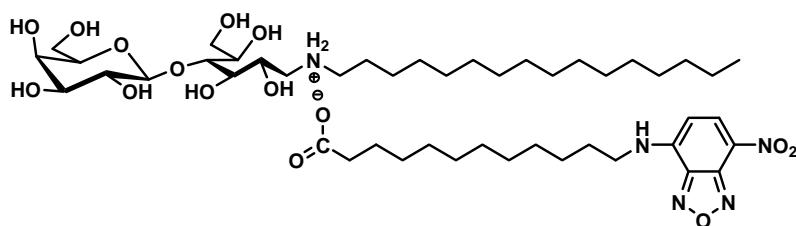


Figure IV.16 Structure du *N*-hexadécylammonium-1-déoxylactitol 12-(*N*-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodécanoate

Cette association catanionique nommée **FluoCat** est ensuite insérée dans la membrane des vésicules catanioniques formées par le **TriCat** en contrôlant de ne pas perturber leur agrégation à pH physiologique. Des objets avec la même distribution de tailles que les vésicules formées par le **TriCat** seul, sont obtenues pour un rapport **TriCat/FluoCat** de 19/1.

Le spectre d'absorption UV/visible de ce mélange montre qu'il existe un déplacement des longueurs d'ondes d'absorption lorsque le tensioactif fluorescent est inséré dans la bicouche de **TriCat**. Cela permet de confirmer l'insertion du **FluoCat** au sein de la bicouche des vésicules formées par le **TriCat**.

Ces études permettent aussi de suivre par microscopie confocale⁽⁴⁴⁾ le devenir des vésicules ainsi formées, de comprendre le mécanisme consécutif à l'étape de fusion des deux bicouches et d'évaluer le potentiel des vésicules catanioniques à vectoriser des principes actifs hydrophobes insérés dans leur bicouche.

IV.5 Stratégie pour la mesure de la stabilité des paires d'ions

La première méthode consiste en la préparation d'un système catanionique où les deux parties constitutives possèdent un chromophore. Les deux espèces fluorescentes sont choisies de telle façon que la longueur d'onde d'émission du premier marqueur corresponde à la longueur d'onde d'absorption du deuxième marqueur. Quand les deux marqueurs sont près l'un de l'autre, l'excitation du premier permet l'excitation du second. Finalement, si le signal d'émission du dernier marqueur est observé, cela signifie qu'il a du FRET et traduit le fait que les deux entités qui composent le tensioactif catanionique sont proches et que la paire d'ions n'est pas dissociée (Figure IV.17).

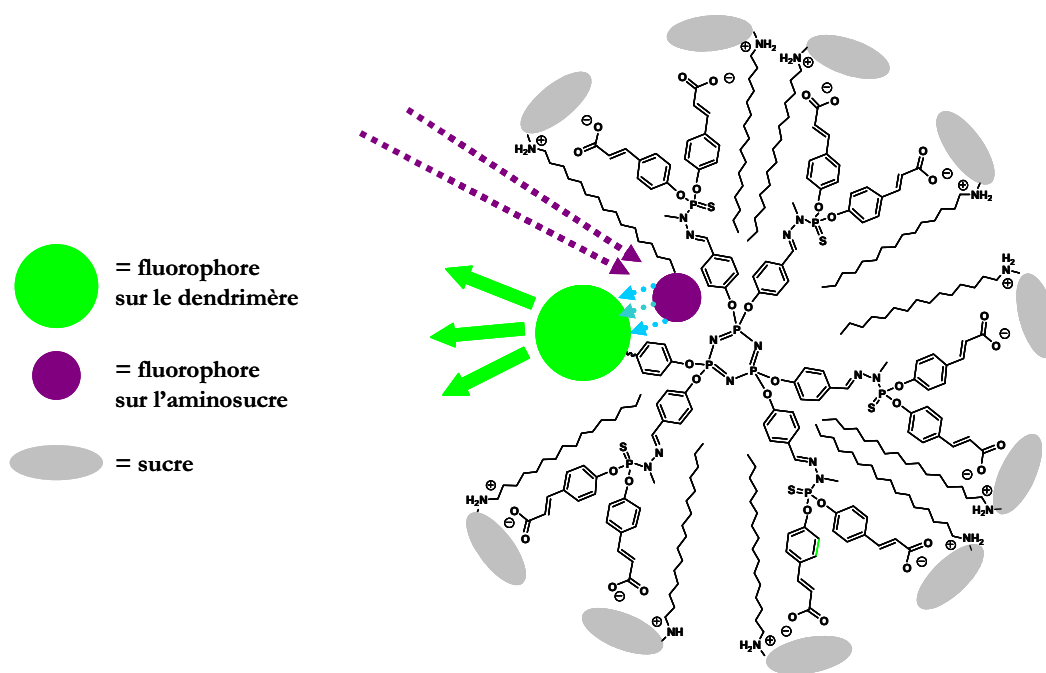


Figure IV.17 Stratégie pour mesurer la stabilité de la paire d'ions par FRET

La deuxième méthode repose sur l'utilisation d'un aminolactitol fluorescent pour étudier l'influence de la formation des systèmes catanioniques sur les propriétés fluorescentes. La mesure des changements de l'intensité de fluorescence de l'aminolactitol fluorescent provoqués par la modification de l'environnement du groupe chromophore nous informe si l'aminolactitol est incorporé ou pas à la structure dendritique. Si l'intensité de fluorescence de l'aminolactitol augmente, cela signifie que ce fluorophore se trouve dans un environnement plus lipophile (l'intérieur du dendrimère) et que la paire d'ions est associée (Figure IV.18).

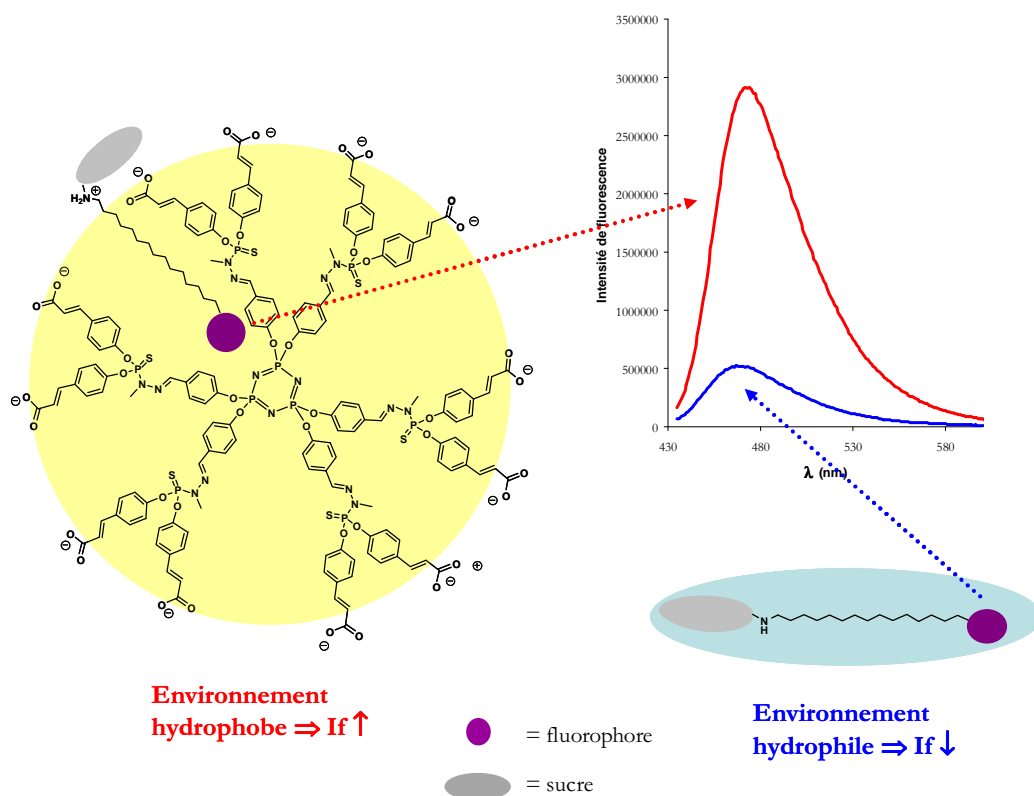
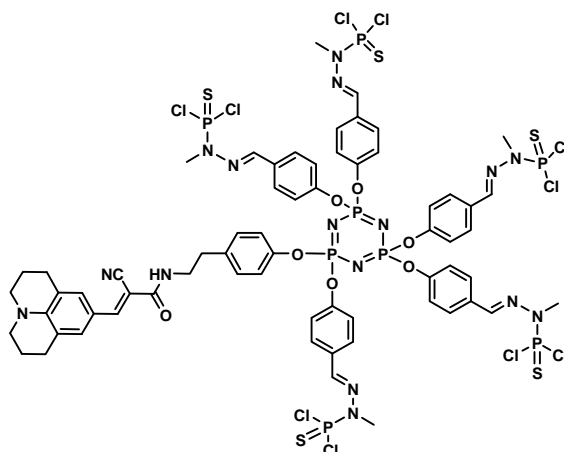


Figure IV.18 Stratégie employée pour la détermination de la stabilité de la paire d'ions par modifications de l'intensité de fluorescence en fonction de l'environnement du chromophore

IV.6 Synthèse des marqueurs fluorescents

IV.6.1 Synthèse du dendrimère fluorescent à cœur julolidine 11-Df

Pour la synthèse du nouveau dendrimère analogue fluorescent à terminaisons acide cinnamique **11-Df**, nous avons d'abord conçu le dendrimère précurseur avec 10 atomes de chlore à la surface du composé **12** (Figure IV.19). La synthèse de ce dendrimère **12** a été mise au point pour la première fois par Rolland *et al.* au laboratoire.⁽⁹⁾ Nous pouvons remarquer que la synthèse du dendrimère **11-Df** à terminaisons acide cinnamique n'implique pas la réaction de Knoevenagel employée pour la synthèse de l'analogue non fluorescent **1c-G1** car cette méthode implique des conditions de réactions très agressives qui peuvent abimer la structure du chromophore.⁽⁴⁵⁾ Notre stratégie consiste à greffer le phénol acide cinnamique protégé **13** et sa déprotection postérieure sur la structure dendritique.



12

Figure IV.19 Dendrimère fluorescent précurseur du dendrimère fluorescente à terminaisons acide cinnamique **12**

Le phénol **13** est ainsi greffé sur la surface du dendrimère **12** par substitution nucléophile des atomes de chlore. Par la suite, le dendrimère **14** est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 73% (Schéma IV.4).

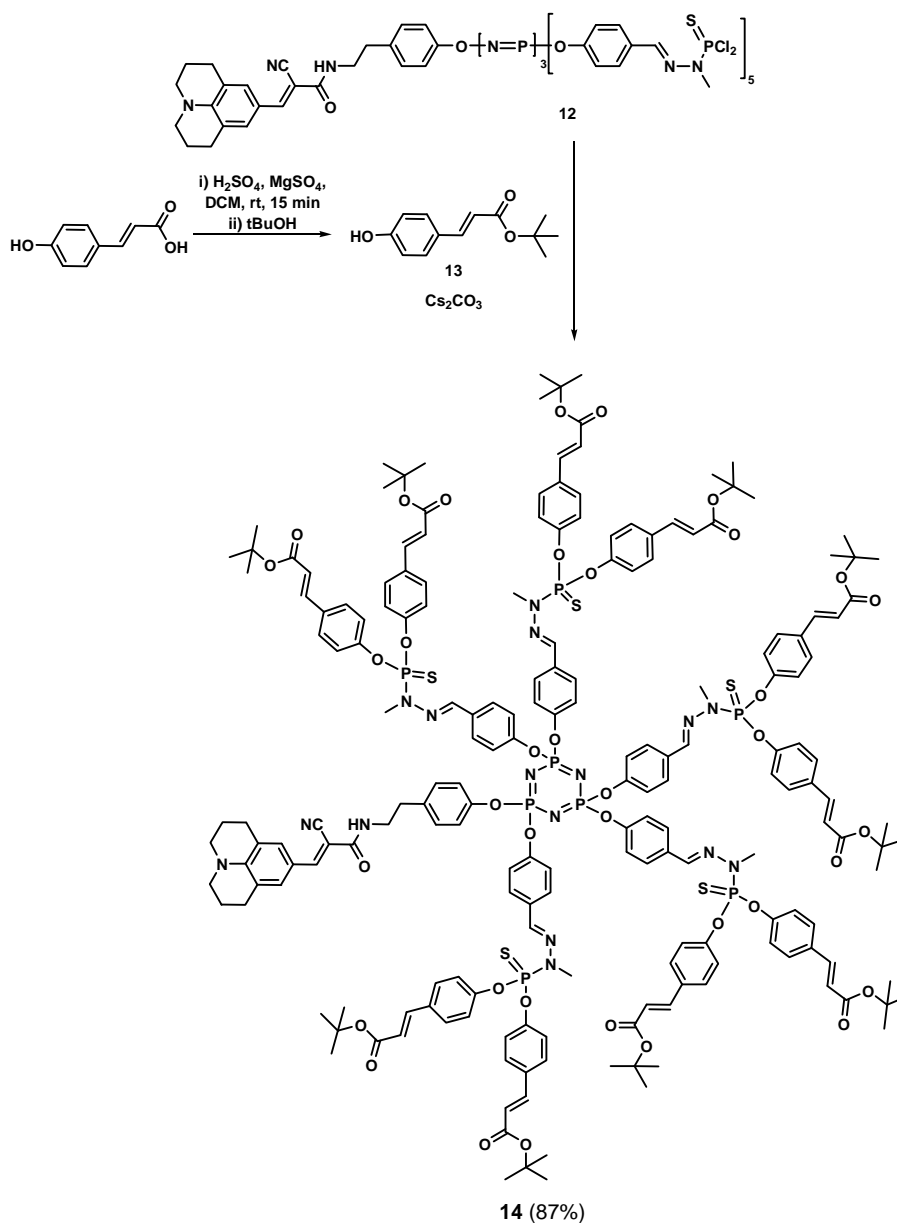


Schéma IV.4 Synthèse du dendrimère fluorescent à terminaisons tert-butyle ester de l'acide cinnamique **14**

De nouveau, ce dendrimère présente trois signaux sur le spectre de RMN du phosphore 31 : un signal correspondant aux phosphores du cœur ($\delta = 8,4 \text{ ppm}$) et l'autre correspondant aux phosphores des points de divergence ($\delta = 61,8 \text{ et } 61,9 \text{ ppm}$). L'asymétrie de la macromolécule fluorescente est traduite par la multiplicité des signaux des phosphores des points de divergence (Figure IV.20).

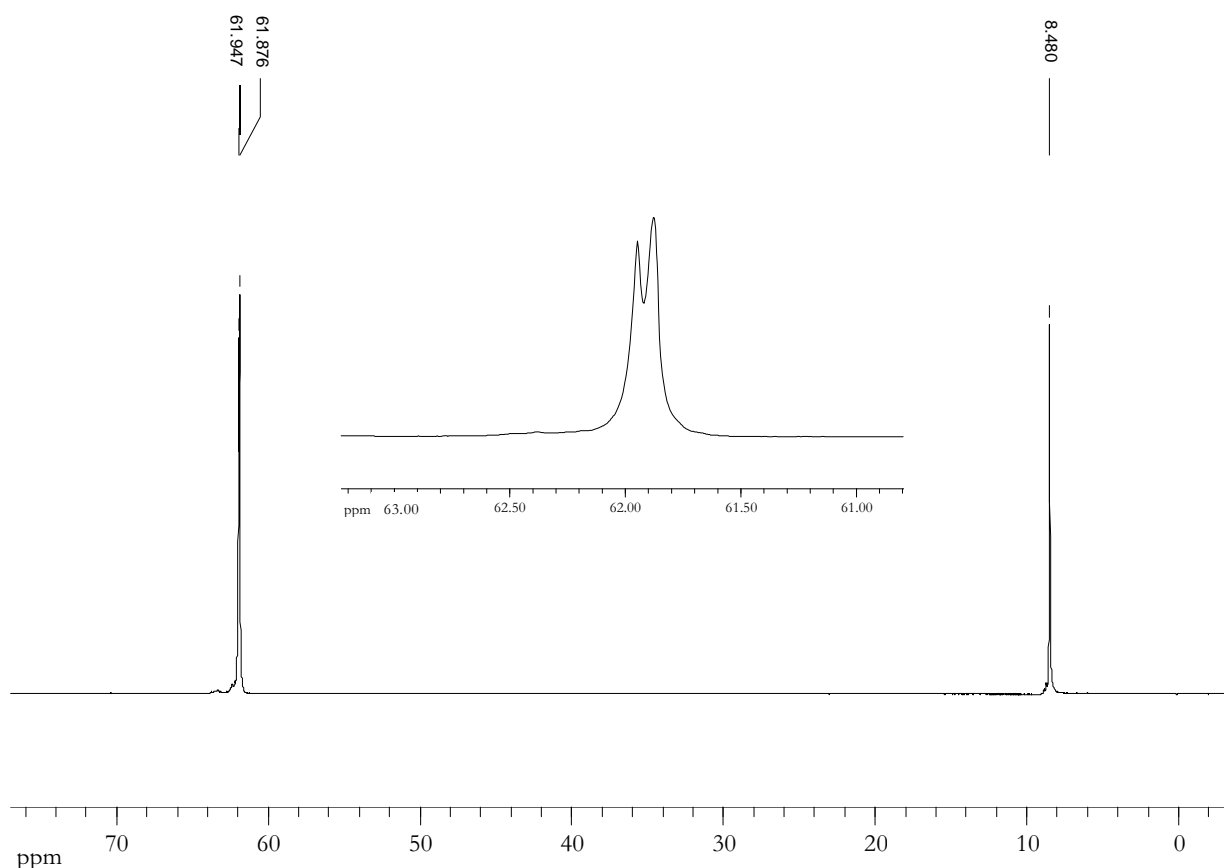
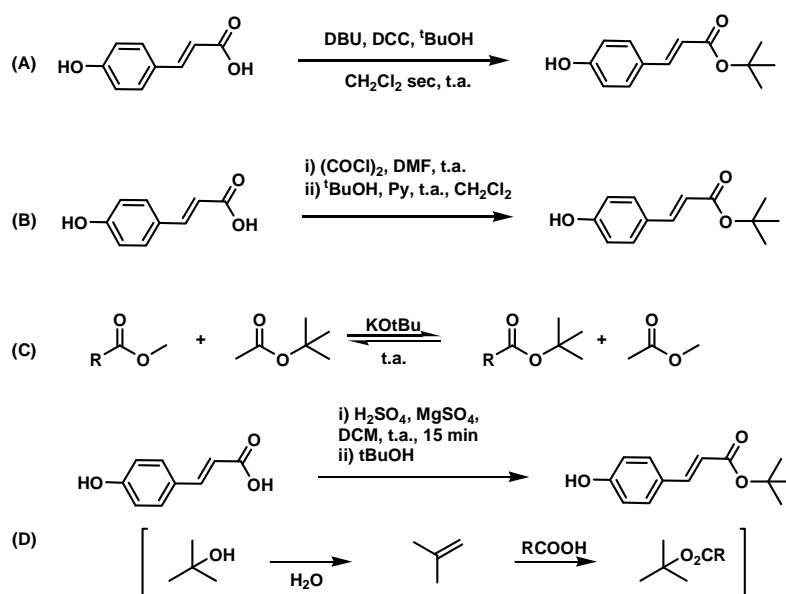


Figure IV.20 Spectre de RMN du phosphore 31 du composé **14**

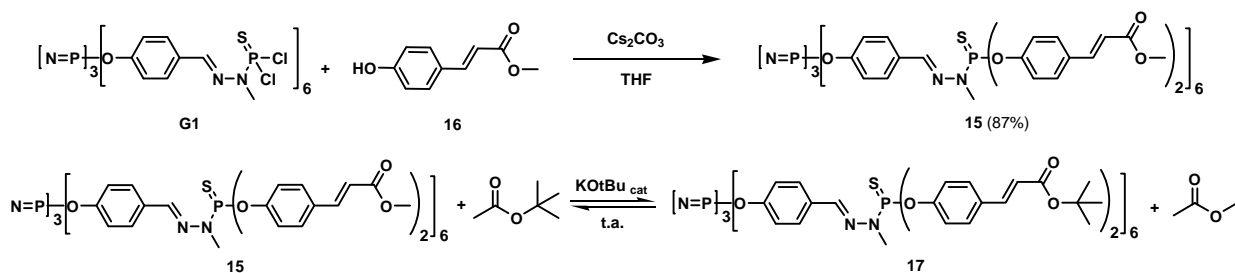
Le greffage du phénol **13** à la structure dendritique est aussi vérifié par RMN du proton. L'apparition du signal du proton éthylénique Ph-CH à 6,24 ppm ($^3J_{\text{HH}} = 15,9$ Hz) et le signal correspondant au groupement *tert*-butyle à 1,52 ppm montrent l'incorporation du phénol dans la structure dendritique fluorescente.

Même si la synthèse du phénol **13** semble simple *a priori*, elle n'est pas évidente. Les propriétés qui font que les groupes ester de *tert*-butyle sont de très bons groupes protecteurs rendent également plus difficile leur préparation que celle des autres esters. Pour cela, nous avons essayé plusieurs stratégies qui sont récapitulées dans le Schéma IV.5.

Schéma IV.5 Différentes stratégies pour la préparation du phénol **13**

Le premier essai (**A**) consiste en la réaction de couplage entre l'acide *p*-hydroxycinnamique et le *tert*-butanol en utilisant comme agent de couplage la DCC. L'analyse du spectre de RMN du proton du mélange réactionnel révèle que la réaction n'a pas lieu par l'absence du signal caractéristique du groupe *tert*-butyle qui correspond au signal de l'ester. Un deuxième essai (**B**) consiste à transformer l'acide en le chlorure de l'acide *p*-hydroxycinnamique. Ce dernier sans purification antérieure agit directement avec le *tert*-butanol. De cette façon, nous nous attendons à obtenir **13** par un processus de substitution nucléophile. Dans ce cas, l'analyse par RMN du proton montre un signal à 1,55 ppm correspondant au groupe *tert*-butyle de l'ester final. Finalement, les essais de purification par extraction basique puis par chromatographie sur gel de silice, nous ont permis d'obtenir un mélange inexploitable à cause de la décomposition du produit espéré.

Par la suite nous avons identifié une méthode remarquable dans la littérature⁽⁴⁶⁾ (**C**). Elle consiste en un processus de trans-estérification catalysé par un alkoxy de métaux alcalins (Schéma IV.6). Cette méthode n'est pas compatible avec la présence d'une fonction phénol, pour le tester le dendrimère **15** a été synthétisé par le procédé habituel.¹⁵ Le phénol **16** a été obtenu par estérification de l'acide *p*-hydroxycinnamique et du méthanol avec un rendement de 41%. Le composé **15** a été caractérisé par RMN du proton, du phosphore 31 et du carbone 13. Pour obtenir le dendrimère à terminaisons ester *tert*-butyle **17**, le dendrimère **15** et l'acétate de *tert*-butyle sont mélangés en présence du *tert*-butoxyde de potassium. Malheureusement, le spectre de RMN du proton confirme le manque de réactivité. Quand la même expérience est réalisée sur le phénol **16**, l'ester de *tert*-butyle voulu n'est pas non plus obtenu.

Schéma IV.6 Essai de synthèse du dendrimère **16** par trans-estérification catalysée

La dernière méthode employée (**D**) consiste en la réaction de l'acide carboxylique et de l'isobutylène en présence d'un acide minéral comme catalyseur. L'isobutylène est généré in situ en utilisant comme source le *tert*-butanol.⁽⁴⁷⁾ De cette façon, le phénol **13** est obtenu avec un faible rendement (15%) probablement du à la perte de l'intermédiaire gazeux dans le montage. C'est cette méthodologie que nous avons utilisée. L'étape suivante comprend le greffage de **13** sur la surface du dendrimère fluorescent **12**.

Finalement, la déprotection typique des esters de *tert*-butyle pour avoir les acides carboxyliques correspondants (Schéma IV.7) est achevée en utilisant l'acide trifluoroacétique. Le seul sous-produit est l'isobutène qui est facilement éliminé par évaporation. Le dendrimère complètement déprotégé **11-Df** est isolé avec un rendement quantitatif.

La déprotection des esters de *tert*-butyle est vérifiée par la disparition des signaux du *tert*-butyle qui correspondent aux protons du méthyle à 1,52 ppm dans le spectre de RMN du proton et les carbones primaire et quaternaire respectivement à 28,2 et 80,6 ppm dans le spectre de RMN du carbone 13. Cela est aussi confirmé par spectroscopie d'infrarouge (FT-IR). La bande forte d'élongation du groupement C=O des esters de *tert*-butyle à 1703 cm⁻¹ est remplacée par la bande correspondant à l'acide carboxylique à 1690 cm⁻¹.

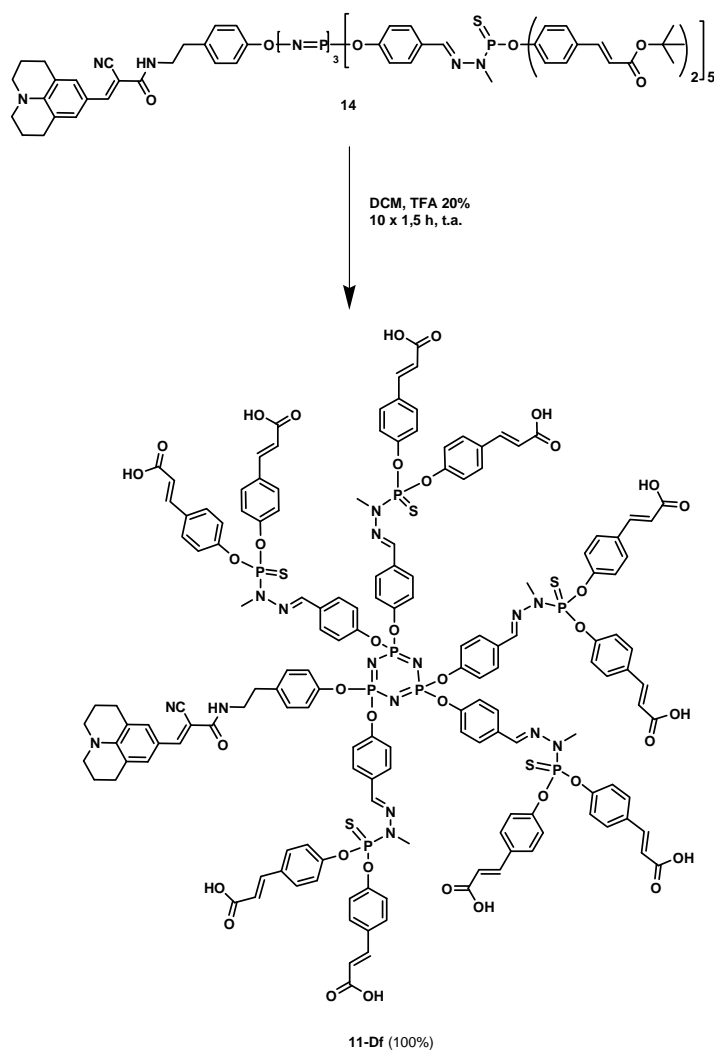


Schéma IV.7 Synthèse du dendrimère fluorescent portant des fonctions acide cinnamique à la surface **11-Df**

Aucune modification chimique n'est observée pour le motif fluorescent.

IV.6.2 Synthèse de l'aminosucré fluorescent 18 ou Lf

Dans un premier temps, nous avons envisagé la synthèse de l'aminolactitol fluorescent représenté dans la Figure IV.21, dont les caractéristiques de fluorescence conviennent pour observer du FRET avec **11-Df** le cas échéant.

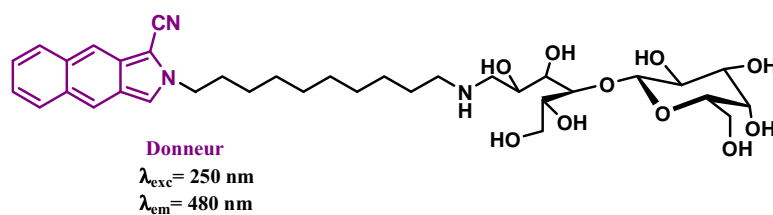


Figure IV.21 Premier aminosucré fluorescent choisi pour les expériences de FRET

La synthèse de cet aminosucre à chromophore benzoisindole commence par la formation du benzoisindol par condensation du dialdéhyde **19** et de la diamine monoprotégée **20** selon le procédé décrit par Mallouli *et al.* (Schéma IV.8). Ensuite l'amine terminale de **L** sera déprotégée pour subir une condensation avec le α -D-lactose monohydrate suivie de la réduction par le NaBH_4 pour obtenir ainsi cet aminosucre fluorescent.

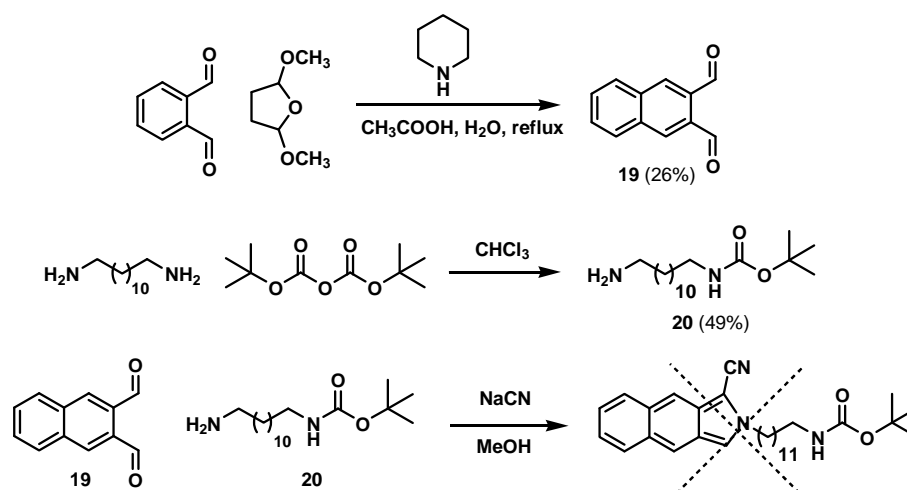


Schéma IV.8 Premier essai de synthèse d'aminosucre fluorescent

Malheureusement, la purification de ces produits intermédiaires devient très compliquée par chromatographie sur gel de silice probablement dû au manque de stabilité de ces produits sur le gel de silice. La condensation entre le dialdéhyde **19** et la diamine monoprotégée **20** qui conduit à la formation du benzoisindole est vérifiée par RMN du proton par la disparition du signal correspondant aux groupes aldéhyde. Cependant leur purification par chromatographie est aussi problématique. Pour cette raison, nous avons décidé de changer la structure de l'aminosucre fluorescent avant de continuer cette synthèse.

Nous avons trouvé un autre candidat, un dérivé couramine **18** ou **Lf** (sa λ_{max} d'émission est aussi vers 480 nm) dont la structure est décrite dans la Figure IV.22. Il présente la même taille (calculé) que le N-hexadécylaminolactitol **L16** et une lipophilie similaire (log P calculé par Chem Draw) à celle du N-octylaminolactitol **L8**.

Ces aminosucres de référence, le N-octylamino-1-déoxylactitol **L8** et le N-hexadécylamino-1-déoxylactitol **L16** ont été synthétisés en partant du lactose non protégé par une méthode largement utilisée au laboratoire.^(48, 49) Cette méthode est aussi employée pour la synthèse de **Lf**. La réaction spécifique des sucres réducteurs avec les alkylamines, suivie par la réduction de l'imine intermédiaire par le borohydrure de sodium conduit à l'obtention de ces aminosucres.

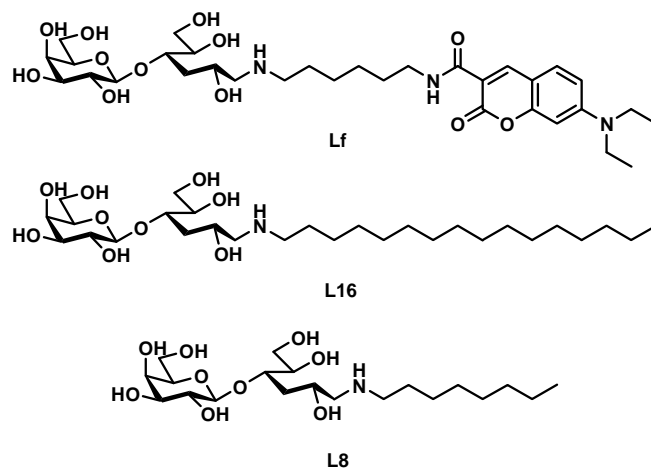
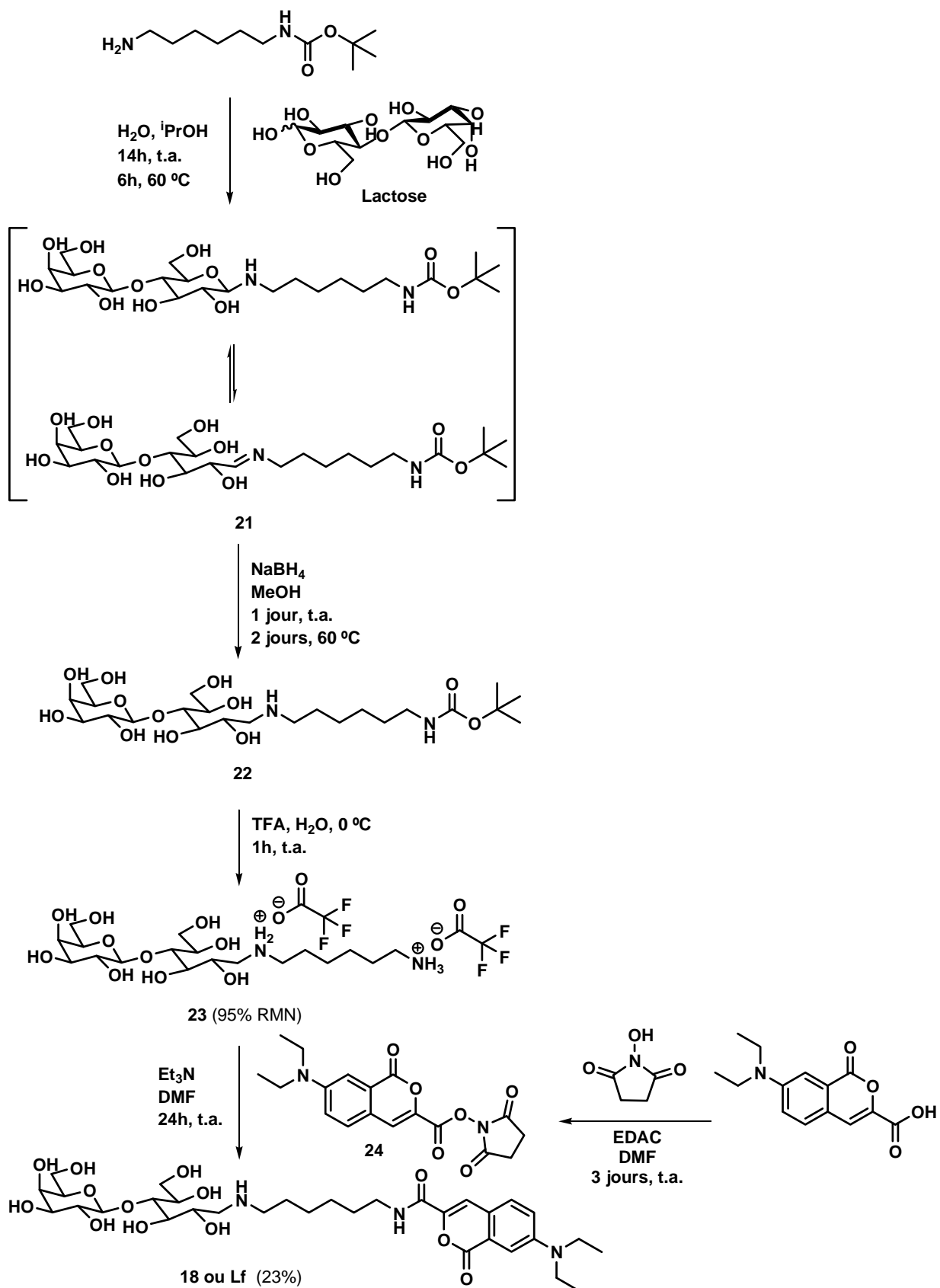


Figure IV.22 Structures de l'aminosucré fluorescent **Lf**, du N-hexadecylaminolactitol **L16** et du N-octylaminolactitol **L8**

La voie de synthèse employée pour obtenir l'aminosucré **Lf** est reportée dans le Schéma IV.9. La première étape est la condensation de la diamine monoprotégée avec le α -D-lactose monohydrate pour obtenir un solide blanc **21** dont la structure peut se trouver sous une forme fermée (amine) ou ouverte (imine). Cette étape est suivie de la réduction de **21** par le NaBH_4 . La formation quantitative de la forme réduite ouverte **22** a lieu. La déprotection de l'amine terminale de **22** est ensuite réalisée en utilisant du TFA (acide trifluoroacétique). Ainsi, on obtient le sel **23** avec une pureté estimée par RMN de 95%.

D'autre part, nous avons préparé le dérivé coumarine **24** qui est employé comme marqueur fluorescent dans l'aminosucré final **18** ou **Lf**. Pour cela, la liaison amide entre la couramine et le NHS (N-hydroxysuccinimide) se forme à l'aide de l'EDAC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) qui est utilisé comme agent d'activation du carboxyle.

Finalement, le couplage peptidique entre le sel **23** et le dérivé couramine **24** a été formé. Cette réaction est catalysée par la triéthylamine pour obtenir l'aminosucré fluorescent **18** ou **Lf** sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 23% après purification par deux chromatographies sur gel de silice. Tous les composés intermédiaires et le sucre final ont été caractérisés par RMN du proton et du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

Schéma IV.9 Voie de synthèse pour l'aminosucré fluorescent **19** ou **Lf**

IV.6.3 Synthèse des assemblages fluorescents 25-(Df(Na)₁₀), 26-(Df(L16)₁₀), 27-(Df(L8)(L16)₉) et 28-(Df(Lf)(L16)₉)

Pour étudier la stabilité des dendrimères non fluorescents 1^c-G1 et 1^d-G1, nous avons préparé les assemblages fluorescents correspondants (Figure IV.23, IV.24, IV.25 et IV.26).

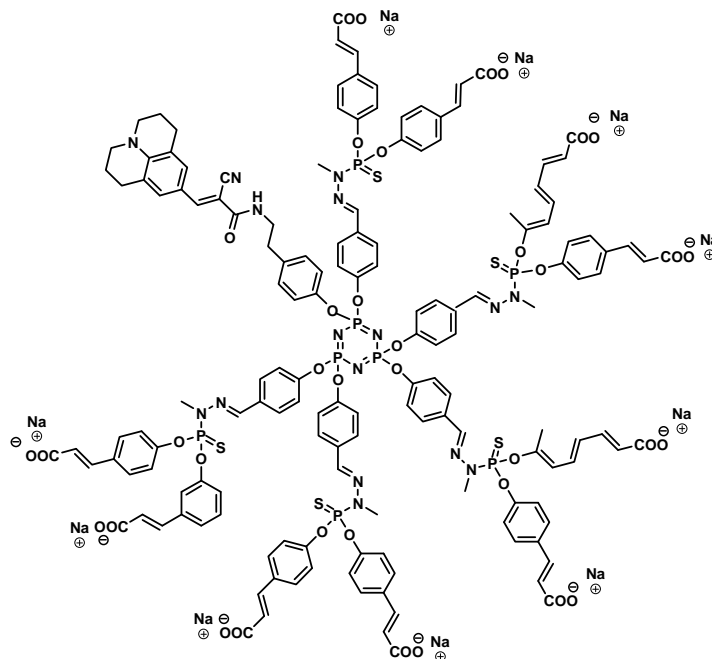


Figure IV.23 Structure du dendrimère fluorescent sel de sodium 25- Df(Na)₁₀

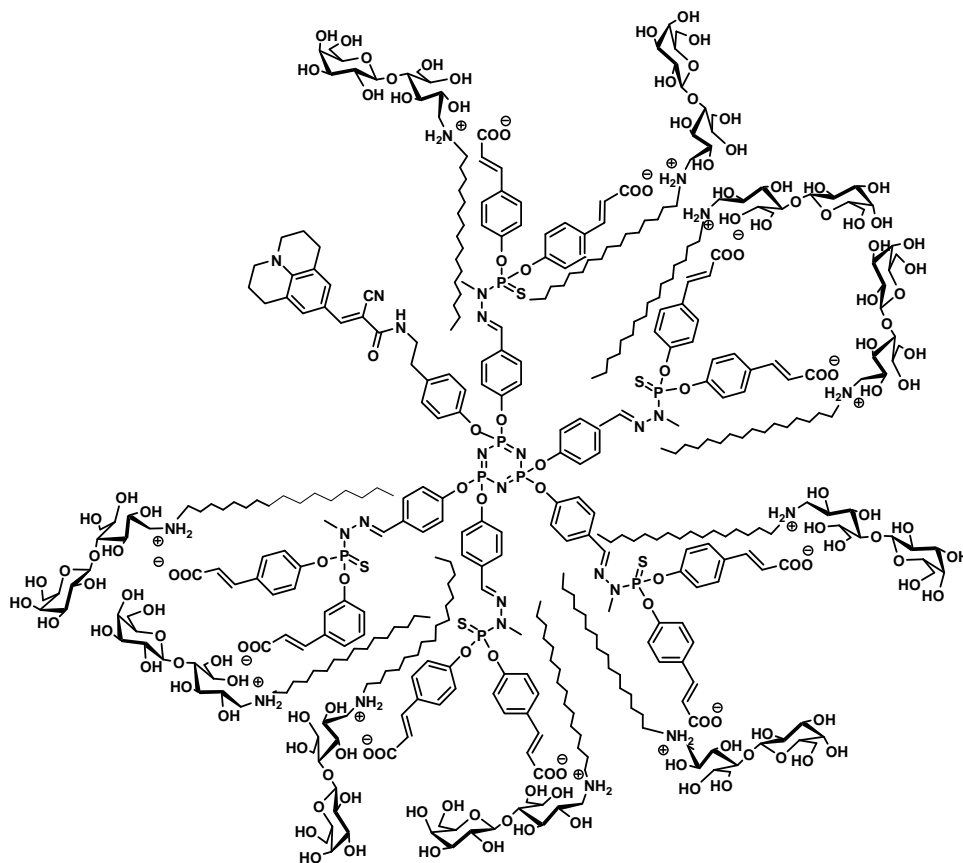


Figure IV.24 Structures des dendrimères fluorescents cationique **26-Df(L16)₁₀**

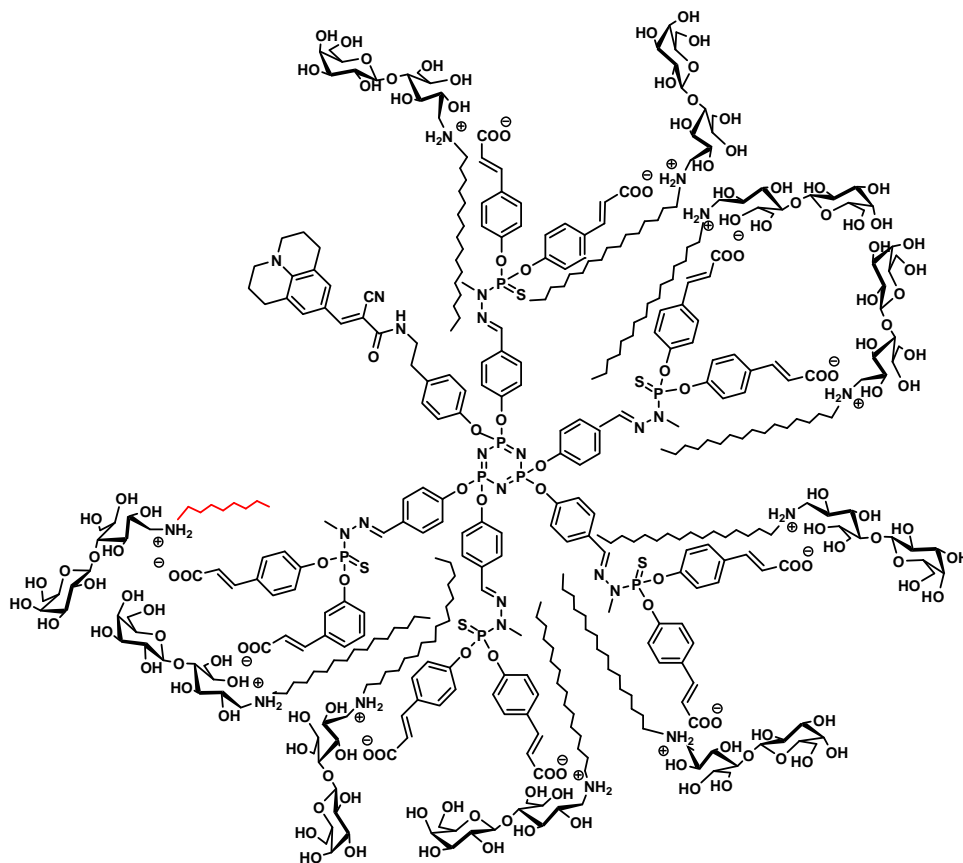


Figure IV.25 Structure d'un représentant de dendrimer cationique fluorescent **27-Df(L8)(L16)₉**

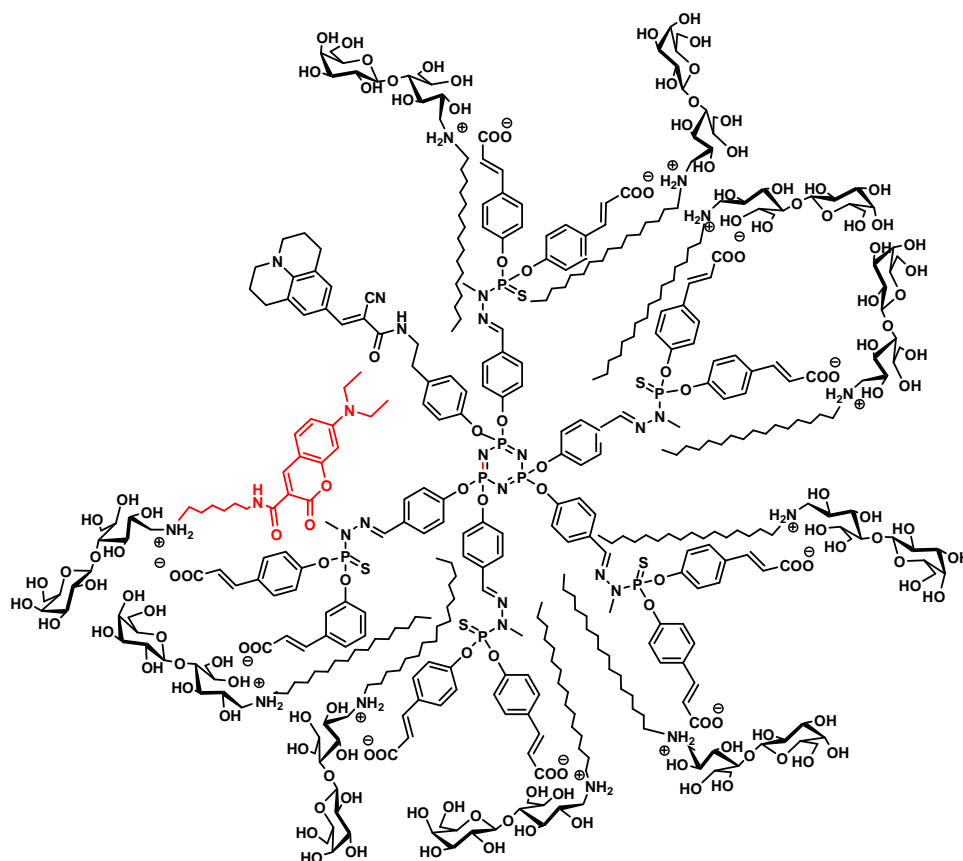


Figure IV.26 Structure d'un représentant de dendrimère fluorescent **28-Df(Lf)(L16)₉**,

Le dendrimère **25-Df(Na)₁₀** est préparé par une simple réaction acide-base entre le dendrimère fluorescent portant dix terminaisons acides **11-Df** et une solution de NaOH en quantités stœchiométriques à 0 °C dans l'eau. La fin de la réaction est accompagnée par la solubilisation totale du matériel dendritique après quelques heures. Le sel de sodium **25-Df(Na)₁₀** est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 95% après filtration sur microfiltre et lyophilisation postérieure.

Pour les assemblages catanioniques **26-Df(L16)₁₀** (Figure IV.24), **27-Df(L8)(L16)₉** (Figure IV.25) et **28-Df(Lf)(L16)₉** (Figure IV.26), le processus d'auto-assemblage entre les terminaisons acides cinnamique du dendrimère et les aminolactitols **L16**, **L8** et **Lf** (Figure IV.22) en quantités stœchiométriques (dendrimère : **LX** : **L16**, 1 : 1 : 9 ; **X** : **8**, **16**, **f**) est mené à température ambiante dans l'eau.

Nous rappelons que le dendrimère **27-Df(L8)(L16)₉**, va nous permettre de comparer son comportement avec celui de **26-Df(L16)₁₀** et de **28-Df(Lf)(L16)₉**, car le **Lf** a la même lipophilie que **L8** et la même taille que **L16**.

Les analogues multivalents et fluorescents du GalCer **26-Df(L16)₁₀** (Figure IV.24), **27-Df(L8)(L16)₉** (Figure IV.25) et **28-Df(Lf)(L16)₉** (Figure IV.26) sont obtenus quantitativement après lyophilisation.

Nous avons vérifié la formation du carboxylate de tous ces nouveaux dendrimères fluorescents. Pour cela, nous avons observé par RMN du carbone 13 la disparition des pics à 170 ppm correspondant à la forme neutre qui est remplacé par le pic à 175 ppm pour la forme carboxylate chargé négativement. Par spectroscopie infrarouge, on note la présence des bandes d'absorption typiques des squelettes dendritiques, la disparition de la bande forte de l'acide carboxylique conjugué (1690 cm^{-1}) et l'apparition de deux bandes à 1559 et 1381 cm^{-1} (vibration du carboxylate conjugué) qui traduit la formation du carboxylate.

IV.7 Etude physico-chimique des assemblages catanioniques fluorescents

Afin de vérifier si le comportement des analogues fluorescents dans l'eau est similaire à celui des dendrimères précédents et si le fait d'introduire des chromophores sur l'assemblage catanionique produit de grands changements, des études de tensiométrie, de diffusion de la lumière et de microscopie électronique à transmission ont été menées.

IV.7.1 Etude par tensiométrie

Dans un premier temps, nous avons mesuré la concentration d'agrégation critique du dendrimère sel de sodium fluorescent **25-Df(Na)₁₀** par tensiométrie par la méthode de la goutte pendante dans l'eau à 25°C (Figure IV.27).

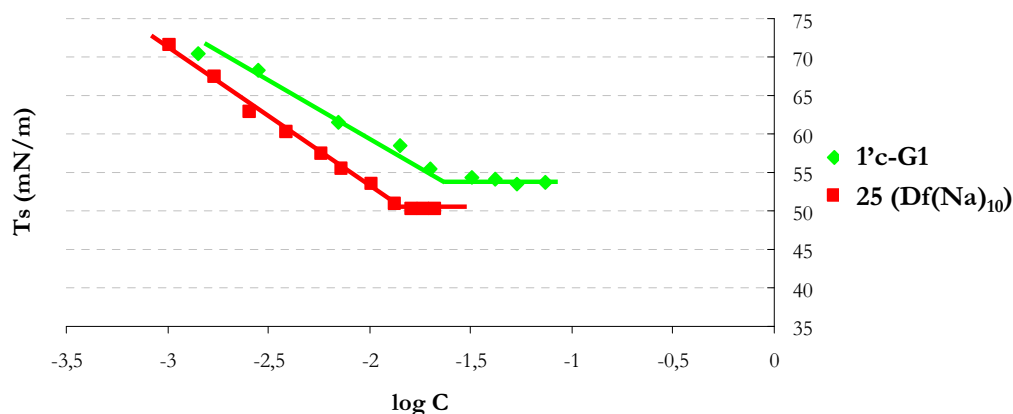


Figure IV.27 Valeurs de CMC pour les dendrimères sel de sodium fluorescent **25-Df(Na)₁₀** et non fluorescent **1'c-G1**

Les résultats obtenus sont réunis et comparés avec ceux obtenus pour son analogue non fluorescent **1^c-G1** dans le Tableau IV.1.

Composé	Concentration Micellaire Critique (mM)	Tension de surface Sur le palier (mN)
1^c-G1	23,8	54,5
25-Df(Na)₁₀	13,3	50,8

Tableau IV.1 Valeurs de CMC et Ts pour les dendrimères sel de sodium

Nous pouvons constater que l'introduction d'un groupe chromophore dissymétrise la structure dendritique et la rend plus hydrophobe. Nous observons donc un comportement attendu : plus le dendrimère est hydrophobe, plus il abaisse la tension superficielle et plus il s'agrège à faible concentration. Nous avons donc constaté que l'introduction du chromophore produit de légers changements sur le comportement de la structure dendritique dans l'eau, dus à la modification de l'hydrophobie et à la perte de symétrie.

D'autre part, nous avons également mesuré les concentrations d'agrégation critiques des différents aminosucres **L8**, **L16** et **Lf**, par tensiométrie en utilisant la méthode de l'anneau selon Du Noüy dans l'eau à 25°C.

Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau IV.2. L'aminosucré fluorescent **Lf** présente un comportement intermédiaire entre celui de **L16** et celui de **L8**. Bien que **Lf** soit le plus hydrophile de la série des aminosucres, la présence d'un groupement aromatique sur sa structure peut favoriser les interactions π - π entre les molécules en formant des agrégats thermodynamiquement stables à plus faibles concentrations.

Composé	Concentration Micellaire Critique (mM)	log P (calculé)
L16	0,11	1,71
L8	3,1	-1,63
Lf	0,55	-2,02

Tableau IV.2 Valeurs de CAC dans l'eau et du log P calculé pour **L16**, **L8** et **Lf**

Enfin, nous avons aussi mesuré les concentrations d'agrégation critiques de la famille de dendrimères fluorescents catanioniques par tensiométrie par la méthode de l'anneau selon Du Noüy dans l'eau à 25°C (Figure IV.28).

Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau IV.3. Nous pouvons remarquer que les dendrimères fluorescents présentent un comportement similaire dans l'eau. Ainsi, la substitution d'une unité d'aminosucrose **L16** dans l'assemblage catanionique par une unité de **L8** ou de **Lf** ne semble pas avoir un effet significatif sur la formation d'agrégats en milieu aqueux. Les valeurs de CAC et l'abaissement de la tension superficielle par ces composés catanioniques fluorescents sont proches. Ces observations permettent de valider à posteriori le choix de **L8** comme analogue non fluorescent de **Lf**.

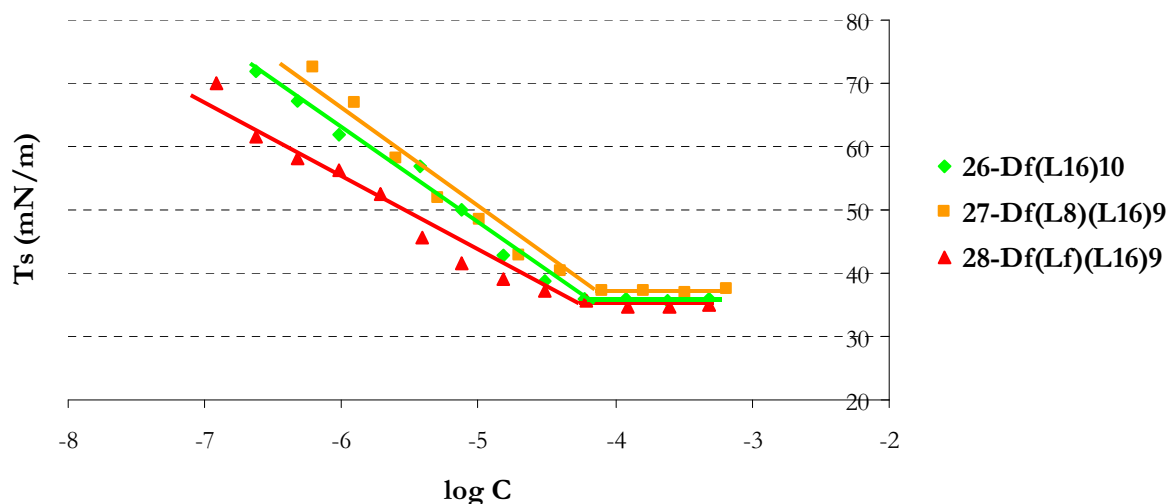


Figure IV.28 Courbes de tensiométrie obtenues pour les dendrimères fluorescents **26-Df(L16)₁₀**, **27-Df(L8)(L16)₉**, et **28-Df(Lf)(L16)₉**

Composé	Concentration d'agrégation critique (μM)	Tension de surface sur le palier (mN/m)
26-Df(L16)₁₀	52	35,9
27-Df(L8)(L16)₉	45	36,9
28-Df(Lf)(L16)₉	29	35,4

Tableau IV.3 Valeurs de CAC et T_s pour la famille de dendrimères fluorescents

Finalement, on notera que ces dendrimères catanioniques fluorescents présentent des CAC supérieures aux concentrations employées pour les expériences de FRET, c'est-à-dire, que la formation d'agrégats n'a pas lieu aux conditions de travail ce qui assure l'absence d'interférences provoquées par un phénomène d'agrégation.

IV.7.2 Etude de la taille et de la forme des objets supramoléculaires fluorescents

L'étude par diffusion de la lumière de ces produits en solution aqueuse montre la présence d'agrégats pour des concentrations supérieures à leur CAC (Figure IV.29).

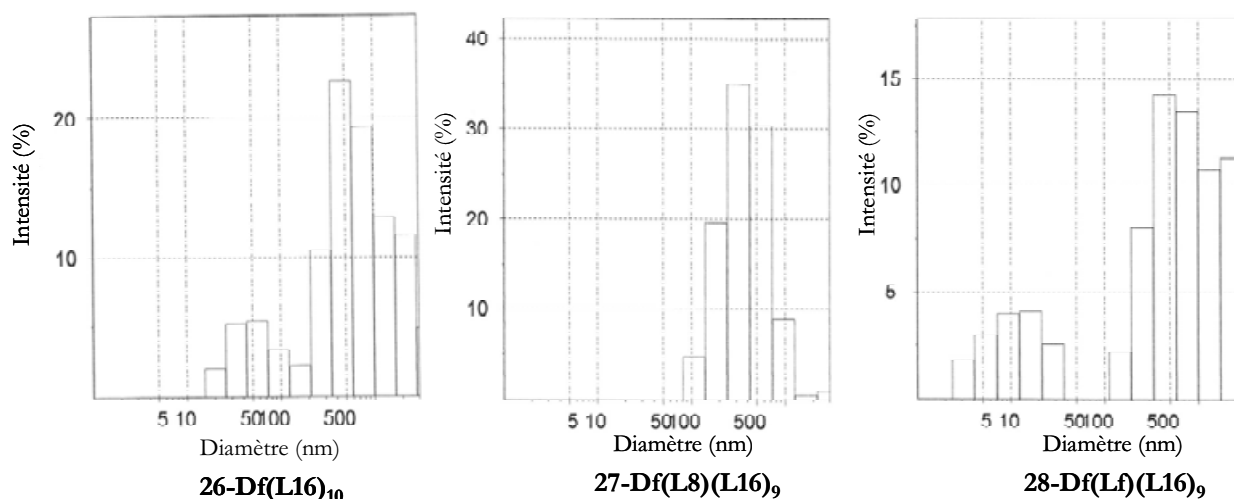


Figure IV.29 Distribution de la taille des objets formés par les assemblages catanioniques fluorescents par diffusion dynamique de la lumière à 25 °C

Dans le cas du dendrimère fluorescent sel de sodium **25-DfNa**, l'étude de la distribution de taille par diffusion quasi-élastique de la lumière et son observation par microscopie électronique à transmission à des concentrations supérieures à sa CAC ne révèlent rien de significatif. De façon similaire à son analogue non fluorescent **1c'-G1**, nous pouvons supposer la formation de micelles car ce dendrimère présente une rupture nette de pente quand la tension de surface est représentée en fonction de la concentration (Figure IV.28).

Les dendrimères fluorescents catanioniques, quant à eux forment des agrégats avec une forte polydispersité. (Figure IV.29). La différence de taille d'objets de cette famille suggère qu'il peut y avoir une redistribution non homogène de la partie cationique.

Nous avons observé que ces systèmes précipitent en solution aqueuse après 4h tandis que leur analogue non fluorescent est stable pendant 4 jours.

D'autre part, nous avons également réalisé des observations de microscopie électronique à transmission de solutions aqueuses de ces composés dendritiques fluorescents à des concentrations supérieures à leur CAC. Ces observations confirment la différence de taille des objets pour les différents assemblages catanioniques fluorescents (Tableau IV.4). Les systèmes **26-Df(L16)₁₀** et **27-**

Df(L8)(L16)₉, forment des objets sphériques difficilement identifiables tandis que le système **28-Df(Lf)(L16)₉**, semble former spontanément des vésicules (Figure IV.30).

Composé	Gamme de diamètres mesurée en MET (nm)
26-Df(L16)₁₀	80-280
27-Df(L8)(L16)₉	150-460
28-Df(Lf)(L16)₉	120-710

Tableau IV.4 Diamètres mesurés par MET des dendrimères fluorescents

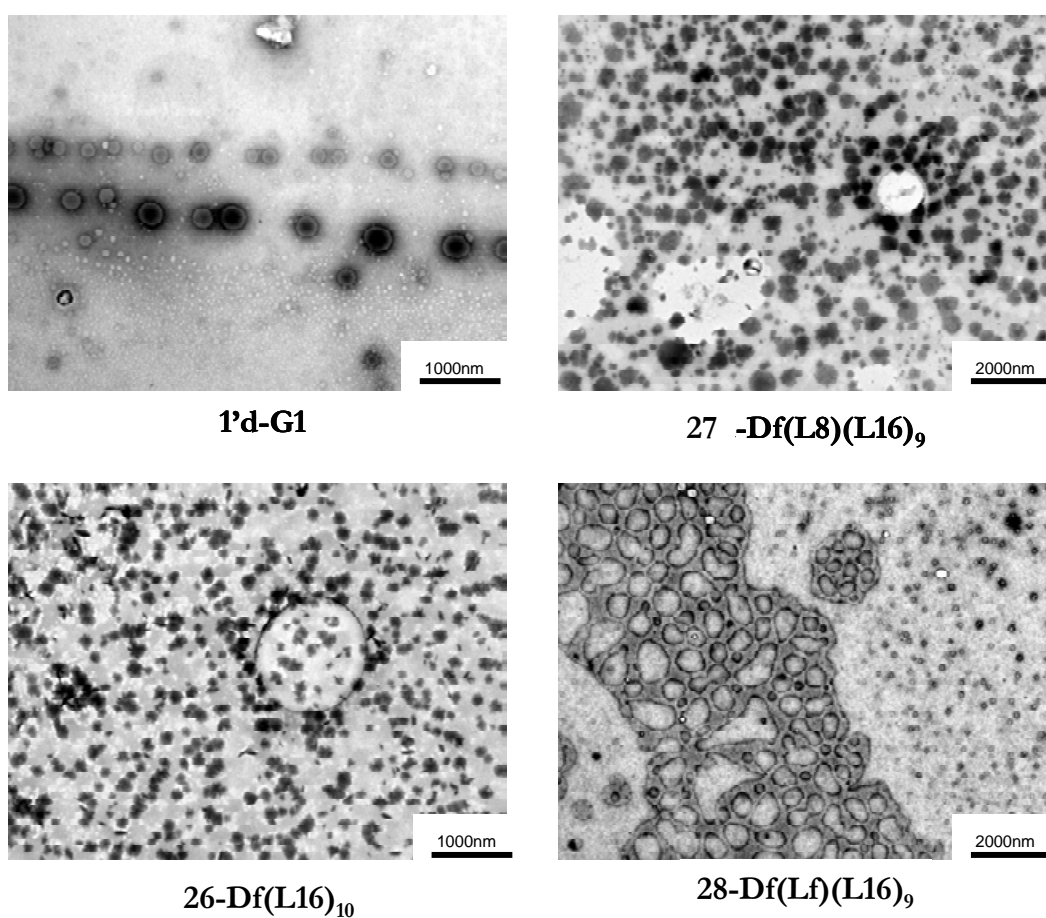


Figure IV.30 Clicbés de MET des systèmes catanioniques fluorescents

IV.8 Etude de la stabilité des complexes d'association des assemblages catanioniques par fluorométrie

IV.8.1 Etude de la stabilité de la paire d'ions par FRET

Dans un premier temps nous avons vérifié que l'accepteur **26-Df(L16)₁₀** ne fluoresce pas lorsqu'il est excité à la longueur d'onde d'excitation du donneur (365 nm, Figure IV.31 A). Malgré cette situation favorable et le fait que les systèmes **25-Df(Na)₁₀** et **26-Df(L16)₁₀** fluorescent dans l'eau après qu'ils soient excités à 450 nm (Figure IV.31 B), qui est proche du λ_{max} d'émission du donneur, et en dépit de nos efforts de synthèse pour construire un système ayant ces propriétés de fluorescence optimal pour observer du FRET nous n'avons pas observé ce phénomène avec le système **28-Df(Lf)(L16)₉**. Au lieu d'observer ce phénomène de FRET nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur (Figure IV.31 C)

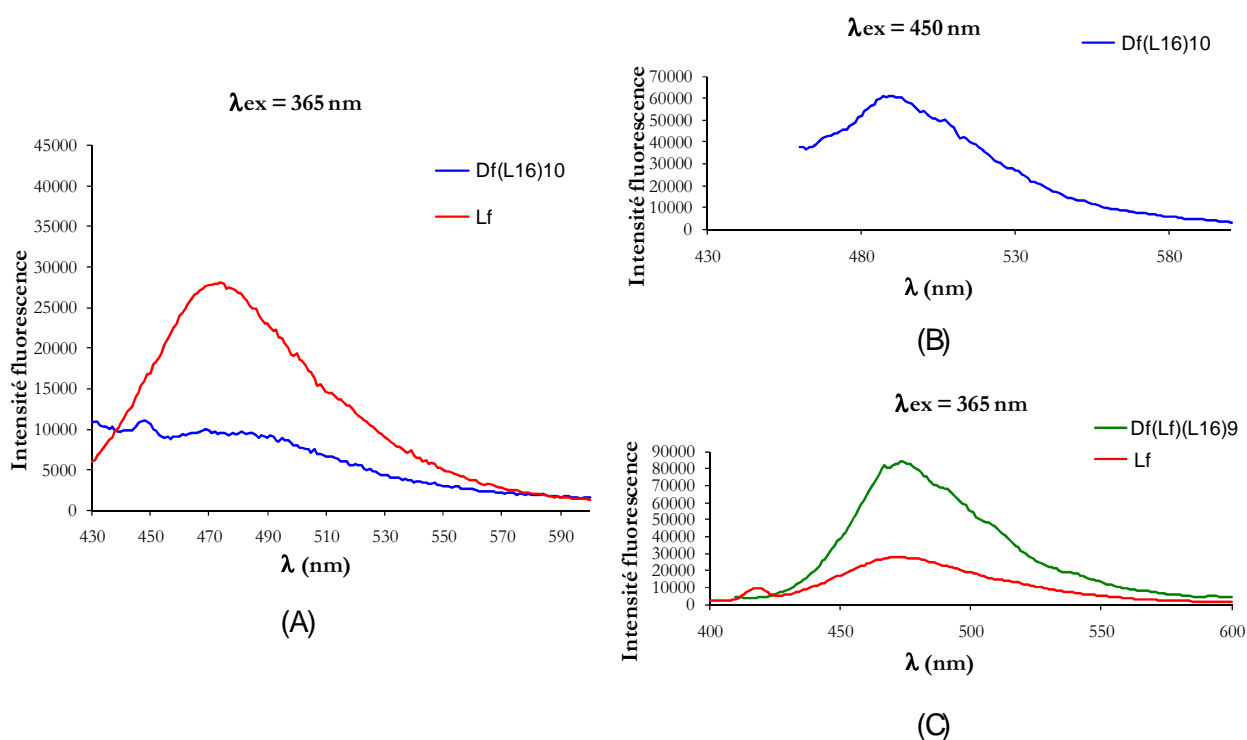


Figure IV.31 (A) Spectre d'émission de l'accepteur à $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ (10^{-5} M). (B) Spectres d'émission du donneur **Lf** et de l'accepteur **26-Df(L16)₁₀** à $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ (10^{-5} M). (C) Spectres d'émission du donneur **Lf** seul et du donneur **Lf** dans le système **Df(Lf)(L16)₉** à $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ (10^{-5} M)

Une des hypothèses pouvant expliquer cet échec pourrait être liée à la modification de l'environnement proche des chromophores au sein de l'assemblage catanionique. En effet, cet échec est difficile à expliquer au vu de l'augmentation de fluorescence du donneur **Lf** lors de la formation de l'assemblage catanionique. Ainsi, nous avons mis au point une autre méthode pour la

détermination des constantes de dissociations de ces assemblages catanioniques qui est basée sur la mesure de ces modifications des propriétés de fluorescence.

IV.8.2 Détermination des constantes de dissociation par fluorimétrie

La spectroscopie de fluorescence est aussi utilisée pour évaluer les interactions entre des systèmes qui contiennent des fluorophores dont les propriétés spectroscopiques sont modifiées lors d'une interaction intermoléculaire.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ Ces changements sont causés par des altérations du microenvironnement du fluorophore par désactivation^(53, 54) ou amélioration⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ de ses propriétés de fluorescence.

Dans ce contexte, nous avons utilisé les changements de l'intensité de fluorescence de l'aminosucrose **Lf** provoqués par les modifications de l'environnement du chromophore. Ainsi, l'aminosucrose **Lf** dans une solution de PBS (pH physiologique) (Figure IV.31) présente une intensité de fluorescence faible et cette intensité de fluorescence augmente en présence des dendrimères **Nc-G1** à la même concentration. Cela signifie que le dendrimère apporte un environnement plus lipophile au fluorophore polyaromatique, et que l'aminosucrose est incorporé dans la structure dendritique (Figure IV.32).

Cette observation nous a permis d'utiliser une méthode⁽⁵⁸⁾ pour déterminer les constantes de dissociation des complexes catanioniques **dendrimère-L**.

Cette méthode consiste en la mesure de l'intensité de fluorescence de l'aminosucrose **Lf** à une concentration fixe en présence des différents dendrimères à différentes concentrations.

Pour cela, nous avons préparé des solutions des dendrimères sels de sodium **Nc-G1** dans le PBS à 0,15M pour les concentrations suivantes : 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, 30, 40, 60, 100 μM . L'aminosucrose fluorescent **Lf** est ajouté avec une concentration finale de 1 μM dans toutes les solutions. Nous avons ensuite mesuré l'intensité de fluorescence de chaque solution. Cette séquence de mesures a été réalisée sur trois séries pour chaque concentration. Ces valeurs sont représentées dans la courbe d' I_f en fonction de la concentration qui montre qu'à des concentrations faibles de dendrimère, l'intensité de fluorescence augmente et qu'elle est saturée à concentrations élevées (Figure IV.33).

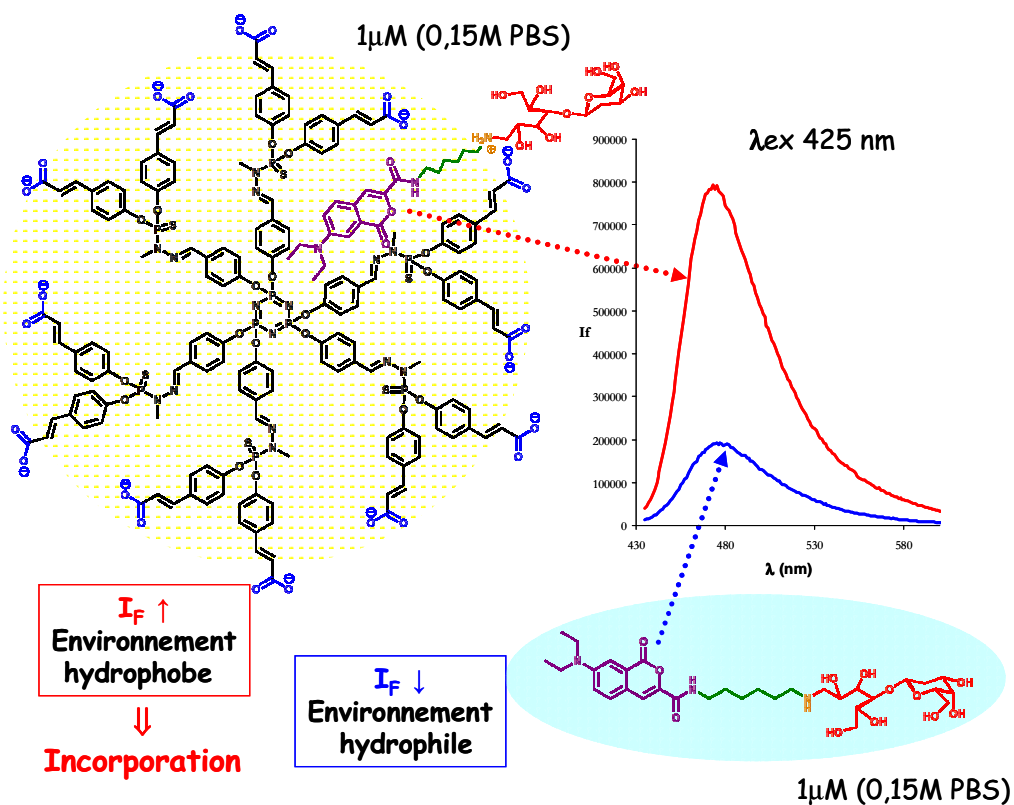


Figure IV.32 Changement de l'intensité de fluorescence de l'aminosucrose **Lf** en fonction de son environnement

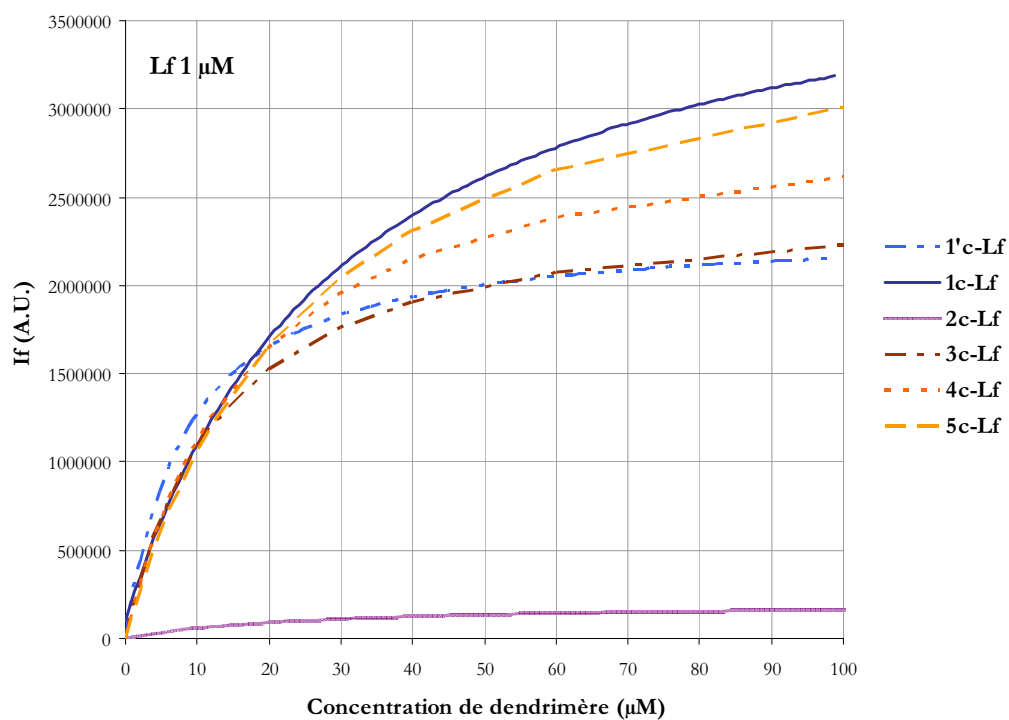


Figure IV.33 Intensités de fluorescence du **Lf** en présence des différentes dendrimères **Nc-G1**

Généralement, il faut soustraire la fluorescence intrinsèque du dendrimère mais elle n'est pas significative dans notre cas. Pour calculer la constante de dissociation K_D de notre système AB, (on regarde le complexe 1:1 car il y a un excès de dendrimère) nous utilisons l'équation (IV.1)^(58, 59) formulée par Hamasaki.

$$F = F_{\min} + \left\{ (F_{\max} - F_{\min}) \left[(e_0 + x + K_D) - \left((e_0 + x + K_D)^2 - 4e_0x \right)^{1/2} \right] \right\} / 2e_0 \quad (\text{IV.1})$$

F = Intensité de fluorescence relative du donneur **Lf**

F_{\min} = Intensité de fluorescence en absence du dendrimère

F_{\max} = Intensité de fluorescence du dendrimère à saturation

x = Concentration du dendrimère

e_0 = Concentration de **Lf** (constante) = 10^{-6} M

K_D = Constante de dissociation

La constante de dissociation K_D de ces complexes **dendrimère-Lf** est ensuite obtenue en ajustant les données mesurées dans l'équation IV.1 par régression non linéaire et en utilisant l'algorithme de Powel.⁽⁶⁰⁾ Nous avons ainsi, en collaboration avec Serge Mazères (responsable de la plateforme imagerie TRI de l'IPBS, UMR5089) et à partir de cette équation, créé un code nous permettant d'avoir accès directement au K_D d'interaction entre les différents dendrimères et **Lf**. Les résultats de l'analyse sont reportés dans le Tableau IV.5.

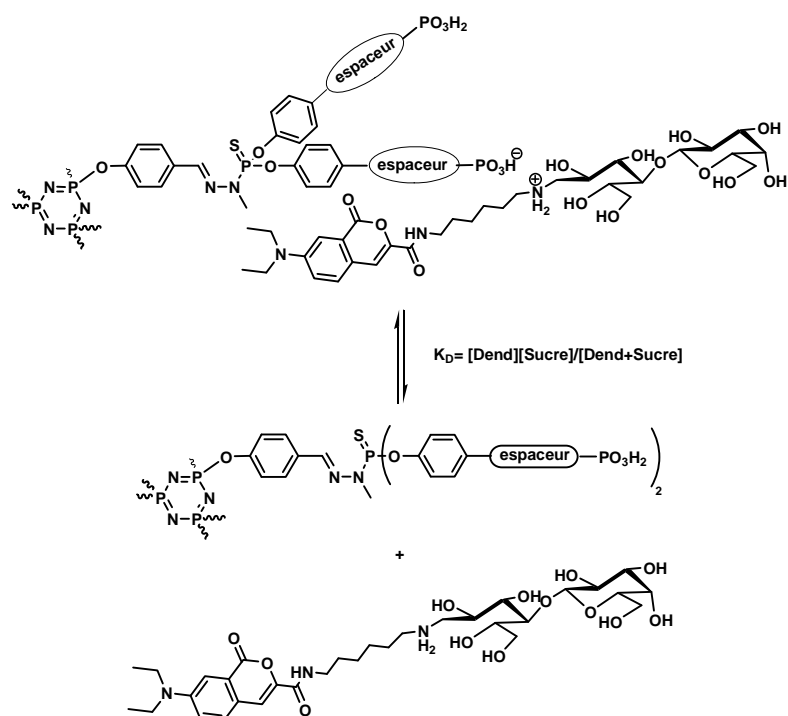


Figure IV.34 Dissociation du dendrimère et l'aminosucré fluorescent **Lf**

Dendrimère fluorescent	K_D (dendrimère-FluoGalCer) μM	Dendrimère non fluorescent	Cytotoxicité CC_{50} μM
1c-Lf	28,8	1d-G1	1,6
1'c-Lf	7,9	1'd-G1	3,9
2c-Lf	24,4	2d-G1	1,2
3c-Lf	12,5	3d-G1	1,9
4c-Lf	16,5	4d-G1	1,5
5c-Lf	24,8	5d-G1	6,1

Tableau IV.5 Valeurs de K_D des analogues fluorescents et cytotoxicité des différentes structures dendritiques correspondantes

Nous rappelons que malgré les modifications de structure réalisées sur la structure dendritique afin de renforcer la paire d'ions, tous les dendrimères catanioniques présentent une CC_{50} de l'ordre de la micromole. D'autre part, les K_D mesurés pour les complexes **dendrimère-Lf** sont d'environ 10^{-5} M, ce qui indique que la paire d'ions est partiellement dissociée à des concentrations proches de la CC_{50} . Il n'est donc pas exclu que des interactions entre les sucres du catanionique et des récepteurs cellulaires renforcent la dissociation. Nous pouvons donc imaginer

que la paire d'ions n'est pas complètement associée dans le milieu biologique. En conséquence, l'aminolactitol, qui a un effet détergent à 10^{-4} M dans l'eau,⁽⁶¹⁾ est vraisemblablement libéré à concentrations faibles, ce qui peut expliquer la cytotoxicité de tous ces dendrimères catanioniques.

De plus, nous trouvons dans la littérature^(62, 63) que les constantes de dissociation du GalCer et du CD4 avec d'autres partenaires biologiques comme par exemple, la glycoprotéine gp120 du VIH sont de l'ordre de la nanomole. C'est-à-dire jusqu'à 10000 fois plus faible que la constante de dissociation de nos assemblages catanioniques.

D'autre part, nous observons que les paliers des courbes d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour les différents dendrimères se trouvent à différentes valeurs d'intensité de fluorescence. Cela indique que l'environnement du fluorophore est différent selon la structure. En effet, le complexe **2c-Lf** présente un palier à plus basse intensité. Dans le cas de **2c-Lf**, le groupe OH en position α de la paire d'ions peut perturber les interactions hydrophobes entre les branches dendritiques et la chaîne alkyle de l'aminosucrose. En conséquence, le groupe fluorophore est moins présent à l'intérieur de la structure dendritique, ce qui a pour conséquence une diminution de l'intensité de fluorescence de **Lf**.

Il faut rappeler que cette approche est un modèle. Nous avons modifié la structure de l'aminolactitol qui possède un groupe coumarine. Ce groupe coumarine se range probablement dans la structure dendritique de façon différente des chaînes alkyle en favorisant la dissociation. Les assemblages catanioniques non fluorescents possèdent ainsi probablement des K_D inférieurs à ceux trouvés pour ce modèle fluorescent, mais cette étude reste une bonne approximation de ce qui se passe dans le milieu biologique.

IV.9 Conclusions

Malgré les modifications structurales réalisées sur les structures dendritiques des assemblages catanioniques, ces derniers présentent une cytotoxicité non négligeable. Des études physicochimiques de ces dendrimères ont montré que cette cytotoxicité n'est pas causée par un phénomène d'agrégation. Cela nous a amené à penser que l'origine de la cytotoxicité pouvait être due à la libération de l'aminolactitol dans le milieu biologique, ce qui serait la conséquence d'un manque de stabilité de la paire d'ions. Pour vérifier cette hypothèse, des études par fluorimétrie ont été réalisées. Ces études ont impliqué la conception de nouveaux analogues catanioniques fluorescents. Ainsi, nous avons synthétisé un dendrimère à cœur fluorescent et un aminosucrose fluorescent et les assemblages catanioniques fluorescents correspondants.

Le comportement de ces composés en solution aqueuse a été évalué par tensiométrie. Les deux entités de l'assemblage catanionique présentent des comportements similaires à ceux trouvés pour les analogues non fluorescents, et les associations catanioniques possèdent un comportement similaire entre eux. Par ailleurs, les clichés de MET montrent que la nature des objets formés est différente. Les analogues fluorescents forment des objets sphériques difficilement identifiables à l'exception du dendrimère qui possède l'aminolactitol fluorescent qui forme des vésicules, comme l'analogue non fluorescent. Cela montre que de petites modifications sur le composé de départ induisent de grandes transformations sur la taille et la forme des objets formés.

Nous avons ensuite mesuré la stabilité de la paire d'ions par spectrofluorométrie. Nous avons observé que l'intensité de fluorescence de l'aminosucré était augmentée en présence du dendrimère à cause du changement d'environnement du chromophore, ce qui traduit l'incorporation de l'aminosucré à la structure dendritique. Cette observation nous a permis de concevoir une méthode pour la détermination des constantes de dissociation des complexes **dendrimère-aminolactitol fluorescent**. Cette méthode consiste en la mesure de la variation de l'intensité de fluorescence de l'aminosucré fluorescent à une concentration fixe en présence de concentrations croissantes de dendrimères.

Les constantes de dissociation ainsi obtenues sont faibles (de l'ordre de 10^{-5} M) pour tous les dendrimères. Cela signifie que la paire d'ions est partiellement dissociée dans une solution de PBS. En outre ces constantes de dissociation sont 10000 fois plus grandes que celles correspondant aux complexes GalCer avec d'autres partenaires biologiques du GalCer, par exemple, la constante de dissociation du complexe GalCer-gp120 est de l'ordre de la nanomole. Bien qu'il s'agisse d'un modèle, la paire d'ions n'est sans doute pas capable de maintenir l'association catanionique en milieu biologique, et la libération de l'aminolactitol pourrait être à l'origine de la toxicité à cause de ses effets détergents.

IV.10 Bibliographie

- (1) Caminade, A. M.; Hameau, A.; Majoral, J. P., *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9270.
- (2) Fuchs, S.; Pla-Quintana, A.; Mazerès, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4751.
- (3) Franc, G.; Mazères, S.; Turrin, C. O.; Vendier, L.; Duhayon, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8707.
- (4) Martínez-Ferrero, E.; Franc, G.; Mazerès, S.; Turrin, U. O.; Boissière, U.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Sanchez, C., *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7658.
- (5) Leclaire, J.; Dagiral, R.; Fery-Forgues, S.; Coppel, Y.; Donnadiéu, B.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15762.
- (6) Maszewska, M.; Leclaire, J.; Cieslak, M.; Nawrot, B.; Okruszek, A.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 193.
- (7) Krishna, T. R.; Parent, M.; Werts, M. H. V.; Moreaux, L.; Gmouh, S.; Charpak, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4645.
- (8) Poupot, M.; Griffe, L.; Marchand, P.; Maraval, A.; Rolland, O.; Martinet, L.; L'Faïghi-Olive, F. E.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Fournie, J. J.; Majoral, J. P.; Poupot, R., *Faseb J.* **2006**, *20*, 2339.
- (9) Rolland, O.; Griffe, L.; Poupot, M.; Maraval, A.; Ouali, A.; Coppel, Y.; Fournie, J. J.; Bacquet, G.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Poupot, R., *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4836.
- (10) Gadella Jr, T. W. J.; van der Krogt, G. N. M.; Bisseling, T., *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 287.
- (11) Haidekker, M. A.; Ling, T. T.; Anglo, M.; Stevens, H. Y.; Frangos, J. A.; Theodorakis, E. A., *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 123.
- (12) Maraval, V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blais, J. C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1822.
- (13) Launay, N.; Caminade, A. M.; Lahana, R.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1589.
- (14) Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
- (15) Rolland, O. *Architectures dendritiques multifonctionnelles: De nouveaux outils pour la nanomedecine.* Université Paul Sabatier, Toulouse, **2007**.
- (16) Shilova, N. V.; Bovin, N. V., *Russian J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29*, 339.
- (17) Higai, K.; Masuda, D.; Matsuzawa, Y.; Saton, T.; Matsumoto, K., *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 333.
- (18) Prigel-Richard, S.; Cansell, M.; Vassy, J.; Viron, A.; Puvion, E.; Jozefonvicz, J.; Letourneur, D., *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 275.
- (19) Blakeslee, D.; Baines, M. G., *J. Immunol. Methods* **1976**, *13*, 305.
- (20) Katrizky, A. R.; Angrish, P.; Narindoshvili, T., *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 994.
- (21) Katrizky, A. R.; Cusido, J.; Narindoshvili, T., *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1471.
- (22) Kuo, J. S.; Chang, C. H.; Lin, Y. L.; Wu, C. J., *Colloids Surf., B* **2008**, *64*, 307.
- (23) Yao, J. Y.; Feng, Y.; Zhao, Y.; Li, Z.; Huang, J.; Fu, H., *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *314*, 523.
- (24) Karukstis, K. K.; McDonough, J. R., *Langmuir* **2005**, *21*, 5716.

- (25) Li, W.; Zhang, J.; Cheng, S.; Han, B.; Zhang, C.; Feng, X.; Zhao, Y., *Langmuir* **2009**, *25*, 196.
- (26) Soussan, E.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I.; Brun, A.; Teixeira, C. V.; Brezesinski, G.; Al-Ali, F.; Banu, A.; Tanaka, M., *Colloids Surf., A* **2007**, *303*, 55.
- (27) Liu, Y. C.; Le Ny, A. L.; Schmidt, J.; Talmon, Y.; Chmelka, B. F.; Lee, C. T. J., *Langmuir* **2009**, *25*, 5713.
- (28) Tsuchiya, K.; Ishikake, J.; Kim, T. S.; Ohkubo, T.; Sakai, H.; Abe, M., *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *312*, 139.
- (29) Yin, H.; Lei, S.; Zhu, S.; Huang, J.; Ye, J., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2825.
- (30) Glinel, K.; Dubois, M.; Verbavatz, J. M.; Sukhorukov, G. B.; Zemb, T., *Langmuir* **2004**, *20*, 8546.
- (31) Coppock, J. D.; Krishan, K.; Dennin, M.; Moore, B. G., *Langmuir* **2009**, *25*, 5006.
- (32) Lioi, S. B.; Wang, X.; Islam, M. R.; Danoff, E. J.; English, D. S., *Phys.Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 9315.
- (33) Rodriguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E., *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555.
- (34) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E., *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187.
- (35) Dias, R. S.; Pais, A. A. C. C.; Miguel, M. G.; Lindman, B., *Colloids Surf., A* **2004**, *250*, 115.
- (36) Miguel, M. G.; Pais, A. A. C. C.; Dias, R. S.; Leal, C.; Rosa, M.; Lindman, B., *Colloids Surf., A* **2003**, *228*, 43.
- (37) Dias, R. S.; Lindman, B.; Miguel, M. G., *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12608.
- (38) Mel'nikov, S. M.; Dias, R. S.; Mel'kinova, Y. S.; Marques, E. F.; Miguel, M. G.; Lindman, B., *FEBS Lett.* **1999**, *453*, 113.
- (39) Uozumi, N.; Tadashi, T.; Yamamoto, T.; Nishikawa, A.; Gao, Y.; Miyoshi, E.; Gao, C.; Noda, K.; Ismal, K. N.; Ihara, Y.; Gujii, S.; Shiba, T.; Taniguchi, N., *J. Biochem.* **1996**, *120*, 385.
- (40) Blanzat, M.; Massip, S.; Spéziale, V.; Perez, E.; Rico-Lattes, I., *Langmuir* **2001**, *17*, 3512.
- (41) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1063.
- (42) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A., *Langmuir* **1999**, *15*, 6163.
- (43) Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I., *Langmuir* **2008**, *24*, 2326.
- (44) Castagnos, P.; Boudier, A.; Soussan, E.; Beaune, G.; Belkhelfa, H.; Menager, C.; Cabuil, V.; Haddioui, L.; Roques, C.; Rico-Lattes, I.; Blanzat, M., *Int. J. Pharm.* **2010**, *403*, 230.
- (45) Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2207.
- (46) Stanton, M. G.; Gagne, M. R., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8240.
- (47) Wright, S. W.; Hageman, D. L.; Wright, A. S.; McClure, L. D., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7345.
- (48) Latge, P.; Rico, I.; Garelli, R.; Lattes, A., *J. Dispersion Sci. Technol.* **1991**, *12*, 227.
- (49) Garellicalvet, R.; Latge, P.; Rico, I.; Lattes, A.; Puget, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1109*, 55.
- (50) Klajnert, B.; Pastucha, A.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M., *J. Applied Polym. Sci.* **2007**, *103*, 2036.
- (51) Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy* 3rd edn. Springer, Berlin, 2006, p.
- (52) Wang, Y. P.; Wei, Y. L.; Dong, C., *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2006**, *177*, 6.
- (53) Epps, D. E.; Raub, T. J.; Caiolfa, V.; Chiari, A.; Zamai, M., *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 41.

-
- (54) Parikh, H. H.; McElwain, K.; Balasubramanian, V.; Leung, W.; Wong, D.; Morris, M. E.; Ramanathan, M., *Pharmaceutical Res.* **2000**, *17*, 632.
- (55) Lakey, J. H.; Ptak, M., *Biochemistry* **1988**, *27*, 4639.
- (56) Okabe, N.; Hashizume, N., *Biol. Pharm. Bul.* **1994**, *17*, 16.
- (57) Chanvorachote, B.; Nimmannit, U.; Muangsiri, W.; Kirsch, L., *J. Fluorescence* **2009**, *19*, 747.
- (58) Kesavan, V.; Tamilarasu, N.; Cao, H.; Rana, T. M., *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1171.
- (59) Hamasaki, K.; Rando, R. R., *Anal. Biochem.* **1998**, *261*, 183.
- (60) Powell, M. J. D., *Computer J.* **1964**, *7*, 155.
- (61) Rico-Lattes, I.; Lattes, A., *Colloids Surf., A* **1997**, *123*, 37.
- (62) Harouse, J. M.; Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Laughlin, M.; Stefano, K.; Silderberg, D. H.; Gonzales-Scarano, F., *Science* **1991**, *253*, 320.
- (63) Conboy, J. C.; McReynolds, K. D.; Gervay-Hague, J.; Saavedra, S. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 968.

Conclusion générale

Conclusion générale

A ce jour, les traitements utilisés sur des personnes infectées par le VIH sont rudes et toxiques et aucun vaccin n'est encore disponible. Le développement de nouveaux médicaments anti-VIH plus efficaces, plus spécifiques, moins toxiques et plus biodisponibles est donc nécessaire. Les inhibiteurs multivalents de l'entrée sont un type d'agents antiviraux de nouvelle génération. Ils bloquent plus efficacement la reconnaissance entre le virus et la cellule cible que leurs analogues monovalents.

Pour la conception de ces inhibiteurs nous avons choisi d'utiliser les dendrimères comme plate-forme. Ces derniers peuvent mimer de façon synthétique les surfaces cellulaires grâce à leur caractère multivalent. Ils ont également d'autres applications anti-VIH, en tant que transporteurs de principes actifs ou pour la thérapie génique.

Dans cette optique, des analogues multivalents du GalCer ont été développés au sein de notre laboratoire. Ils sont de bons inhibiteurs du VIH-1 mais ils possèdent une toxicité cellulaire non-négligeable.

Les travaux de cette thèse ont été dirigés vers le but de diminuer cette cytotoxicité et d'étudier l'influence de la périphérie du dendrimère dans l'activité anti-VIH ainsi que la rationalisation de cette toxicité cellulaire. Pour cela, nous avons conçu une nouvelle série de dendrimères PPH de première génération à terminaison acide phosphonique et leurs analogues catanioniques du GalCer.

Ces composés et leurs précurseurs ont été caractérisés par spectroscopie de RMN du proton, du phosphore 31 et du carbone 13. En particulier la spectroscopie de RMN du phosphore 31 a été un outil efficace pour contrôler les modifications chimiques.

D'autre part, les essais biologiques réalisés sur des cellules CEM-SS indiquent que la longueur de la chaîne influe sur l'efficacité des dendrimères anioniques. **La capacité des chaînes alkyle pour interagir avec la boucle V3 de la gp120 est un paramètre clé pour la conception des inhibiteurs anti-VIH.** En effet, les dendrimères **3c-G1** (sans chaîne) et **5c-G1** (chaîne alkyle C10 greffée dans la position α des terminaisons acide phosphonique) ont des activités anti-VIH similaires malgré leur grande différence structurale. Le dendrimère **4c-G1** avec la chaîne alkyl C3 présente cependant une activité 10 fois supérieure. Cette différence d'activité a été rationalisée par spectroscopie de RMN de 2D NOESY ^1H - ^1H sur des dendrimères avec des chaînes alkyle latérales près des fonctions de surface, **4c-G1** et **5c-G1** dans l'eau. Ces expériences de NOESY 2D indiquent que les chaînes alkyle de **5c-G1** pourraient être plus enfermées dans le squelette dendritique. Par contre, les chaînes alkyle de **4c-G1** sont plus disponibles, ce qui pourrait expliquer son activité plus élevée.

Les activités des dendrimères poly-phosphoniques sous forme de sel de sodium sur cellules CEM-SS sont comparables à celles observées pour les dendrimères poly-anioniques ou pour les

polymères linéaires poly-anioniques en essais cliniques. Par contre, ces composés polyanioniques ont des index thérapeutiques bas (peu sélectifs), à l'exception de **1c-G1** avec un IT de 153. Mais ces IT obtenus pour nos composés sont également comparables à ceux des composés employés en polythérapies, comme par exemple les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse comme les dérivés de la calanolide (IT >20-103).

D'autre part, nous avons observé que les modifications chimiques réalisées sur la structure dendritique influent plus fortement sur les activités inhibitrices des dendrimères anioniques que sur les dendrimères analogues du GalCer. Dans le cas des dendrimères catanioniques les têtes de sucre masquent partiellement ces modifications chimiques. L'environnement chimique de l'acide est donc fondamental, et la présence de chaînes alkyle « libres » peut augmenter l'activité de ces inhibiteurs en renforçant les interactions avec la poche lipophile de la boucle V3.

Enfin, la série des analogues catanioniques du GalCer montre une très bonne activité mais des index thérapeutiques bas à cause des valeurs relativement élevées de la CC_{50} . Cette toxicité est probablement liée au manque de stabilité de la paire d'ions in vitro. L'hypothèse centrale de cette thèse était la possibilité d'augmenter la stabilité de la paire d'ions par l'augmentation des effets hydrophobes apportés par une chaîne alkyle supplémentaire. En effet, la présence d'une longue chaîne alkyle a permis de diminuer la toxicité d'un facteur 5 environ ce qui valide partiellement l'hypothèse selon laquelle la relative toxicité des inhibiteurs est due à la dissociation partielle de la paire d'ions.

Pour déterminer l'origine de la cytotoxicité de ces dendrimères catanioniques analogues du GalCer, nous avons d'abord étudié leur comportement en solution aqueuse. La présence d'agrégats à des concentrations actives du dendrimère peut en effet être responsable de l'origine de leur toxicité.

L'étude par tensiométrie montre que ces dendrimères anti-VIH ont des comportements très différents. Dans le cas des précurseurs anioniques, la nature de la fonction de surface a un effet direct au niveau de l'abaissement de la tension superficielle et des valeurs de CAC. Le dendrimère **1c-G1** ne possède pas de propriétés tensioactives car on constate une perte du caractère amphiphile provoquée par la formation des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les fonctions phosphonate. Dans la famille avec une chaîne alkyle latérale, le dendrimère **4c-G1** à chaîne alkyle C3 présente un comportement différent, il diminue plus fortement la tension superficielle que le dendrimère **5c-G1** à chaîne alkyle C10 qui est plus hydrophobe. Ce résultat est en accord avec les observations obtenues par RMN ainsi qu'avec les résultats biologiques. La chaîne C3 peut sortir en dehors de la structure dendritique puis modifier son activité superficielle.

D'autre part, le pouvoir tensioactif des analogues catanioniques est plus élevé que celui des précurseurs anioniques. Le dendrimère **1d-G1** présente le même comportement que l'aminolactitol

constitutif. Il faut rappeler que le dendrimère constitutif n'avait pas de caractère amphiphile. Dans le cas de la famille α -alkylphosphonate, nous avons constaté qu'ils possèdent un comportement singulier au niveau de la CAC : plus le dendrimère est hydrophile, plus sa CAC est faible. Les observations par cryofracture ont permis de vérifier que ce comportement est dû au mode de préparation des échantillons par dilution. En effet, les solutions mères des dendrimères **3d-G1** et **4d-G1** sont des liquides visqueux et le réseau formé peut perdurer après la dilution. La CAC a pu être faussée mais cela signifie que la vraie CAC est plus élevée. Malgré tout, les résultats obtenus par tensiométrie nous ont permis d'analyser les tendances d'agrégation de ces composés et de les corrélérer avec leurs propriétés biologiques. Nous constatons que tous ces composés sont actifs à l'état non agrégé car la valeur de CI_{50} est inférieure à celle de la CAC. D'autre part, les valeurs de CC_{50} sont inférieures à celles de la CAC sauf pour les dendrimères **3d-G1** et **4d-G1** dont les vraies valeurs de CAC probablement sont plus élevées, ce qui montre la tendance cytotoxique de cette série de dendrimères catanioniques à l'état non agrégé.

Les études par diffusion de la lumière, par MET et par cryofracture, révèlent que ces dendrimères catanioniques forment des vésicules à la différence de leurs précurseurs anioniques. De plus, le dendrimère **5d-G1** avec la chaîne C10 forme aussi des vésicules multilamellaires géantes et des lamelles. Ce comportement original de **5d-G1** semble indiquer que l'arrangement interne du dendrimère catanionique s'approche d'une géométrie cylindrique et la courbure de la bicouche est donc peu favorisée. Il faut aussi rappeler que **5d-G1** est le composé le plus sélectif de la série.

Dans tous les cas, la toxicité est sensiblement la même quel que soit l'arrangement des tensioactifs catanioniques et le type d'objet qu'ils forment. L'origine de la cytotoxicité pouvait donc être due à la libération de l'aminolactitol dans le milieu biologique pour un manque de stabilité de la paire d'ions.

Pour vérifier cette hypothèse, des études par fluorimétrie ont été réalisées. Ces études ont impliqué la conception de nouveaux analogues catanioniques fluorescents. Ainsi, nous avons synthétisé un dendrimère à cœur fluorescent, un aminosucre fluorescent et leurs assemblages catanioniques respectifs.

Nous avons ensuite tenté de mesurer la stabilité de la paire d'ions par mesures de FRET. Malheureusement, cette technique ne nous a pas permis de déterminer les constantes de dissociation. Par contre, nous avons observé que l'intensité de fluorescence de l'aminosucre était augmentée en présence du dendrimère à cause du changement de solvatation du chromophore, ce qui indique l'incorporation de l'aminosucre à la structure dendritique lipophile. Cette observation nous a permis de concevoir une méthode pour la détermination des constantes de dissociation des complexes dendrimère-aminosucre fluorescent par mesure de la variation de l'intensité de

fluorescence de l'aminosucré fluorescent à une concentration fixe en présence de concentrations croissantes de dendrimère.

Les constantes de dissociation ainsi obtenues sont faibles (de l'ordre de la micromole) pour tous les dendrimères. Cela signifie que la paire d'ions est partiellement dissociée dans une solution de PBS. Cependant ces constantes de dissociation sont 10000 fois plus grandes que celles correspondant à d'autres partenaires biologiques du GalCer, par exemple, la constante d'association du complexe GalCer-gp120 est de l'ordre de la nanomole. Ainsi, la paire d'ions n'est sans doute pas capable de maintenir l'association catanionique. Cela provoque la libération du **L16** qui est l'origine de la toxicité à cause de ses effets détergents.

Au final, ces travaux ont permis d'évaluer l'influence de la structure dendritique dans l'activité anti-VIH et dans le comportement physico-chimique des inhibiteurs multivalents d'entrée. Nous avons également pu valider notre hypothèse initiale sur l'origine de la toxicité provoquée par la dissociation partielle de la paire d'ions catanionique dans le milieu biologique par la mesure de la stabilité de ces paires d'ions.

Partie expérimentale

PARTIE EXPERIMENTALE	241
A METHODES GENERALES	245
A.1 Conditions de travail, solvants et réactifs	245
A.2 Techniques de caractérisation structurale.....	245
A.3 Produits déjà décrits	246
B SYNTHÈSE	246
B.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate	246
<i>B.1.1 Synthèse du dendrimère diméthylephosphonate 1a-G1.....</i>	<i>246</i>
<i>B.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 1b-G1.....</i>	<i>247</i>
<i>B.1.3 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 1c-G1.....</i>	<i>248</i>
<i>B.1.4 Synthèse du dendrimère vinylphosphonique catanionique analogue du GalCer.....</i>	<i>249</i>
B.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate.....	250
<i>B.2.1 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 2d-G1.....</i>	<i>250</i>
B.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate	251
<i>B.3.1 Synthèse de la série C0 (sans chaîne alkyle).....</i>	<i>251</i>
B.3.1.1 Synthèse de l'acide carboxylique 6	251
B.3.1.2 Synthèse du phénol 3a	252
B.3.1.3 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 3a-G1	252
B.3.1.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 3b-G1	253
B.3.1.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 3c-G1	254
B.3.1.6 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 3d-G1	255
<i>B.3.2 Synthèse de la série C3 (avec une chaîne alkyle à 3 atomes de carbone).....</i>	<i>256</i>
B.3.2.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 9	256
B.3.2.2 Synthèse de l'acide carboxylique 7	257
B.3.2.3 Synthèse du phénol 4b	257
B.3.2.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 4a-G1	258
B.3.2.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 4b-G1	259
B.3.2.6 Synthèse du dendrimère à terminaison monosodium phosphonique 4c-G1	260
B.3.2.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 4d-G1	261
<i>B.3.3 Synthèse de la série C10 (avec une chaîne alkyle à 10 atomes de carbone).....</i>	<i>262</i>
B.3.3.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 10	262
B.3.3.2 Synthèse de l'acide carboxylique 8	263
B.3.3.3 Synthèse du phénol 5a	263

B.3.3.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 5a-G1	264
B.3.3.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 5b-G1	265
B.3.3.6 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 5c-G1	266
B.3.3.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 5d-G1	267
B.4 Synthèse des dendrimères fluorescents	268
<i>B.4.1 Synthèse du phénol 13</i>	268
<i>B.4.2 Synthèse du dendrimère 17</i>	269
<i>B.4.3 Synthèse du phénol 16</i>	269
<i>B.4.4 Synthèse du dendrimère 15</i>	270
<i>B.4.5 Synthèse du dendrimère fluorescent 14</i>	271
<i>B.4.6 Synthèse du dendrimère fluorescent 11-Df</i>	272
<i>B.4.7 Synthèse du dendrimère fluorescent 25-Df(Na)₁₀</i>	273
<i>B.4.8 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 26-Df(L16)₁₀</i>	274
<i>B.4.9 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 27-Df(L8)(L16)₉</i>	275
<i>B.4.10 Synthèse du composé 22</i>	276
<i>B.4.11 Synthèse du composé 23</i>	277
<i>B.4.12 Synthèse du composé 24</i>	278
<i>B.4.13 Synthèse du composé 18-Lf</i>	278
<i>B.4.14 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 28-Df(Lf)(L16)₉</i>	280
C TESTS BIOLOGIQUES	281
C.1 Conditions expérimentales d'infection des cellules CEM-SS et MT4.....	281
C.2 Evaluation de l'activité anti-VIH	282
C.3 Evaluation de la cytotoxicité.....	283
D TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE	284
D.1 Préparation des solutions des composés catanioniques et leurs précurseurs anioniques	284
D.2 Mesure de tension de surface.....	284
D.3 Détermination des liaisons hydrogène intermoléculaires par infrarouge	284
D.4 Diffusion quasi-élastique de la lumière.....	285
D.5 Microscopie électronique par transmission	285
D.6 Cryofracture.....	286
E SPECTROFLUORIMETRIE	286
F BIBLIOGRAPHIE	288

A Méthodes générales

A.1 Conditions de travail, solvants et réactifs

Toutes les opérations qui impliquent la manipulation de réactifs sensibles à l'humidité ou à la présence d'oxygène ont été réalisées sous atmosphère inerte (Argon U, Air Liquide, 99,99%) et la verrerie employée a été séchée à 120 °C et purgée à l'argon avant son utilisation.

Les mélanges frigorifiques employés pour les réactions à températures inférieures à -15°C ont été préparés avec de l'azote liquide et de l'acétone ou du 2-propanol, tandis que pour celles comprises entre -15 °C et 0 °C, nous avons utilisé des mélanges de glace et de sel. Les températures des réactions se réfèrent toujours aux températures du milieu réactionnel.

Les solvants employés pour les extractions et la chromatographie ont été achetés avec un degré de pureté « analytique » et utilisés sans purification préalable. Les solvants employés dans les réactions sous atmosphère inerte ont été séchés et distillés sous argon immédiatement avant usage selon les techniques décrites dans la littérature.⁽¹⁾

Les fractions organiques qui proviennent des extractions aqueuses ont été séchées dans tous les cas sur sulfate de sodium anhydre.

Les purifications par chromatographie préparative sur colonne ont été réalisées sur un support de gel de silice Merck Kieselgel 60, de 230-240 mesh. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques d'aluminium enduites de silices de type Merck Kieselgel 60F₂₅₄. Elles sont révélées par exposition à la lumière UV ou en utilisant des solutions de Ce/Mo, de *p*-anisaldéhyde, d'acide *ortho*-phosphomolibdique ou de permanganate potassique puis par chauffage. Les R_f décrits ont été obtenus sur gel de silice.

A.2 Techniques de caractérisation structurale

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire : Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur des spectromètres Brüker AC200, ARX250, DPX 300, Avance 300, Avance 400 et Avance 500.

Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (Me₄Si) pour la RMN du ¹H et du ¹³C, par rapport à l'acide trifluoroacétique (CF₃COOH) dans l'eau pour la RMN du ¹⁹F et par rapport à l'acide phosphorique (H₃PO₄) à 85% dans l'eau pour la RMN du ³¹P. Le calibrage a été réalisé par rapport au déplacement chimique du solvant deutéré (signal résiduel non deutéré). Les fréquences sont exprimées en Hertz (Hz).

Les abréviations suivantes ont été utilisées en Résonance Magnétique Nucléaire pour indiquer la multiplicité du signal : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet non résolu).

Spectroscopie de masse : Les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil Finniganmat TSQ 7000 en FAB et en IC. Les spectres de masse des N-alkylamino-1-déoxylactitols ont été analysés en ESI (électrospray) sur un appareil Perkin Elmer Sciex API-365 ou sur un appareil Applied Biosystems Q Trap.

A.3 Produits déjà décrits

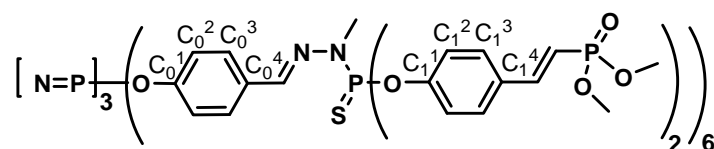
Les produits dont la synthèse a déjà été décrite font l'objet d'un renvoi bibliographique à la fin de ce chapitre. En particulier, les dendrimères traditionnellement utilisés au laboratoire nommé **G1** et **G'1** servant de squelette pour les modifications de surface ont été largement décrits dans la littérature,⁽²⁻⁴⁾ ainsi que les dendrimères précurseurs de la famille **2x-G1** et du dendrimère fluorescent **14**.⁽⁵⁾ Le N-hexadécylamino-1-déoxylactitol (**L₁₆**) et le N-octylamino-1-déoxylactitol ont été synthétisés en partant du lactose non protégé par une méthode couramment utilisée au laboratoire.⁽⁶⁾

7)

B Synthèse

B.1 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons vinylphosphonate

B.1.1 Synthèse du dendrimère diméthylephosphonate 1a-G1



0,95 mL de tétraméthyl-méthylène-*gem*-diphosphonate (5,840 mmole) sont ajoutés goutte à goutte à une suspension d'hydruure de sodium (141 mg, 5,840 mmole) dans le THF (10 mL) à température ambiante. Cette réaction exothermique et instantanée provoque un dégagement gazeux d'hydrogène

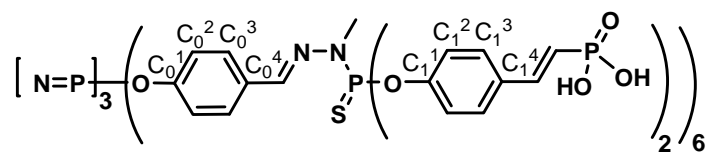
H₂. La solution résultante est ajoutée par canule sur une solution de **G1** (1383 mg, 5,840 mmole) dans le THF (5 mL) à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 12 h puis évaporé à sec. Le résidu brut est repris dans l'eau (150 mL) et extrait avec du chloroforme (3 x 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL), séparée, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée à sec. Ensuite le résidu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, R_f = 0,26) pour donner **1a-G1** sous forme d'une poudre blanche (779 mg, 54%).

RMN ³¹P {¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 8,2 (s, N₃P₃), 21,9 (s, PO₃Me₂), 61,9 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 3,28 (d, ³J_{PH} = 9,6 Hz, 18H, NCH₃), 3,74 (d, ³J_{PH} = 10,8 Hz, 72H, OCH₃), 6,10 (dd, ²J_{PH} = ³J_{HH} = 17,4 Hz, 12H, PCH), 7,01 (d, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 12H, C₀²H), 7,17 (d, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 24H, C₁²H), 7,35 (dd, ²J_{PH} = ³J_{HH} = 20,7 Hz, 12H, ArCH), 7,39 (d, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 24H, C₁³H), 7,61 (sl, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 18H, C₀³H et CH= N) ppm.

RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 33,0 (d, ²J_{PC} = 12,1 Hz, NCH₃), 52,5 (d, ²J_{PC} = 5,3 Hz, OCH₃), 112,8 (d, ¹J_{PC} = 192,5 Hz, PCH), 121,4 (s, C₀²), 121,8 (d, ³J_{PC} = 4,5 Hz, C₁²), 128,3 (s, C₀³), 129,1 (s, C₁³), 132,0 (s, C₁⁴), 132,3 (s, C₀⁴), 139,0 (d, ³J_{PC} = 15,1 Hz, N=CH), 148,1 (d, ²J_{PC} = 6,8 Hz, ArCH), 151,4 (s, C₀¹), 151,9 (d, ²J_{PC} = 6,8 Hz, C₁¹) ppm.

B.1.2 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 1b-G1



192 μL de bromotriméthylsilane (1,440 mmole) sont ajoutés à une solution de **1a-G1** (200 mg, 0,048 mmole) dans l'acétonitrile (10 mL) agitée vigoureusement et refroidie à 0°C. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation magnétique durant une nuit en laissant remonter la température à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu brut est repris deux fois au méthanol (15 mL) pendant 1 h à température ambiante et ensuite évaporé à sec. La poudre blanche résultante est lavée

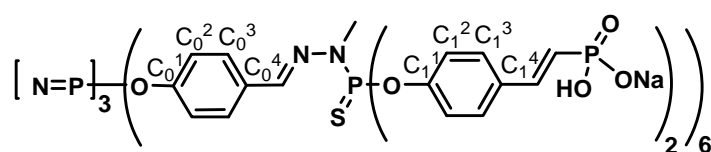
successivement avec 5 mL d'eau, 5 mL de méthanol et 5 mL d'Et₂O pour obtenir **1b-G1** également sous forme d'une poudre blanche (57 mg, 31%).

RMN ³¹P {¹H} (DMSO-*d*₆, 121,5 MHz): δ = 8,2 (s, N₃P₃), 13,6 (s, PO₃H₂), 62,2 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300,1 MHz): δ = 3,29 (d, ³J_{PH} = 10,8 Hz, 18H, NCH₃), 6,41 (dd, ²J_{PH} = ³J_{HH} = 18,2 Hz, 12H, PCH), 7,01-7,25 (m, 48H, C₀²H, C₁²H et ArCH), 7,56 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 24H, C₁³H), 7,64 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 12H, C₀³H), 7,86 (sl, 6H, CH=N) ppm.

RMN ¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆, 75,5 MHz): δ = 33,3 (d, ²J_{PC} = 11,9 Hz, NCH₃), 121,3 (d, ¹J_{PC} = 181,6 Hz, PCH), 121,4 (s, C₀²), 121,7 (sl, C₁²), 128,8 (s, C₀³), 129,4 (s, C₁³), 132,4 (s, C₀⁴), 133,3 (d, ³J_{PC} = 22,4 Hz, C₁⁴), 141,0 (sl, CH=N), 142,1 (sl, ArCH), 151,0 (s, C₁¹), 151,1 (s, C₀¹) ppm.

B.1.3 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique **1c-G1**



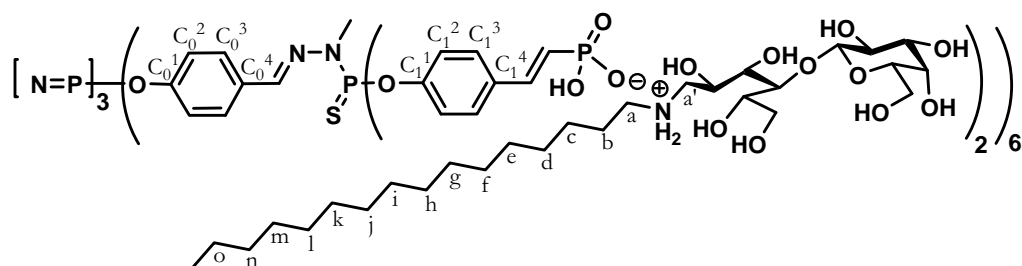
Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1023 N, 3,09 mL) est additionnée goutte à goutte à une suspension de **1b-G1** (100 mg, 0,026 mmole) dans l'eau (5 mL), sous agitation magnétique et refroidie dans un bain de glace à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité durant 15 minutes puis filtré sur filtre micropore (1,2 µm) et lyophilisé pour donner **1c-G1** sous forme d'une poudre blanche (96 mg, 91%).

RMN ³¹P {¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): δ = 8,2 (s, N₃P₃), 12,5 (s, PO₃HNa), 63,6 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 300,1 MHz): δ = 3,28 (d, ³J_{PH} = 9,0 Hz, 18H, NCH₃), 6,36 (dd, ²J_{PH} = ³J_{HH} = 15,0 Hz, 12H, PCH), 7,00-7,08 (m, 48H, C₀²H, C₁²H et ArCH), 7,45 (d, ³J_{HH} = 6,0 Hz, 24H, C₁³H), 7,61 (sl, 12H, C₀³H), 7,82 (sl, 6H, CH=N) ppm.

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 125,8 MHz): $\delta = 32,8$ (sl, NCH_3), 113,9 (sl, PCH), 121,4 (sl, C_1^2), 122,5 (sl, C_0^2), 124,0 (s, C_0^3), 128,6 (s, C_1^3), 132,2 (s, C_0^4), 134,1 (s, C_1^4), 139,8 (sl, ArCH et CH=N), 151,4 (sl, C_0^1 et C_1^1) ppm.

B.1.4 Synthèse du dendrimère vinylphosphonique catanionique analogue du GalCer



50 mg de dendrimère **1b-G1** (0,013 mmole) et 88 mg de *N*-hexadécylaminolactitol (0,156 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL), sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Après 3 jours d'agitation à température ambiante, la solution réactionnelle homogène et incolore est lyophilisée pour obtenir **1d-G1** sous forme d'un solide cotonneux blanc (137 mg, 100%).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121,5 MHz): $\delta = 9,1$ (s, N_3P_3), 11,0 (s, $\text{PO}_3\text{HL16}$), 62,8 (s, P=S) ppm.

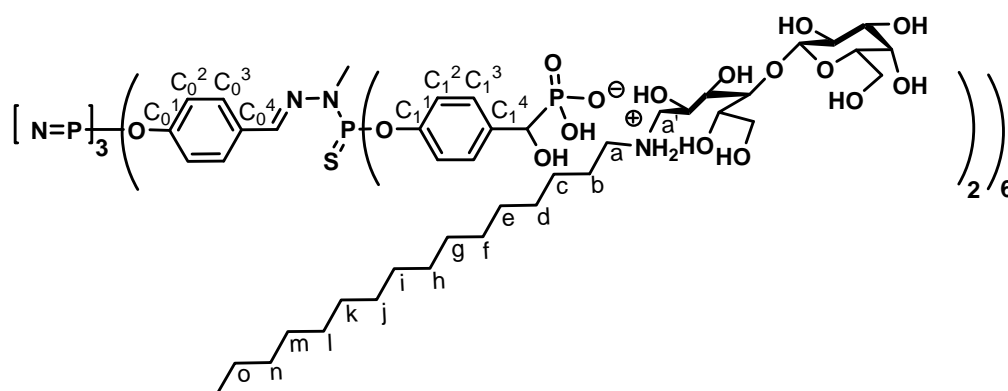
RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{OD})\text{CD}_3$, 1:3, 500,1 MHz): $\delta = 0,98$ (sl, 36H, CH_3), 1,18 (sl, 312 H, $\text{C}_{\text{c-o}}\text{H}_2$), 1,69 (sl, 24H, C_bH_2), 2,64-2,93 (m, 84H, ArCH_2 , PCH_2 , C_aH et $\text{C}_a'\text{H}$), 3,33-3,49 (m, 42H, NHCH_2 et NCH_3), 3,41-4,15 (m, 120H, CHOH et CH_2OH) 4,15 (sl, 12H, $\text{CH}_{\text{anomérique}}$), 6,29 (sl, 12H, CHP), 7,00 (sl, 36H, C_0^2H et C_1^2H), 7,35 (sl, 24H, C_1^3H), 7,53 (sl, 12H, C_0^3H), 7,67 (sl, 6H, CH=N) ppm.

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 100,6 MHz): $\delta = 14,1$ (s, CH_3), 22,9 (s, C_o), 26,2 (s, C_b), 27,0 (s, C_c), 29,8 (sl, C_d), 30,3 (sl, $\text{C}_{\text{e-m}}$), 32,3 (sl, C_n), 32,8 (sl, CH_3N), 48,2 (sl, C_a), 50,3 (sl, C_a'), 61,4 (s, CH_2OH), 62,8 (s, CH_2OH), 67,3 (s, CHOH), 69,0 (sl, CHOH), 70,6 (sl, CHOH), 71,3 (s, CHOH), 72,9 (sl, CHOH), 75,4 (sl, CHOH), 80,1 (sl, CHO), 103,2 (sl, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 121,6 (sl, C_0^2 et C_1^2), 124,5 (s, CHP), 126,4 (s, C_0^3), 128,5 (s, C_1^3), 132,6 (s, C_0^4), 134,7 (sl, C_1^4), 139,4 (sl, ArCH et CH=N), 147,7 (sl, C_1^1), 150,8 (s, C_0^1) ppm.

B.2 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -hydroxyphosphonate

Les dendrimères précurseurs de la série α -hydroxyphosphonate, **2a-G1**, **2b-G1** et **2c-G1** ont été déjà décrits dans la littérature.⁽⁵⁾

B.2.1 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer **2d-G1**



50 mg de dendrimère **2b-G1** (0,013 mmole) et 88 mg de *N*-hexadécylaminolactitol (0,156 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL), sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Après 3 jours d'agitation à température ambiante, la solution réactionnelle homogène et incolore est lyophilisée pour obtenir **2d-G1** sous forme d'un solide blanc cotonneux (138 mg, 100%).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121,5 MHz): δ = 8,6 (s, N_3P_3), 15,9 (s, $\text{PO}_3\text{HL16}$), 63,5 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{OD})\text{CD}_3$, 1:3, 500,1 MHz): δ = 1,02 (sl, 36H, CH_3), 1,39 (sl, 336 H, C_{b-o}H_2), 2,59-3,19 (m, 48H, C_aH_2 et $\text{C}_a'\text{H}_2$), 3,36-3,63 (m, 18H, NCH_3), 3,65-4,29 (m, 144H, CHOH , CH_2OH , CHOHP et $\text{CH}_{\text{anomérique}}$), 7,31 (sl, 36H, C_0^2H et C_1^2H), 7,60 (sl, 24H C_1^3H), 7,81 (sl, 18H, C_0^3H et $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

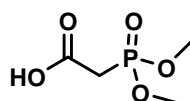
RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 75,5 MHz): δ = 14,1 (s, CH_3), 22,9 (s, C_o), 25,9 (s, C_b), 27,0 (s, C_c), 29,8 (s, C_d), 30,3 (sl, C_{e-m}), 32,3 (sl, C_n), 32,8 (sl, NCH_3), 46,7 (s, C_a), 48,3 (sl, C_a'), 61,4 (sl, CH_2OH), 62,5 (sl, CH_2OH), 68,0 (s, CHOH), 69,1 (sl, CHOH), 71,3 (sl, CHOH et CHOHP), 72,8 (sl, CHOH), 75,5 (sl, CHOH), 80,0 (sl, CHO), 103,4 (sl, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 120,7 (sl, C_0^2 et C_1^2), 128,8 (sl, C_0^3 et C_1^3), 132,3 (sl, $\text{CH}=\text{N}$), 138,7 (sl, C_1^4), 140,4 (s, C_0^4), 149,3 (sl, C_1^1), 151,1 (sl, C_0^1) ppm.

B.3 Synthèse de la série de dendrimères à terminaisons α -alkylphosphonate

Ces dérivés ont été développés et caractérisés pour la première fois dans les thèses de G. Spataro⁽⁸⁾ et C. Bololoi.⁽⁹⁾

B.3.1 Synthèse de la série C0 (sans chaîne alkyle)

B.3.1.1 Synthèse de l'acide carboxylique 6



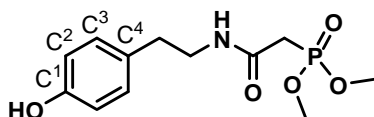
Une solution à 20% de TFA dans le dichlorométhane (15 mL) est ajoutée goutte à goutte sur 100 mg de *tert*-butyl-2-diméthylphosphonoacétate (0,472 mmole) et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1,5 h. Le résidu brut est co-évaporé avec de l'acétate d'éthyle pour enlever les traces de TFA puis évaporé à sec. Cette séquence est répétée jusqu'à totale disparation du signal du TFA en spectroscopie de RMN du ^{19}F pour donner **6** sous forme d'une poudre blanche (75 mg, 100%).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): δ = 22,7 ppm (s, PO_3Me_2) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): δ = 3,14 (d, $^2J_{\text{PH}} = 22,2$ Hz, 2H, PCH_2), 3,89 (d, $^3J_{\text{PH}} = 11,4$ Hz, 6H, OCH_3) ppm, (COOH non détecté).

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ = 32,8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 136,5$ Hz, PCH_2), 53,5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6,5$ Hz, OCH_3), 167,4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5,6$ Hz, COOH) ppm.

B.3.1.2 Synthèse du phénol 3a



163 mg de DCC (1,400 mmole) sont ajoutés à un mélange de **6** (117 mg, 0,700 mmole) et HOBt (107 mg, 1,400 mmole) dans le DMF fraîchement distillé (5 mL) agité vigoureusement et refroidi à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 1 h, puis une solution de tyramine (197 mg, 1,400 mmole) dans le DMF (1 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 h puis filtré. Le solvant est éliminé par lyophilisation et le résidu rouge foncé résultant est repris dans le chloroforme (50 mL) puis lavé successivement avec une solution aqueuse de HCl (0,1 M, 3 x 10 mL) et enfin avec une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séparée, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : DCM/MeOH, 95:5 Rf = 0,2 ; après acétone/MeOH, 95:5 Rf = 0,5) pour obtenir **3a** sous forme d'une poudre blanche (92 mg, 46%).

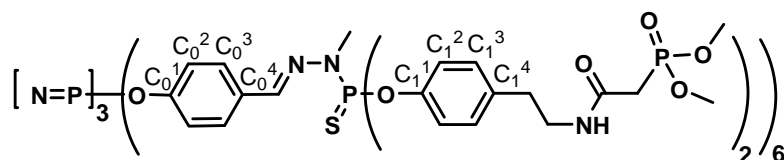
RMN ³¹P {¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 25,5 ppm (s, PO₃Me₂).

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 2,71 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 2H, ArCH₂), 2,84 (d, ²J_{PH} = 21,0 Hz, 2H, PCH₂), 3,46 (q, ³J_{HH} = ³J_{HH} = 6,6 Hz, 2H, NHCH₂), 3,74 (d, ³J_{PH} = 11,4 Hz, 6H, OCH₃), 6,77 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C²H), 6,81 (m, 1H, NH), 7,00 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C³H) ppm.

RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 34,1 (d, ¹J_{PC} = 132,1 Hz, PCH₂), 34,4 (s, ArCH₂), 41,5 (s, NHCH₂), 53,3 (d, ²J_{PC} = 6,0 Hz, OCH₃), 115,5 (s, C²), 129,6 (s, C¹), 129,7 (s, C³), 155,4 (s, C⁴), 163,9 (d, ²J_{PC} = 4,5 Hz, CONH) ppm.

S. M. (IC): *m/z* = 305 [M+NH₄]⁺.

B.3.1.3 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 3a-G1



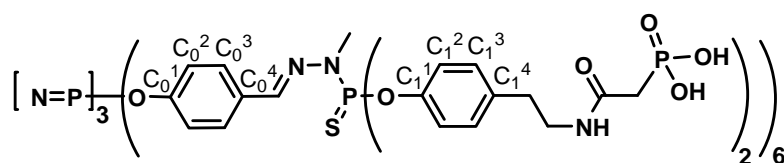
200 mg de phénol **3a** (0,690 mmole) et 410 mg de carbonate de césium (1,260 mmole) sont ajoutés à une solution de **G1** (96 mg, 0,053 mmole) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h, centrifugé, filtré et évaporé à sec. Le résidu résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétone/MeOH/H₂O, 49:49:2 R_f = 0,2) pour obtenir **3a-G1** sous forme d'une poudre blanche (240 mg, 71%).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 8,4 (s, N₃P₃), 25,4 (s, PO₃Me₂), 62,8 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 2,76 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 24H, ArCH₂), 2,83 (d, ²J_{PH} = 20,7 Hz, 24H, PCH₂), 3,24 (d, ³J_{PH} = 10,2 Hz, 18H, NCH₃), 3,43 (q, ³J_{HH} = ³J_{HH} = 6,6 Hz, 24H, NHCH₂), 3,72 (d, ²J_{PH} = 11,1 Hz, 72H, OCH₃), 6,99–7,05 (m, 24H, C₀²H et NH), 7,09 (sl, 48H, C₁²H et C₁³H), 7,61 (m, 12H, C₀³H), 7,64 (m, 6H, CH=N) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 33,0 (d, ²J_{PC} = 12,2 Hz, NCH₃), 34,2 (d, ¹J_{PC} = 131,9 Hz, PCH₂), 34,8 (s, ArCH₂), 41,1 (s, NHCH₂), 53,2 (d, ²J_{PC} = 6,6 Hz, OCH₃), 121,3 (s, C₀²), 121,4 (s, C₁²), 128,3 (s, C₀³), 129,8 (s, C₁³), 132,2 (s, C₀⁴), 136,1 (s, C₁⁴), 138,7 (d, ⁴J_{PC} = 14,2 Hz, CH=N), 149,1 (d, ²J_{PC} = 7,0 Hz, C₁¹), 151,2 (s, C₀¹), 163,9 (d, ²J_{PC} = 4,3 Hz, CONH) ppm.

B.3.1.4 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique **3b-G1**



74 μL de bromotriméthylsilane (0,570 mmole) sont ajoutés goutte à goutte à une solution de **3a-G1** (100 mg, 0,021 mmole) dans un mélange d'acétonitrile et de dichlorométhane (1:1, 2 mL) agitée vigoureusement et refroidie à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu obtenu est lavé deux fois avec du méthanol (10 mL) pendant

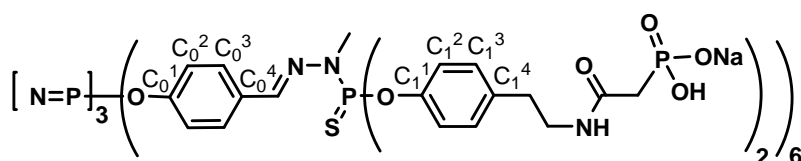
1h à température ambiante et évaporé. Le solide blanc résultant est lavé successivement avec 5 mL d'eau, 5 mL de méthanol et 5 mL d'Et₂O pour obtenir **3b-G1** sous forme d'une poudre blanche (89 mg, 94%).

RMN ³¹P{¹H} (DMSO-*d*₆, 121,5 MHz): δ = 8,4 (s, N₃P₃), 17,0 (s, PO₃H₂), 62,5 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200,1 MHz): δ = 2,50-2,70 (m, 48H, ArCH₂ et PCH₂), 3,10-3,30 (m, 42H, NCH₃ et NHCH₂), 6,95-7,25 (m, 60H, C₀²H, C₁²H et C₁³H), 7,60-8,00 (m, 30H, C₀³H, NH et CH=N) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆, 62,9 MHz): δ = 32,8 (sl, NCH₃), 34,3 (s, ArCH₂), 37,2 (d, ¹J_{PC} = 132,0 Hz, PCH₂), 120,7 (s, C₁² et C₀²), 128,2 (s, C₀³), 129,9 (s, C₁³), 132,0 (s, C₀⁴), 136,6 (s, C₁⁴), 139,0 (m, CH=N), 148,4 (m, C₁¹ et C₀¹), 165,4 (s, CONH) ppm.

B.3.1.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique **3c-G1**



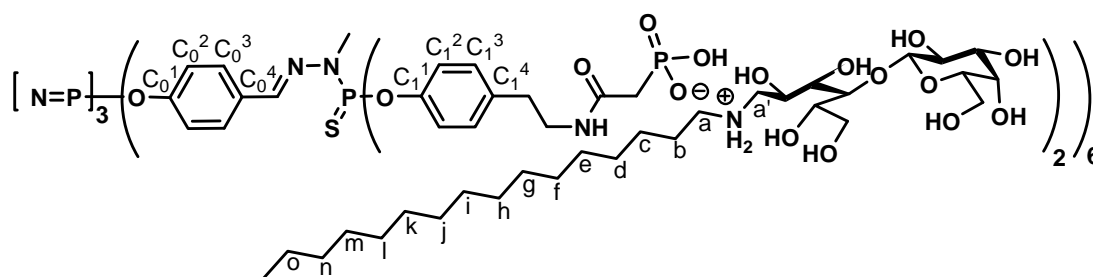
Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1023 N, 2,58 mL) est additionnée goutte à goutte à une suspension de **3b-G1** (100 mg, 0,023 mmole) dans l'eau (5 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel est filtré sur filtre micropore (1,2 μm) puis lyophilisé pour obtenir **3c-G1** sous forme d'un solide blanc (110 mg, 91%).

RMN ³¹P {¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): δ = 9,7 (s, N₃P₃), 13,8 (s, PO₃HNa), 64,0 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 300,1 MHz): δ = 2,86 (d, ²J_{PH} = 21,0 Hz, 24H, PCH), 2,97 (m, 24H, ArCH₂), 3,49 (d, ³J_{PH} = 9,0 Hz, 18H, NCH₃), 3,55 (m, 24H, NHCH₂), 7,13 (d, ³J_{HH} = 6,0 Hz, 12H, C₀²H), 7,31 (d, ³J_{HH} = 7,3 Hz, 24H, C₁²H), 7,43 (d, ³J_{HH} = 9,0 Hz, 24 Hz, C₁³H), 7,85 (d, ³J_{HH} = 9,0 Hz, 12H, C₀³H), 8,02 (s, CH=N) ppm.

RMN ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 75,5 MHz): $\delta = 32,9$ (d, $^3J_{\text{PC}} = 11,7$ Hz, NCH_3), 34,3 (s, ArCH_2), 38,2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 117,9$ Hz, PCH), 41,2 (s, NHCH_2), 121,3 (s, C_1^2), 121,6 (s, C_0^2), 128,9 (s, C_0^3), 130,3 (s, C_1^3), 132,7 (s, C_0^4), 137,1 (s, C_1^4), 140,0 (s, $\text{CH}=\text{N}$), 148,9 (s, C_1^1), 150,7 (s, C_0^1), 171,0 (s, CONH) ppm.

B.3.1.6 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 3d-G1



50 mg de dendrimère **3b-G1** (0,011 mmole) et 75 mg de *N*-hexadécylaminolactitol (0,132 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL) sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Après 3 jours d'agitation à température ambiante, le mélange final homogène et incolore est lyophilisé pour obtenir **3d-G1** sous forme d'un solide blanc cotonneux (124 mg, 100%).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121,5 MHz): $\delta = 9,2$ (s, N_3P_3), 13,8 (s, $\text{PO}_3\text{HL16}$), 64,0 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

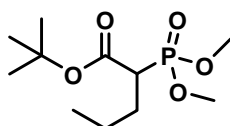
RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{OD})\text{CD}_3$, 1:3, 500,1 MHz): $\delta = 0,77$ (sl, 36H, CH_3), 1,12 (sl, 312 H, $\text{C}_{\text{e-o}}\text{H}_2$), 1,60 (sl, 24H, C_bH_2), 2,56-2,68 (m, 48H, ArCH_2 et PCH_2), 2,93 (sl, 48H, C_aH et $\text{C}_a'\text{H}$), 3,17-3,28 (m, 42H, NHCH_2 et NCH_3), 3,41-3,99 (m, 156H, CHOH , CH_2OH et $\text{CH}_{\text{anomérique}}$), 6,83 (sl, 12H, C_0^2H), 7,02 (sl, 24H, C_1^2H), 7,09 (sl, 24H, C_1^3H), 7,59 (sl, 12H, C_0^3H), 7,69 (sl, 6H, $\text{CH}=\text{N}$) ppm.¹

RMN ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 75,5 MHz): $\delta = 14,1$ (s, CH_3), 22,9 (s, C_o), 26,2 (s, C_b), 26,9 (s, C_c), 29,8 (s, C_d), 30,2 (sl, $\text{C}_{\text{e-m}}$), 32,2 (s, C_n), 32,9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 19,5$ Hz, NCH_3), 34,3 (s, ArCH_2), 38,3 (d, $^1J_{\text{PC}} = 197,3$ Hz, PCH), 41,2 (s, NHCH_2), 42,3 (s, C_a), 43,5 (s, C_a'), 60,4 (s, CH_2OH), 61,2 (s, CH_2OH), 68,7 (s, CHOH), 70,3 (s, CHOH), 71,4 (s, CHOH), 71,5 (s, CHOH), 72,8 (s, CHOH), 75,5 (s, CHOH), 78,7 (s, CHO), 78,9 (s, CHO), 103,1 (s, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 121,3 (s, C_1^2), 121,6 (s, C_0^2), 128,6 (s, C_0^3), 130,3 (s,

C_1^3), 132,7 (s, C_0^4), 137,2 (s, C_1^4), 140,0 (sl, CH=N), 148,9 (d, $^2J_{PC} = 7,6$ Hz, C_1^1), 151,2 (s, C_0^1), 171,1 (s, CONH) ppm.

B.3.2 Synthèse de la série C3 (avec une chaîne alkyle à 3 atomes de carbone)

B.3.2.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 9



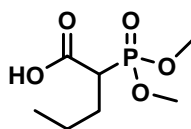
Une solution de *tert*-butyl-2-diméthylphosphonoacétate (224 mg, 1,000 mmole) dans le DMF (2 mL) est additionnée rapidement goutte à goutte à une suspension d'hydrure de sodium (24 mg, 1,000 mmole) dans le DMF fraîchement distillé (25 mL) et refroidie à 0°C. Lorsque le dégagement de dihydrogène est achevé, une solution de 1-iodopropane (0,195 mL, 2,000 mmole) et d'éther couronne 15C5 (20 μ L, 0,100 mmole) dans le DMF (1,0 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel, sous agitation magnétique, est chauffé à 50°C pendant 12 h. Ensuite le mélange réactionnel est ramené à température ambiante puis dilué avec une solution aqueuse saturée en NH_4Cl . La solution résultante est extraite avec de l' Et_2O (2 x 50 mL). La phase organique est lavée successivement à l'eau (2 x 50 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL), séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée à sec pour obtenir **9** sous forme d'une huile jaune (173 mg, 65%). Le produit d'alkylation **9** est utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN $^{31}P\{^1H\}$ ($CDCl_3$, 121,5 MHz): $\delta = 26,3$ (s, PO_3Me_2) ppm.

RMN 1H ($CDCl_3$, 300,1 MHz): $\delta = 0,87$ (t, $^3J_{HH} = 6,6$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1,20-1,40 (m, 2H, CH_3CH_2), 1,42 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,60-2,00 (m, 2H, $CH-CH_2H_2$), 2,85-2,95 (m, 1H, PCH), 3,71 (d, $^3J_{PH} = 4,5$ Hz, 3H, OCH_3), 3,75 (d, $^3J_{PH} = 4,5$ Hz, 3H, OCH_3) ppm.

RMN $^{13}C\{^1H\}$ ($CDCl_3$, 75,5 MHz): $\delta = 13,4$ (s, CH_2CH_3), 21,3 (d, $^3J_{PC} = 15,4$ Hz, $CHCH_2$), 27,7 (s, $C(CH_3)_3$), 28,7 (d, $^2J_{PC} = 5,4$ Hz, $CHCH_2CH_2$), 44,6 (d, $^1J_{PC} = 131,8$ Hz, PCH), 53,5 (d, $^2J_{PC} = 7,0$ Hz, OCH_3), 53,7 (d, $^2J_{PC} = 6,6$ Hz, OCH_3), 82,0 (s, $C(CH_3)_3$), 170,7 (d, $^3J_{PC} = 4,3$ Hz, COO) ppm.

B.3.2.2 Synthèse de l'acide carboxylique 7



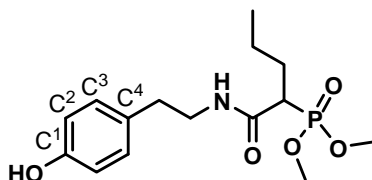
Une solution à 20% de TFA dans le dichlorométhane (15 mL) est ajoutée goutte à goutte sur **9** (120 mg, 0,450 mmole) et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1,5 h. Le résidu est co-évaporé avec de l'acétate d'éthyle pour enlever les traces de TFA puis évaporé à sec. Cette séquence est répétée jusqu'à totale disparition du signal du TFA en spectrométrie de RMN du ^{19}F pour obtenir **7** sous forme d'une poudre blanche (95 mg, 100%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): $\delta = 25,3$ (s, PO_3Me_2) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): $\delta = 0,96$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1,30-1,55 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1,75-2,05 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 3,13 (ddd, $^2J_{\text{PH}} = 11,1$ Hz, $^3J_{\text{HHx}} = 8,1$ Hz, $^3J_{\text{HHy}} = 3,0$ Hz, 1H, PCH), 3,86 (2 d, $^3J_{\text{PH}} = 5,4$ Hz, 3H, OCH_3), 3,89 (d, $^3J_{\text{PH}} = 5,4$ Hz, 3H, OCH_3) ppm, (COOH non détecté).

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): $\delta = 13,3$ (s, CH_2CH_3), 21,3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11,2$ Hz, CHCH_2), 28,5 (d, $^3J_{\text{PC}} = 4,0$ Hz, CH_3CH_2), 44,5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 100,8$ Hz, PCH), 54,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5,3$ Hz, OCH_3), 54,4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5,1$ Hz, OCH_3), 174,3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2,9$ Hz, COO) ppm.

B.3.2.3 Synthèse du phénol 4b



163 mg de DCC (1,4 mmole) sont ajoutés à un mélange de **7** (147 mg, 0,7 mmole) et d'HOBt (107 mg, 1,4 mmole) dans le DMF fraîchement distillé (5 mL), sous agitation magnétique vigoureuse et refroidie à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 h, puis une solution de tyramine (197 mg, 1,4 mmole) dans le DMF (1 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Le mélange résultant est agité à température ambiante pendant 12 h puis filtré. Le solvant est éliminé

par lyophilisation. Le résidu rouge foncé résultant est repris dans le chloroforme (50 mL) et lavé successivement avec une solution aqueuse d'HCl (0,1 M, 3 x 10 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séparée, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH, 95:5, Rf = 0,4 après acétone, Rf = 0,7) pour obtenir **4b** sous forme d'une poudre blanche (122 mg, 53%).

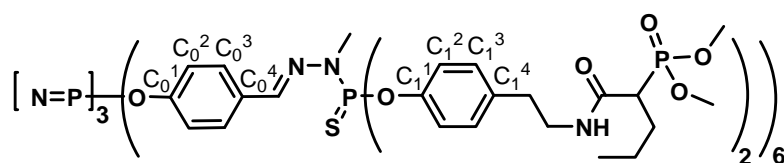
RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 28,3 ppm (s, PO₃Me₂) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 0,91 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,20-1,50 (m, 2H, CH₃CH₂), 1,70-1,95 (m, 2H, CHCH₂H), 2,66-2,78 (m, 2H, PCH et ArCH₂), 3,51 (q, ³J_{HH} = ³J_{HH} = 6,6 Hz, 2H, NHCH₂), 3,75 (d, ³J_{PH} = 10,5 Hz, 3H, OCH₃), 3,76 (d, ³J_{PH} = 10,5 Hz, 3H, OCH₃), 6,30 (sl, 1H, NH), 6,78 (d, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 2H, C²H), 7,05 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C³H) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 13,7 (s, CH₂CH₃), 21,3 (d, ²J_{PC} = 14,3 Hz, CHCH₂CH₂), 29,2 (d, ³J_{PC} = 4,5 Hz, CHCH₂CH₂), 34,4 (s, ArCH₂), 41,3 (s, NHCH₂), 45,9 (d, ¹J_{PC} = 130,6 Hz, PCH), 53,3 (d, ²J_{PC} = 7,6 Hz, OCH₃), 53,6 (d, ²J_{PC} = 6,8 Hz, OCH₃), 115,5 (s, C²), 129,7 (s, C³ et C⁴), 155,3 (s, C¹), 167,4 (d, ²J_{PC} = 2,3 Hz, CONH) ppm.

S. M. (IC): *m/z* = 305 [M+NH₄]⁺.

B.3.2.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate 4a-G1



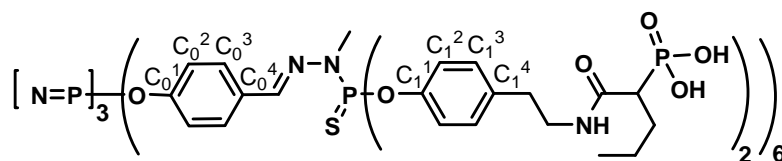
400 mg de phénol **4a** (1,210 mmole) et 720 mg de carbonate de césium (2,200 mmole) sont ajoutés à une solution de **G1** (167 mg, 0,091 mmole) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante, centrifugé, filtré et évaporé. Le résidu résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH 80:20, Rf = 0,4 après acétone/MeOH, 95:5, Rf = 0,2) pour obtenir **4a-G1** sous forme d'une poudre blanche (240 mg, 71%).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 8,4 (s, N₃P₃), 28,1 (s, PO₃Me₂), 62,9 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): $\delta = 0,86$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,10-1,40 (m, 24H, CH_3CH_2), 1,60-2,00 (m, 24H, CHCH_2H), 2,74 (m, 36H, ArCH_2 et PCH), 3,22 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10,2$ Hz, 18H, NCH_3), 3,43 (m, 24H, NHCH_2), 3,68 (d, $^3J_{\text{PH}} = 8,7$ Hz, 36H, OCH_3), 3,72 (d, $^3J_{\text{PH}} = 8,1$ Hz, 36H, OCH_3) 6,98 (m, 12H, C_0^2H et NH), 7,08 (sl, 48H, C_1^2H et C_1^3H), 7,61 (m, 18H, C_0^3H et CH=N) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) : $\delta = 13,7$ (s, CH_2CH_3), 21,3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15,1$ Hz, CHCH_2), 29,2 (d, $^3J_{\text{PC}} = 3,8$ Hz, CHCH_2CH_2), 33,0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 12,1$ Hz, NCH_3), 34,8 (s, ArCH_2), 41,0 (s, NHCH_2), 45,8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 130,6$ Hz, PCH), 53,0 (sl, OCH_3), 53,4 (sl, OCH_3), 121,3 (s, C_1^2 et C_0^3), 128,3 (s, C_0^3), 129,8 (s, C_1^3), 132,2 (s, C_0^4), 136,1 (s, C_1^4), 138,7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14,3$ Hz, CH=N), 149,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6,8$ Hz, C_1^1), 151,2 (s, C_0^1), 167,5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2,3$ Hz, CONH) ppm.

B.3.2.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 4b-G1



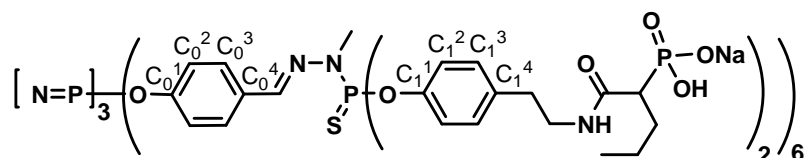
67 μL de bromotriméthylsilane (0,520 mmole) sont ajoutés à une solution de **4a-G1** (100mg, 0,018 mmole) dans un mélange d'acétonitrile et de dichlorométhane (1:1, 2 mL), sous agitation magnétique vigoureuse et refroidie à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu est lavé deux fois au méthanol (10 mL) pendant 1 h à température ambiante puis évaporé à sec. Le solide blanc résultant est lavé successivement avec 5 mL d'eau, avec 5 mL du méthanol et finalement avec 5 mL d' Et_2O pour obtenir **4b-G1** sous forme d'une poudre blanche (83 mg, 92%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CD_3OD , 121,5 MHz): $\delta = 9,3$ (s, N_3P_3), 23,2 (s, PO_3H_2), 62,8 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CD_3OD , 300,1 MHz): $\delta = 0,78$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,07-1,24 (m, 24H, CH_3CH_2), 1,40-1,90 (m, 24H, CHCH_2H), 2,64 (m, 36H, ArCH_2 et PCH), 3,23 (m, 42H, NCH_3 et NHCH_2), 7,02 (m, 36H, C_0^2H et C_1^2H), 7,15 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 48H, C_1^3H), 7,63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6,3$ Hz, 12H, C_0^3H), 7,73 (m, 18H, CH=N et NH) ppm.

RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 75,5 MHz) : δ = 14,1 (s, CH_2CH_3), 21,3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 15,9$ Hz, CHCH_2), 29,3 (sl, CH_3CH_2), 33,4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11,3$ Hz, NCH_3), 34,8 (s, ArCH_2), 46,9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 129,1$ Hz, PCH), 121,1 (s, C_1^2), 121,4 (s, C_0^2), 128,7 (s, C_0^3), 130,4 (s, C_1^3), 132,7 (s, C_0^4), 137,2 (s, C_1^4), 140,4 (s, CH=N), 148,8 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6,8$ Hz, C_1^1), 150,9 (s, C_0^1), 169,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4,5$ Hz, CONH) ppm.

B.3.2.6 Synthèse du dendrimère à terminaison monosodium phosphonique 4c-G1



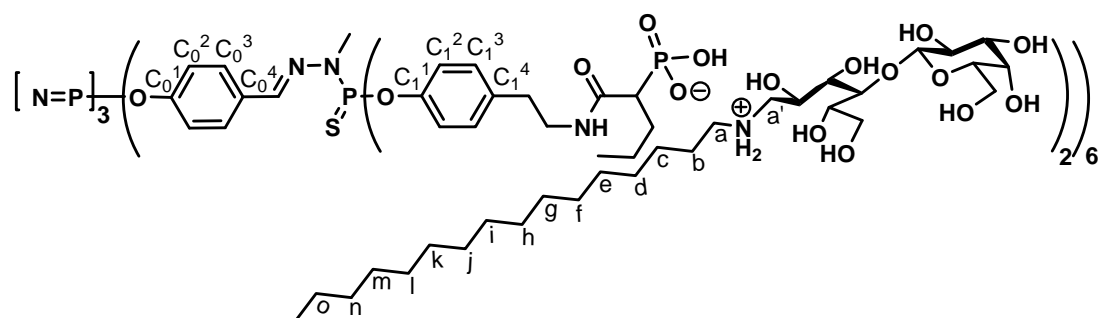
Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1023 N, 2,58 mL) est additionnée à une suspension de **4b-G1** (100 mg, 0,021 mmole) dans l'eau (3 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel est agité durant 15 minutes puis filtré sur filtre micropore (1,2 μm) et lyophilisé pour obtenir **4c-G1** sous forme d'une poudre blanche (110 mg, 93%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121,5 MHz): δ = 9,9 (s, N_3P_3), 17,4 (s, PO_3HNa), 63,5 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 300,1 MHz): δ = 1,09 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,35-1,61 (m, 24H, CH_3CH_2), 1,97 (m, 24H, CHCH_2), 2,59-2,71 (m, 12H, PCH), 3,06 (m, 24H, ArCH_2), 3,55 (d, $^3J_{\text{PH}} = 12,0$ Hz, 18H, NCH_3), 3,70 (m, 24H, NHCH_2), 7,20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 12H, C_0^2H), 7,37 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 24H, C_1^2H), 7,49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 24H, C_1^3H), 7,90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 12H, C_0^3H), 8,09 (s, 6H, N=CH) ppm.

RMN ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 100,6 MHz) : δ = 13,3 (s, CH_2CH_3), 21,6 (s, CH_3CH_2), 31,3 (s, CHCH_2), 32,8 (d, $^2J_{\text{PC}} = 22,4$ Hz, NCH_3), 34,0 (s, ArCH_2), 40,2 (s, NHCH_2), 49,9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 121,1$ Hz, PCH), 120,8 (sl, C_0^2 et C_1^2), 128,4 (s, C_0^3), 130,0 (s, C_1^3), 136,5 (s, C_1^4), 139,5 (s, CH=N), 148,5 (s, C_1^1), 150,8 (s, C_0^1), 174,0 (s, CONH) ppm (C_0^4 non détecté).

B.3.2.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 4d-G1



50 mg de dendrimère **4b-G1** (0,010 mmole) et 68 mg de *N*-hexadécylaminolactitol (0,120 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL), sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Après 3 jours d'agitation à température ambiante, le brut réactionnel homogène et incolore est lyophilisé pour obtenir **4d-G1** sous forme d'un solide cotonneux blanc (118 mg, 100%).

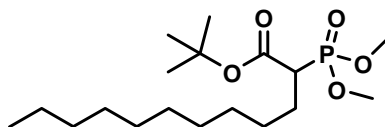
RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121,5 MHz): $\delta = 9,4$ (s, N_3P_3), 16,8 (s, $\text{PO}_3\text{HL16}$), 63,7 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{CDOD})\text{CD}_3$, 1:3, 500,1 MHz): $\delta = 0,90$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,5$ Hz, 36H, CH_3), 0,94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,5$ Hz, 36H, CH_3), 1,24-1,44 (sl, 360H, CH_3CH_2 et $\text{C}_{\text{c-o}}\text{H}_2$), 1,53-1,88 (m, 48H, CHCH_2 et $\text{C}_{\text{b}}\text{H}_2$), 2,68-2,91 (m, 36H, ArCH_2 et CHP), 3,06-3,17 (m, 48H, $\text{C}_{\text{a}}\text{H}_2$ et $\text{C}_{\text{a}}\text{H}_2$), 3,18-3,29 (m, 18H, NCH_3), 3,32-3,48 (m, 48H, NHCH_2), 3,58-4,08 (m, 120H, CHOH et CH_2OH), 4,31 (sl, 12H, $\text{CH}_{\text{anomérique}}$), 6,91 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 12H, C_0^2H), 7,11 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 24H, C_1^2H), 7,17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 24H, C_1^3H), 7,67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz, 12H, C_1^3H), 7,77 (sl, 6H, $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{CDOD})\text{CD}_3$, 1:3, 125,6 MHz): $\delta = 13,7$ (s, CH_3), 13,8 (s, CH_3), 22,4 (s, CH_3CH_2), 22,6 (s, C_{o}), 25,6 (s, C_{b}), 26,6 (s, C_{c}), 29,1 (s, $\text{C}_{\text{d}}\text{H}_2$), 29,5 (sl, $\text{C}_{\text{e-m}}$), 31,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 16,2$ Hz, NCH_3), 31,8 (d, $^3J_{\text{PH}} = 16,2$ Hz, CHCH_2), 31,9 (s, C_{n}), 34,7 (s, ArCH_2), 39,7 (d, $^1J_{\text{PC}} = 75,5$ Hz, PCH), 41,0 (s, NHCH_2), 48,1 (s, C_{a}), 49,9 (s, C_{a}), 61,5 (s, CH_2OH), 62,1 (s, CH_2OH), 67,9 (s, CHOH), 69,0 (s, CHOH), 70,8 (s, CHOH), 71,2 (s, CHOH), 72,9 (s, CHOH), 75,6 (s, CHOH), 78,7 (s, CHO), 103,1 (s, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 121,1 (s, C_1^2), 121,2 (s, C_0^3), 128,3 (s, C_0^3), 129,8 (s, C_1^3), 132,6 (s, C_0^4), 136,5 (s, C_1^4), 138,9 (sl, $\text{CH}=\text{N}$), 149,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6,9$ Hz, C_1^1), 151,0 (sl, C_0^1), 168,9 (s, CONH) ppm.

B.3.3 Synthèse de la série C10 (avec une chaîne alkyle à 10 atomes de carbone)

B.3.3.1 Alkylation du dérivé tert-butyl ester, 10

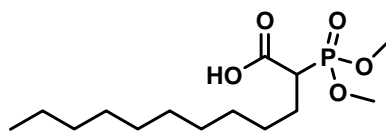


Une solution de *tert*-butyl-P,P-diméthylphosphonoacétate (224 mg, 1 mmole) dans le DMF (2 mL) est additionnée rapidement goutte à goutte à une suspension d'hydrure de sodium (24 mg, 1 mmole) dans le DMF fraîchement distillé (2,5 mL), sous agitation magnétique et refroidie à 0°C. Lorsque le dégagement de dihydrogène est achevé, une solution de 1-iododécane (0,426 mL, 2 mmole) et d'éther couronne 15C5 (20 µL, 0,1 mmole) dans le DMF (1,0 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 50 °C pendant 12 h, puis refroidi à température ambiante, dilué dans une solution aqueuse saturée en NH₄Cl et extraite avec de l'Et₂O (2 x 50 mL). La phase organique est lavée successivement à l'eau (2 x 50 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour obtenir **10** sous forme d'une huile jaune (219 mg, 60%). Le produit d'alkylation est utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 81,0 MHz): δ = 29,7 (s, PO₃Me₂) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 200,1 MHz): δ = 0,80 (t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,18 (sl, 16H, CH₂), 1,60-2,00 (m, 2H, CHCH₂H), 2,78 (ddd, ²J_{PH} = 22,0 Hz, ³J_{HHx} = 11,0 Hz, ³J_{HHy} = 4,0 Hz, 1H, PCH), 3,68 (d, ³J_{PH} = 10,0 Hz, 3H, OCH₃), 3,74 (d, ³J_{PH} = 10,0 Hz, 3H, OCH₃) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 50,3 MHz): δ = 14,1 (s, CH₂CH₃), 22,6 (s, CH₃CH₂), 26,9 (d, ³J_{PC} = 4,5 Hz, CHCH₂CH₂), 27,9 (s, C(CH₃)₃), 28,3 (d, ²J_{PC} = 15,5 Hz, CHCH₂), 29,0-31,9 (m, CH₂) 46,1 (d, ¹J_{PC} = 127,0 Hz, PCH), 53,1 (d, ²J_{PC} = 7,5 Hz, OCH₃), 53,1 (d, ²J_{PC} = 7,5 Hz, OCH₃), 81,7 (s, C(CH₃)₃), 168,1 (d, ³J_{PC} = 2,5 Hz, COO) ppm.

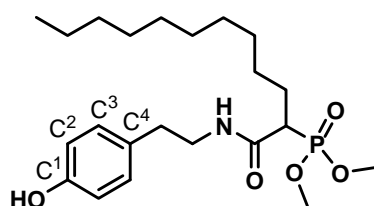
B.3.3.2 Synthèse de l'acide carboxylique **8**

Une solution à 20% de TFA dans le dichlorométhane (15 mL) est ajoutée goutte à goutte sur **10** (164 mg, 0,450 mmole) et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1,5 h. Le résidu est co-évaporé avec de l'acétate d'éthyle pour enlever les traces de TFA puis évaporé à sec. Cette séquence est répétée jusqu'à la totale disparition du signal du TFA en spectrométrie de RMN du ¹⁹F pour obtenir **8** sous forme d'une poudre blanche (75 mg, 100%).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 81,0 MHz): δ = 29,9 (s, PO₃Me₂) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 200,1 MHz): δ = 0,86 (t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,3 (sl, 16H, CH₂), 1,60-2,05 (m, 2H, CHCH₂H), 2,98 (ddd, ²J_{PH} = 24,0 Hz, ³J_{HHx} = 12,0 Hz, ³J_{HHy} = 3,4 Hz, 1H, PCH), 3,79 (d, ³J_{PH} = 10,0 Hz, 3H, OCH₃), 3,83 (d, ³J_{PH} = 10,0 Hz, 3H, OCH₃), 9,13 (s, 1H, COOH) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 50,3 MHz): δ = 14,1 (s, CH₂CH₃), 22,6 (s, CH₃CH₂), 26,9 (d, ³J_{PC} = 5,1 Hz, CHCH₂CH₂), 28,3 (d, ²J_{PC} = 19,5 Hz, CHCH₂), 29,0-31,9 (m, CH₂), 45,1 (d, ¹J_{PC} = 130,0 Hz, PCH), 53,4 (d, ²J_{PC} = 7,0 Hz, OCH₃), 53,1 (d, ²J_{PC} = 7,0 Hz, OCH₃), 171,3 (d, ³J_{PC} = 2,0 Hz, COO) ppm.

B.3.3.3 Synthèse du phénol **5a**

163 mg de DCC (1,4 mmole) sont ajoutés à un mélange de **8** (215 mg, 0,7 mmole) et d'HOBt (107 mg, 1,4 mmole) dans le DMF fraîchement distillé (5 mL) agité vigoureusement et refroidi à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 h, puis une solution de tyramine (197 mg, 1,4 mmole) dans le DMF (1 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Le mélange résultant est agité à température ambiante pendant 12 h puis filtré. Le solvant est enlevé par lyophilisation. Le

résidu rouge foncé résultant est dilué dans le chloroforme (50 mL) et lavé successivement avec une solution aqueuse d'HCl (0,1 M, 3 x 10 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séparée, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH, 95:5, R_f = 0,6, après acétone, R_f = 0,9) pour obtenir **5a** sous forme d'un solide blanc (185 mg, 62%).

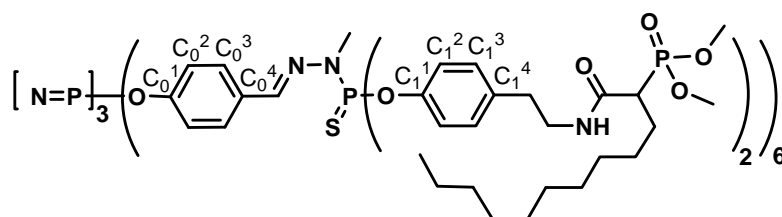
RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 28,4 (PO₃Me₂) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 0,89 (t, ³J_{HH} = 6,6 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,26 (sl, 16H, CH₂), 1,70-1,90 (m, 2H, CHCH₂H), 2,68 (ddd, ²J_{PH} = 14,7 Hz, ³J_{HHx} = 10,5 Hz, ³J_{HHy} = 4,2 Hz, 1H, PCH), 2,75 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 2H, ArCH₂), 3,51 (q, ³J_{HH} = ³J_{HH} = 6,6 Hz, 2H, NHCH₂), 3,74 (d, ³J_{PH} = 11,1 Hz, 3H, OCH₃), 3,77 (³J_{PH} = 11,1 Hz, 3H, OCH₃), 6,32 (m, 1H, NH), 6,78 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C²H), 7,04 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C³H) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 14,1 (s, CH₂CH₃), 22,7 (s, CH₃CH₂), 27,2 (d, ³J_{PC} = 5,3 Hz, CHCH₂CH₂), 28,1 (d, ²J_{PC} = 15,1 Hz, CHCH₂), 29,2 (s, CH₂), 29,31 (s, CH₂), 29,32 (s, CH₂), 29,6 (s, CH₂) 31,9 (s, CH₂), 34,7 (s, ArCH₂), 41,3 (s, NHCH₂) 46,1 (d, ¹J_{PC} = 130,6 Hz, PCH), 53,3 (d, ²J_{PC} = 6,8 Hz, OCH₃), 53,4 (d, ²J_{PC} = 6,8 Hz, OCH₃), 115,5 (s, C²), 129,7 (s, C³), 130,0 (s, C⁴), 155,0 (s, C¹), 167,3 (d, ²J_{PC} = 2,3 Hz, CONH) ppm.

S. M. (IC): *m/z* = 305 [M+NH₄]⁺.

B.3.3.4 Synthèse du dendrimère diméthylphosphonate **5a-G1**



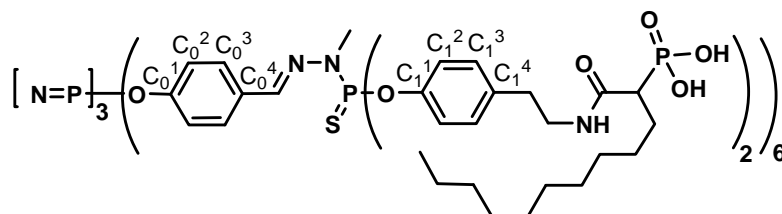
200 mg de phénol **5a** (0,69 mmole) et 457 mg de carbonate de césium (1,06 mmole) sont ajoutés à une solution de **G1** (150 mg, 0,081 mmole) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante, centrifugé, filtré et évaporé. Le résidu résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH, 80:20, R_f = 0,6 après acétone/MeOH, 95:5, R_f = 0,3) pour obtenir **5a-G1** sous forme d'une poudre blanche (407 mg, 77%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): $\delta = 8,4$ (s, N_3P_3), 28,2 (s, PO_3Me_2), 63,0 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): $\delta = 0,87$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,25 (sl, 192H, CH_2), 1,60-2,10 (m, 24H, CHCH_2), 2,76 (m, 36H, ArCH_2 et PCH), 3,24 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10,2$ Hz, 18H, NCH_3), 3,45 (m, 24H, NHCH_2), 3,71 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10,8$ Hz, 18H, OCH_3), 3,75 (d, $^3J_{\text{PH}} = 9,6$ Hz, 36H, OCH_3), 7,00 (m, 24H, C_0^2H et NH), 7,10 (sl, 48 H, C_1^2H et C_1^3H), 7,64 (m, 18H, C_0^3H et $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): $\delta = 14,1$ (s, CH_2CH_3), 22,7 (s, CH_3CH_2), 27,1 (s, CHCH_2CH_2), 28,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 14,3$ Hz, CHCH_2), 29,25 (s, CH_2), 29,29 (s, CH_2), 29,54 (s, CH_2), 29,56 (s, CH_2), 31,8 (s, CH_2), 32,9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11,9$ Hz, NCH_3), 34,9 (s, ArCH_2), 41,1 (s, NHCH_2), 45,9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 129,4$ Hz, PCH), 53,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 38,6$ Hz, OCH_3), 121,33 (s, C_1^2), 121,38 (s, C_0^2), 128,2 (s, C_1^3), 132,1 (s, C_0^4), 136,1 (s, C_1^4), 138,7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14,0$ Hz, $\text{CH}=\text{N}$), 149,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 27,0$ Hz, C_1^1), 151,2 (s, C_0^1), 167,6 (s, CONH) ppm.

B.3.3.5 Synthèse du dendrimère à terminaisons acide phosphonique 5b-G1



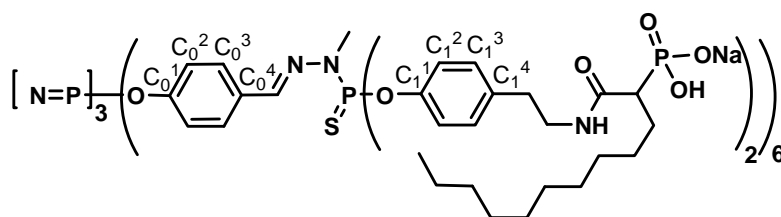
67 μL de bromotriméthylsilane (0,520 mmole) sont ajoutés à une solution de **5a-G1** (100mg, 0,018 mmole) dans un mélange d'acétonitrile et de dichlorométhane (1:1, 2 mL), sous agitation magnétique et refroidi à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h puis évaporé à sec. Le résidu est lavé deux fois avec 10 mL de méthanol pendant 1 h à température ambiante et évaporé à sec. Le solide blanc résultant est lavé successivement avec 5 mL d'eau, 5 mL du méthanol et 5 mL d' Et_2O pour obtenir **5b-G1** sous forme d'une poudre blanche (83 mg, 92%).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN (CD_3OD , 161,9 MHz): $\delta = 9,3$ (s, N_3P_3), 22,8 (s, PO_3H_2), 62,8 (s, P=S) ppm.

^1H RMN (CD_3OD , 400,1 MHz): $\delta = 0,94$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,4$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,33 (sl, 192H, CH_2), 1,70-2,10 (m, 24H, CHCH_2), 2,82 (m, 36H, ArCH_2 , PCH), 3,29 (d, $^3J_{\text{PH}} = 7,2$ Hz, 18H, NCH_3), 3,52 (m, 24H, NHCH_2), 6,95 (m, 12H, C_0^2H), 7,17 (m, 48H, C_1^2H et C_1^3H), 7,70 (m, 12H, C_0^3H), 7,8 (s, 6H, $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (CD_3OD , 100,6 MHz): $\delta = 13,3$ (s, CH_2CH_3), 22,4 (s, CH_3CH_2), 26,9 (s, CHCH_2CH_2), 28,0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 16,2$ Hz, CHCH_2), 29,0 (s, CH_2), 29,2 (s, CH_2), 29,4 (s, CH_2), 31,8 (s, CH_2), 32,6 (d, $^2J_{\text{PC}} = 10,8$, NCH_3), 34,5 (s, ArCH_2), 40,8 (s, NHCH_2), 46,5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 26,8$ Hz, PCH), 121,1 (s, C_1^2), 121,3 (s, C_0^2), 128,2 (s, C_0^3), 129,7 (s, C_1^3), 132,7 (s, C_0^4), 136,5 (s, C_1^4), 138,9 (d, $^3J_{\text{PC}} = 12,7$ Hz, $\text{CH}=\text{N}$), 149,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7,1$ Hz, C_1^1), 151,0 (s, C_0^1), 170,2 (s, CONH) ppm.

B.3.3.6 Synthèse du dendrimère à terminaisons monosodium phosphonique 5c-G1



Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1023 N, 2,58 mL) est ajoutée goutte à goutte à une suspension de **5b-G1** (100 mg, 0,017 mmole) dans l'eau (3 mL) à 0°C. Après 15 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est filtré sur filtre micropore (1,2 μm) puis lyophilisé pour obtenir **5c-G1** sous forme d'une poudre blanche (110 mg, 96%).

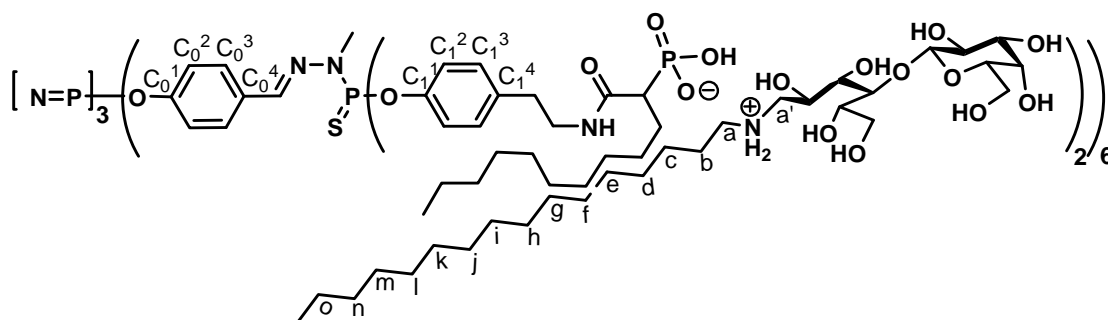
RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 202,5 MHz): $\delta = 9,1$ (s, N_3P_3), 16,5 (s, PO_3HNa), 63,9 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 500,3 MHz): $\delta = 0,92$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1,33 (sl, 192H, CH_2), 1,90 (m, 24H, CHCH_2), 2,62 (m, 12H, PCH), 3,01 (m, 24H, ArCH_2), 3,46 (d, $^3J_{\text{PH}} = 14,5$ Hz, 18H, NCH_3), 3,70 (m, 24H, NHCH_2), 7,11 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz, 12H, C_0^2H), 7,30 (m, 24H, C_1^2H), 7,42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 24H, C_1^3H), 7,83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 12H, C_0^3H), 7,95 (s, 6H, $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 125,8 MHz): $\delta = 14,0$ (s, CH_2CH_3), 22,7 (s, CH_3CH_2), 28,8 (d, $^2J_{\text{PC}} = 13,9$ Hz, CHCH_2), 29,2 (s, CH_2), 29,4 (s, CH_2), 29,6 (s, CH_2), 29,7 (s, CH_2), 29,8 (s, CH_2), 33,0 (d,

$^3J_{PC} = 7,3$ Hz, NCH₃), 34,4 (s, CH₂), 40,5 (s, NHCH₂), 50,2 (d, $^2J_{PC} = 115,9$ Hz, PCH), 121,3 (s, C₀² et C₁²), 128,4 (s, C₄¹), 141,6 (s, C₀⁴), 149,0 (s, C₁¹), 151,3 (s, C₀¹), 175,1 (s, CONH) ppm.

B.3.3.7 Synthèse du dendrimère catanionique analogue du GalCer 5d-G1



50 mg de dendrimère **5b-G1** (0,008 mmole) et 55 mg de *N*-hexadécylaminolactitol (0,096 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL), sous agitation vigoureuse à température ambiante. Après 3 jours d'agitation à température ambiante, la solution réactionnelle homogène et incolore est lyophilisée pour **5d-G1** sous forme d'un solide blanc cotonneux (104 mg, 100%).

RMN ³¹P {¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): $\delta = 9,2$ (s, N₃P₃), 17,3 (s, PO₃HL16), 62,8 (s, P=S) ppm.

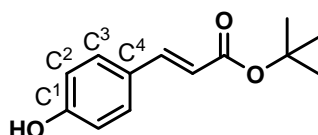
RMN ¹H (CD₃OD, 125,6 MHz): $\delta = 0,86$ (sl, 36H, CH₃), 0,93 (sl, 36H, CH₃), 1,23-1,49 (m, 504H, CH₂ et C_{c-o}H₂), 1,51-1,68 (m, 24H, C_bH₂), 1,80 (sl, 24H, ArCH₂), 2,08-2,09 (m, 24H, CHCH₂), 2,51-2,67 (m, 12H, CHP), 2,73-2,92 (m, 18H, NCH₃), 3,11 (sl, 48H, C_aH₂ et C_aH₂), 3,12-3,49 (m, 24H, NHCH₂), 3,55-3,99 (m, 156H, CHOH, CH₂OH et CH_{anomérique}), 6,81-7,93 (m, 12H, C₀²H), 7,03-7,38 (m, 48H, C₁²H et C₁³H), 7,64 (sl, 12H, C₀³H), 7,71 (sl, 6H, CH=N) ppm.

RMN ¹³C {¹H} (D₂O/CD₃(OD)CD₃, 1:3, 125,6 MHz): $\delta = 13,7$ (s, CH₃), 13,9 (s, CH₃), 22,1 (s, C_o), 22,3 (s, CH₂), 26,0 (s, C_b), 26,6 (s, C_c), 28,3 (sl, CHCH₂), 29,3 (s, C_d), 29,5 (sl, CH₂ et C_{e-m}), 31,7 (s, CH₂), 31,9 (s, C_n), 34,5 (s, ArCH₂), 37,5 (d, $^1J_{PC} = 75,5$ Hz, PCH), 40,6 (s, NHCH₂), 48,1 (s, C_a), 50,0 (s, C_a), 61,4 (s, CH₂OH), 62,1 (s, CH₂OH), 68,1 (s, CHOH), 69,0 (s, CHOH), 70,7 (s, CHOH), 71,2 (s, CHOH), 72,8 (s, CHOH), 75,6 (s, CHOH), 78,9 (s, CHO), 103,1 (s, C_{anomérique}), 121,1 (sl, C₀² et C₁²), 128,0 (sl, C₀³), 129,8 (s, C₁³), 134,5 (s, C₀⁴), 136,8 (s, C₁⁴), 139,1 (s, CH=N), 149,2 (s, C₁¹), 152,3 (s, C₀¹), 173,5 (s, CONH) ppm.

B.4 Synthèse des dendrimères fluorescents

Les précurseurs du dendrimère fluorescent **14** ont été développés et caractérisés pour la première fois dans la thèse d'O. Rolland.⁽¹⁰⁾

B.4.1 Synthèse du phénol **13**

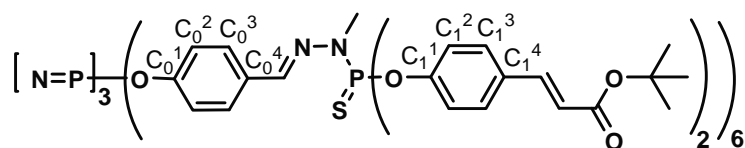


Dans un Schlenck supportant une surpression de quelques bars, on ajoute dans l'ordre suivant 0,28 mL (5 mmole) de H_2SO_4 , 2,4 g de MgSO_4 (20 mmole) et 20 mL de DCM. On agite pendant 15 minutes, ensuite on ajoute 837 mg d'acide *p*-hydroxycinnamique (5 mmole). La suspension résultante est de couleur jaune-verte. Puis on ajoute 2,4 mL de *tert*-butanol et la suspension vire au bleu. Après 10 minutes, la suspension devient blanche. Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante. Puis la réaction est stoppée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (20 mL). Le mélange est agité jusqu'à la dissolution totale du MgSO_4 . Ensuite la phase organique est séparée, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée à sec. L'huile jaune ainsi obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/ AcOEt , 9 :1, $R_f = 0,6$) pour obtenir **13** sous forme d'une poudre blanche (123 mg, 15%).

RMN^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : $\delta = 1,56$ (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 6,24 (d, $^3J_{\text{HH}} = 15,9$ Hz, 1H, CHCO), 6,48 (s, 1H, OH), 6,87 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, C^2H), 7,41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, C^3H), 7,55 (d, $^3J_{\text{HH}} = 15,9$ Hz, 1H, ArCH) ppm.

RMN^{13}C (CDCl_3 , 75,4 MHz) : $\delta = 28,0$ (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80,6 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120,4 (s, C^2), 121,8 (s, CHCO), 129,3 (s, C^3 et C^4), 153,0 (s, C^1), 142,2 (s, Ar-CH), 166,1 (s, CO) ppm.

B.4.2 Synthèse du dendrimère 17



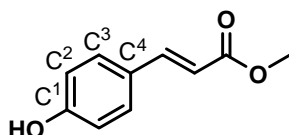
63 mg de phénol **13** (0,286 mmole) et 186 mg de carbonate de césium (0,570 mmole) sont ajoutés à une solution de **G1** (40 mg, 0,022 mmole) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h, centrifugé, filtré et évaporé à sec. Le résidu résultant est dissous dans 2 mL de THF et précipité dans 60 mL de pentane puis filtré. Cette opération est répétée trois fois pour obtenir **17** sous forme d'une poudre blanche (74 mg, 86%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): $\delta = 8,3$ (s, N_3P_3), 61,8 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): $\delta = 1,46$ (s, 108H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3,29 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10,5$ Hz, 18H, NCH_3), 6,31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 15,9$ Hz, 12H, CHCO), 7,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 12H, C_0^2H), 7,18 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 24H, C_1^2H), 7,41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 24H, C_1^3H), 7,55-7,62 (m, 30H, Ar-CH , $\text{CH}=\text{N}$ et C_0^3H) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): $\delta = 28,0$ (s, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 32,9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,4$ Hz, NCH_3), 80,6 (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 120,4 (s, CHCO), 121,4 (s, C_0^2), 121,7 (s, C_1^2), 128,2 (s, C_0^3), 129,2 (s, C_1^3), 131,2 (s, C_0^4), 132,1 (s, C_1^4), 138,9 (sl, $\text{CH}=\text{N}$), 142,1 (s, Ar-CH), 151,4 (s, C_0^1), 151,6 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7,1$ Hz, C_1^1), 166,1 (s, CO) ppm.

B.4.3 Synthèse du phénol 16

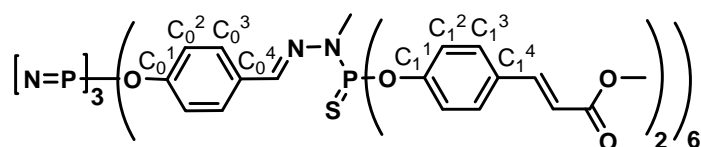


5 g d'acide 4-hydroxycinnamique (30,5 mmole) sont dissous dans 60 mL de MeOH. Ensuite on ajoute 10 gouttes d'acide sulfurique à 98%. Puis on chauffe au reflux du MeOH pendant 2 jours. Le brut réactionnel est refroidi à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu résultant est dissous dans 40 mL d'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée avec 20 mL d'eau distillée. La phase

organique est postérieurement lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane/acétate d'éthyle, 2 :1 puis 1 :1, R_f = 0,44) pour obtenir le phénol **16** sous forme d'une poudre blanche (2,241 g, 41%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 3,82 (s, 3H, CH₃), 5,70 (s, 1H, OH), 6,32 (d, ³J_{HH} = 15,9 Hz, 1H, CHCO), 6,87 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 1H, C²H), 7,45 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 1H, C³H), 7,66 (d, ³J_{HH} = 15,9 Hz, 1H, Ar-CH) ppm.

B.4.4 Synthèse du dendrimère 15



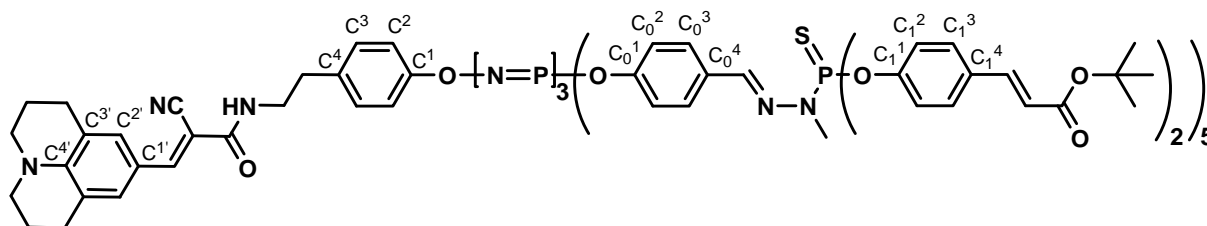
200 mg de phénol **16** (1,120 mmole) et 723 mg de carbonate de césium (2,220 mmole) sont ajoutés à une solution de **G1** (155 mg, 0,084 mmole) dans le THF (5 mL) à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h, centrifugé, filtré et évaporé à sec. Le résidu résultant est dissous dans 3 mL de THF et précipité dans 75 mL de pentane puis filtré. Cette opération est répétée trois fois pour obtenir **15** sous forme d'une poudre blanche (261 mg, 87%).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 8,3 (s, N₃P₃), 61,8 (P=S) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 3,29 (d, ³J_{PH} = 10,5 Hz, 18H, NCH₃), 3,78 (s, 36H, OCH₃), 6,31 (d, ³J_{HH} = 15,9 Hz, 12H, CHCO), 7,02 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 12H, C₁²H), 7,18 (d, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 24H, C₀²H), 7,41 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 24H, C₀³H), 7,56-7,63 (m, 30H, Ar-CH, C₀³H, N=CH) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 32,9 (d, ²J_{CP} = 12,4 Hz, NCH₃), 51,7 (s, OCH₃), 118,0 (s, CHCO), 121,4 (s, C₀²), 121,9 (s, C₁²), 128,3 (s, C₀³), 129,4 (s, C₁³), 131,8 (s, C₁⁴), 132,1 (s, C₀⁴), 138,9 (d, ³J_{CP} = 14,2 Hz, CH=N), 143,4 (s, Ar-CH), 151,3 (s, C₀¹), 151,8 (s, C₁¹), 167,2 (s, CO) ppm.

B.4.5 Synthèse du dendrimère fluorescent 14



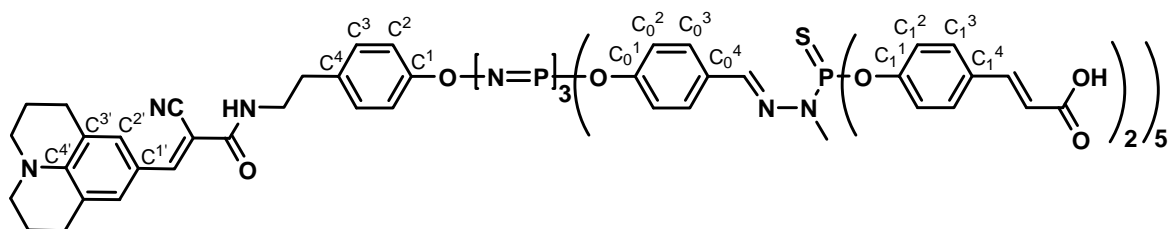
203 mg du dendrimère précurseur **12** (0,105 mmole) et 255 mg du phénol **13** (1,159 mmole) sont dissous dans 6,5 mL du THF. La solution sous agitation magnétique est refroidie à 0 °C. Ensuite on additionne en petites portions 752 mg de Cs₂CO₃ (2,310 mmole). Le mélange réactionnel est agité pendant 12 h. Puis il est centrifugé, filtré et évaporé à sec. Le résidu résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant : hexane/AcOEt, 4 :1 à 3 :1 à 1 :1, R_f (hexane/AcOEt, 2 :1) = 0,17) pour obtenir le dendrimère fluorescent **14** sous forme d'un solide jaune (331 mg, 87%).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 121,5 MHz): δ = 8,4 (s, N₃P₃), 61,9 (m, P=S) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): δ = 1,52 (s, 90H, C(CH₃)₃), 1,56 (sl, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 1,90-2,00 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 2,60-2,80 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂-N et CH₂-CH₂-NH), 3,26-3,35 (m, 15H, NCH₃), 3,40-3,55 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 6,25 (d, ³J_{HH} = 15,9 Hz, 10H, CHCO), 6,70-6,80 (m, 2H, C²H), 6,90-7,10 (m, 14H, C₀²H, C²H et C³H), 7,16-7,21 (m, 20H, C₁²H), 7,41 (sl, 20H, C₁³H), 7,46 (d, ³J_{HH} = 15,9 Hz, 10H, Ar-CH), 7,61-7,67 (m, 16H, C₀³H, CH=N et HC=C-CN) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): δ = 21,2 (sl, CH₂-CH₂-CH₂-N), 27,6 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 28,2 (s, C(CH₃)₃), 32,8-33,0 (m, NCH₃), 34,2 (s, CH₂-CH₂-NH), 41,0 (s, CH₂-CH₂-NH), 50,1 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 80,6 (s, C(CH₃)₃), 93,3 (s, C-CN), 118,4 (s, CN), 120,4 (s, CHCO), 120,7 (s, C³), 121,1 (s, C²), 121,4 (s, C₀²), 121,8 (s, C₁²), 128,3 (s, C₀³), 129,3 (s, C₁³), 129,8 (s, C³), 131,1 (s, C²), 131,3 (s, C¹), 131,9 (s, C₀⁴), 132,1 (s, C₁⁴), 135,8 (s, C⁴), 139,0 (sl, CH=N), 142,2 (s, Ar-CH), 147,0 (s, C⁴), 151,6 (sl, C₀¹, C₁¹ et C¹), 152,2 (s, HC=C-CN), 162,5 (s, CONH), 166,1 (s, COO^tBu) ppm.

B.4.6 Synthèse du dendrimère fluorescent 11-Df



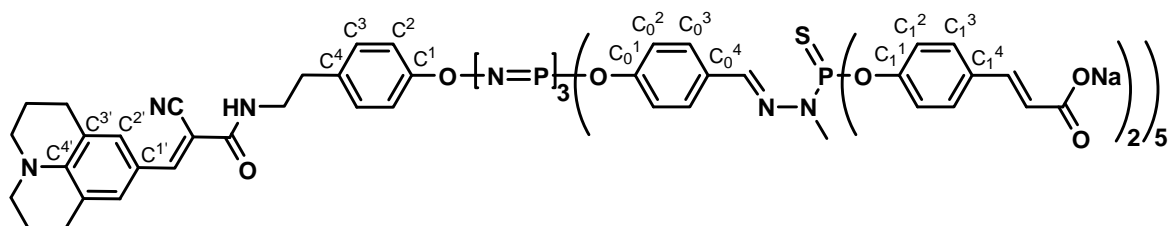
Une solution à 20% de TFA dans le dichlorométhane (20 mL) est ajoutée goutte à goutte sur 300 mg du dendrimère **14** (0,083 mmole) et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1,5 h. Le résidu brut est co-évacué avec de l'acétate d'éthyle pour enlever les traces de TFA puis évaporé à sec. Cette séquence est répétée jusqu'à totale disparition du signal du TFA en spectroscopie de RMN du ^{19}F pour donner **11-Df** sous forme d'une poudre jaune (254 mg, 100%).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO, 121,5 MHz): $\delta = 8,5$ (s, N_3P_3), 61,9 (sl, $\text{P}=\text{S}$), 63,5 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (DMSO, 400,1 MHz): $\delta = 1,45\text{-}1,55$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 2,60-2,85 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ et $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3,20-3,33 (m, 21H, NCH_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ et $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 6,42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 15,6$ Hz, 10H, CHCO), 6,80-7,40 (m, 36H, C^2H , C_0^2H , C^2H , C^3H et C_1^2H), 7,45-8,00 (m, 36H, Ar- CH , C_1^3H , C_0^3H , $\text{CH}=\text{N}$ et $\text{HC}=\text{C-CN}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO, 100,6 MHz): $\delta = 22,5$ (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 26,8 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 33,3 (sl, NCH_3), 34,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 41,6 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 49,5 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 93,0 (s, C-CN), 117,4 (s, CN), 119,8 (s, CHCO), 120,9 (s, C^3), 121,4 (s, C_0^2 et C^2), 121,9 (s, C_1^2), 128,7 (s, C_0^3), 130,2 (s, C_1^3), 130,5 (s, C^3), 131,7 (s, C^2), 131,8 (s, C^1), 132,2 (s, C_1^4), 132,4 (s, C_0^4), 137,0 (s, C^4), 141,0 (sl, $\text{CH}=\text{N}$), 143,1 (s, Ar- CH), 143,2 (s, C^4), 148,5 (sl, C^1), 150,5 (sl, C_0^1), 151,7 (sl, $\text{HC}=\text{C-CN}$ et C_1^1), 167,8 (s, COOH), 167,9 (s, CONH) ppm.

B.4.7 Synthèse du dendrimère fluorescent **25-Df(Na)₁₀**

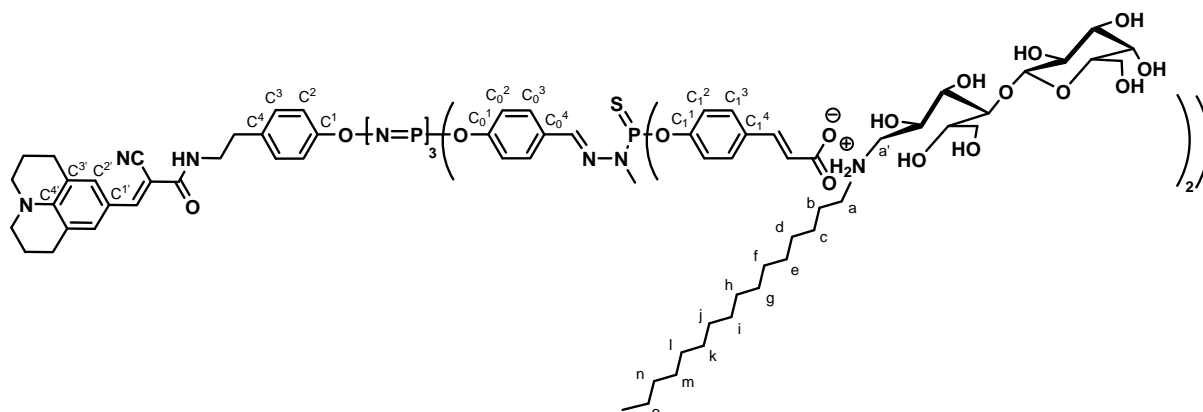


Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1023 N, 3,18 mL) est additionnée goutte à goutte à une suspension de **11-Df** (100 mg, 0,032 mmole) dans l'eau (5 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel est filtré sur filtre micropore (1,2 µm) puis lyophilisé pour obtenir **25-Df(Na)₁₀** sous forme d'un solide jaune (102 mg, 97%).

RMN ³¹P{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): δ = 8,5 (s, N₃P₃), 61,9 (s, P=S), 62,0 (s, P=S), 63,5 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 300,1 MHz): δ = 1,70-1,80 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 2,30-2,65 (m, 6H, CH₂-CH₂-NH et CH₂-CH₂-CH₂-N), 3,18-3,27 (m, 15H, NCH₃), 3,50-3,90 (m, 6H, CH₂-CH₂-NH et CH₂-CH₂-CH₂-N), 6,34 (d, ³J_{HH} = 15,0 Hz, 10H, CHCO), 6,65-6,75 (m, 2H, C²H), 6,80-6,85 (m, 2H, C²H), 6,90-7,00 (m, 10H, C₀²H), 7,05-7,10 (m, 20H, C₁¹H), 7,22-7,25 (m, 2H, C³H), 7,43 (d, ³J_{HH} = 18,0 Hz, 10H, Ar-CH), 7,50-7,65 (m, 30H, C₁³H et C₀³H), 7,70-7,90 (m, 2H, CH=N et HC=C-CN) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 75,5 MHz): δ = 22,1 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 27,0 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 32,9 (sl, NCH₃), 35,1 (s, CH₂-CH₂-NH), 40,3 (s, CH₂-CH₂-NH), 49,2 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 93,9 (s, C-CN), 117,5 (s, CN), 119,3 (s, CHCO), 120,3 (s, C³), 120,8 (s, C₀² et C²), 121,3 (s, C₁²), 128,2 (s, C₀³), 129,7 (s, C₁³), 130,1 (s, C³), 131,7 (s, C²), 131,9 (s, C¹), 134,0 (s, C₁⁴), 135,0 (s, C₀⁴), 138,0 (s, C⁴), 140,0 (sl, CH=N), 142,6 (s, Ar-CH), 143,5 (s, C⁴), 147,5 (sl, C¹), 151,1 (s, C₀¹), 151,2 (s, HC=C-CN et C₁¹), 167,4 (s, CONH), 174,7 (s, COONa) ppm.

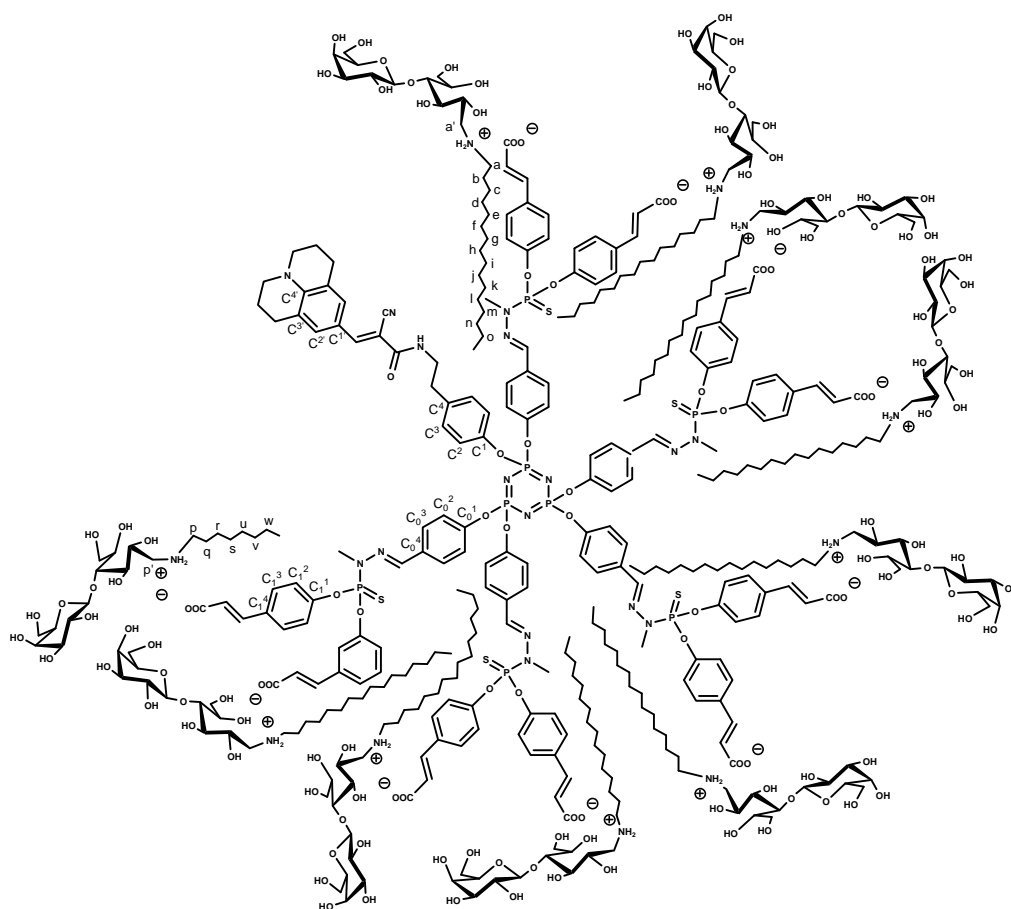
B.4.8 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 26-Df(L16)₁₀

50 mg de dendrimère **11-Df** (0,016 mmole) et 91 mg de **L16** (0,160 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL). Le mélange réactionnel reste pendant 2 jours sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Le mélange final homogène et jaune est lyophilisé pour obtenir **26-Df(L16)₁₀** sous forme d'un solide jaune cotonneux (143 mg, 100%).

RMN ³¹P{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3 : 1, 121,5 MHz): δ = 9,8 (s, N₃P₃), 63,7 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 500,1 MHz): δ = 1,59 (sl, 30H, CH₃), 1,98 (sl, 264H, C_{c-o}H₂ et CH₂-CH₂-CH₂-N), 2,37 (sl, 26H, C_bH₂, CH₂-CH₂-NH et CH₂-CH₂-CH₂-N), 3,61-3,83 (m, 57H, NCH₃, C_aH₂, C_aH₂ et CH₂-CH₂-NH), 4,00-4,20 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 4,37-4,51 (m, 220H, 2 CH₂OH, 6 CHOH et 2CHO), 5,15-5,28 (m, 10H, CH_{anomérique}), 7,15-7,30 (m, 10H, CHCO), 7,65-7,89 (m, 14H, C²H, C²H et C₀²H), 8,03 (sl, 20H, C₁²H), 8,09-8,15 (m, 12H, Ar-CH et C³H), 8,24 (sl, 20H, C₁³H), 8,32-8,40 (m, 10H, C₀³H), 8,50-8,56 (m, 6H, CH=N et HC=C-CN) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 75,5 MHz): δ = 14,1 (s, CH₃), 22,9 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 28,0 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N), 30,3 (s, C_{b-o}), 32,2 (s, NCH₃), 36,0 (s, CH₂-CH₂-NH), 41,9 (s, CH₂-CH₂-NH), 49,5 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N, C_a et C_a'), 61,5 (s, CH₂OH), 63,1 (s, CH₂OH), 71,2 (s, CHOH), 73,3 (s, CHOH), 76,5 (s, CHO), 78,0 (s, CHO), 81,5 (s, CHOH), 86,3 (s, CHOH), 96,5 (s, C-CN), 104,1 (sl, C_{anomérique}), 117,5 (s, CN), 121,5 (s, CHCO), 121,9 (s, C³), 122,5 (s, C₀² et C²), 122,8 (s, C₁²), 130,1 (s, C₀³), 131,5 (s, C₁³), 135,5 (sl, C³, C², C¹, C₁⁴, C₀⁴ et C⁴), 143,5 (s, Ar-CH), 144,5 (s, C⁴), 146,5 (sl, C¹), 149,9 (sl, C₀¹), 153,5 (sl, HC=C-CN et C₁¹), 168,7 (s, CONH), 170,2 (s, COOL) ppm.

B.4.9 Synthèse de l'assemblage cationique fluorescent 27-Df(L8)(L16)₁₀

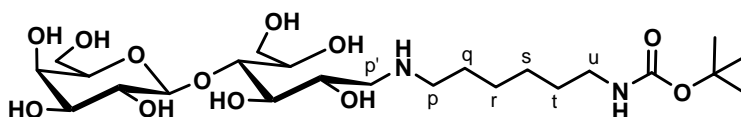
50 mg de dendrimère **11-Df** (0,016 mmole), 82 mg de **L16** (0,144 mmole) et 7,3 mg de **L8** (0,016 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL). Le mélange réactionnel reste pendant 2 jours sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Le mélange final homogène et jaune est lyophilisé pour obtenir **27-Df(L8)(L16)₁₀** sous forme d'un solide jaune cotonneux (141 mg, 100%).

RMN ³¹P{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): δ = 9,1 (sl, N₃P₃), 62,1 (sl, P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 500,1 MHz): δ = 1,61 (sl, 30H, CH₃), 2,00 (sl, 242H, C_{c-o}H₂, C_{r-v}H₂ et CH₂-CH₂-CH₂-N), 2,40 (sl, 26H, C_bH₂, C_qH₂, CH₂-CH₂-NH et CH₂-CH₂-CH₂-N), 3,62-3,86 (m, 57H, NCH₃, C_aH₂, C_{a'}H₂, C_pH₂, C_{p'}H₂ et CH₂-CH₂-NH), 4,07-4,14 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 4,39-4,53 (m, 220H, 2 CH₂OH, 6 CHOH et 2CHO), 4,91-5,24 (m, 10H, CH_{anomérique}), 7,25-7,36 (m, 10H, CHCO), 7,50-7,80 (m, 14H, C²H, C²H et C₀²H), 7,90 (sl, 20H, C₁²H), 8,05-8,15 (m, 12H, Ar-CH et C³H), 8,26 (sl, 20H, C₁³H), 8,27-8,50 (m, 10H, C₀³H), 8,51-8,60 (m, 6H, CH=N et HC=C-CN) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO, 125,8 MHz): δ = 14,3 (s, CH_3), 22,5 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 27, 2 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 29,1 (sl, $\text{C}_{\text{r-v}}$ et $\text{C}_{\text{c-o}}$), 29,4 (sl, C_b et C_q), 31,7 (s, NCH_3), 35,0 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 42,3 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 49,6 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 49,8 (s, C_a et C_p), 52,7 (s, C_a et C_p), 61,2 (s, CH_2OH), 62,7 (s, CH_2OH), 68,9 (s, CHOH), 71,5 (s, CHOH), 73,7 (s, CHO), 76,1 (s, CHO), 79,1 (s, CHOH), 79,5 (s, CHOH), 81,9 (s, CHOH), 91,2 (s, C-CN), 104,6 (s, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 117,3 (s, CN), 119,5 (s, CHCO), 120,5 (s, C^3), 121,6 (s, C_0^2 et C^2), 121,8 (s, C_1^2), 128,2 (s, C_0^3), 129,4 (s, C_1^3), 130,9 (s, C^3), 131,4 (s, C^2), 131,6 (s, C^1), 132,0 (s, C_1^4), 132,3 (s, C_0^4), 136,5 (s, C^4), 142,3 (s, Ar-CH), 142,5 (s, C^4), 148,3 (sl, C^1), 149,9 (sl, C_0^1), 151,7 (sl, HC=C-CN et C_1^1), 168,3 (s, CONH), 170,2 (s, COOL) ppm.

B.4.10 Synthèse du composé 22

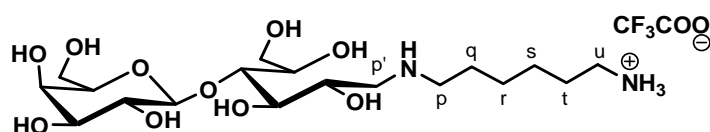


998 mg de lactose (2,774 mmole) sont dissous dans 5,5 mL d'eau distillée. Cette solution est chauffée jusqu'à solubilisation complète du lactose. Puis on ajoute une solution de 1 g de *tert*-butyl ester de l'acide (6-amino-héxyl)-carbamique (4,623 mmole) dans 9,2 mL d'isopropanol. Après 14 h d'agitation à température ambiante, on obtient une suspension blanche. Cette dernière est chauffée à 60 °C pendant 6 h. Puis le mélange réactionnel est évaporé à sec pour obtenir une huile jaune pâle (1,5 g, 2,774 mmole, 100%) qui est directement engagée dans l'étape suivante. L'huile jaune pâle est dissoute dans 100 mL de MeOH. Puis 147 mg de NaBH_4 (3,884 mmole) sont ajoutés à température ambiante et la solution initialement jaune pâle devient incolore. Après 24 h d'agitation à température ambiante, on ajoute 25 mg de NaBH_4 . Le mélange réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 24 h. Finalement, on ajoute 10 mg de NaBH_4 et on laisse agiter pendant 48 h à température ambiante. Le brut réactionnel est ensuite évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris au MeOH deux fois (50 mL), évaporé à sec à 40 °C et lavé à l'éther. Le surnageant est enlevé. Le résidu résultant est séché puis lavé au DCM à la canule deux fois (50 mL) pour obtenir **21** sous forme d'une poudre blanche (1,219 g, 81%).

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3 :1, 400,1 MHz): δ = 1,27 (sl, 4H, C_rH_2 et C_sH_2), 1,36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,37-1,52 (m, 4H, C_qH_2 et C_tH_2), 2,52-2,70 (m, 4H, C_pH_2 , $\text{C}_p'\text{H}_2$), 2,99 (m, 2H, C_uH_2), 3,35-4,20 (m, 12H, 6 CHOH, 2 CH_2OH et 2 CHO), 4,35 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{anomérique}}$) ppm.

M.S. (Electrospray) : m/z = 565,5 [MNa^+]; 543,7 [MH^+]; 381,4 [$\text{MH}^+ - \text{GalOH}$].

B.4.11 Synthèse du composé 23



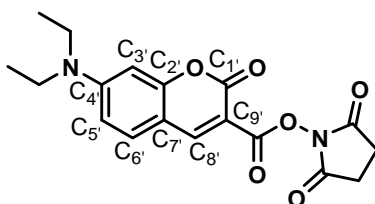
200 mg du composé **22** (0,369 mmole) sont dissous dans 9 mL d'un mélange TFA/eau (8 :1) à 0 °C. On laisse sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Puis on évapore à sec. Cette procédure est répétée une autre fois. Le résidu obtenu est lavé à l'éther et séché sous vide pour obtenir **23** sous forme d'une poudre blanche (235 mg, 95% déterminé par RMN).

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3 :1, 500,3 MHz): δ = 1,52-1,53 (m, 2H, C_rH_2), 1,76-1,83 (m, 2H, C_sH_2), 3,10 (t, $^3J_{\text{HH}} = 10,0$ Hz, 2H, C_qH_2), 3,19-3,22 (m, 2H, C_tH_2), 3,24-3,29 et 3,42-3,43 (m, 2H, C_uH_2), 3,63-3,69 (m, 2H, 2 CHO), 3,80 (m, 2H, 2 CHOH), 3,81-3,84 et 3,96-4,00 (m, 2H, C_pH_2), 3,87-3,89 (m, 4H, C_pH_2 et 2 CHOH), 4,04-4,07 (m, 4H, CH_2OH et 2 CHOH), 4,29-4,32 (m, 2H, CH_2OH), 4,63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5,0$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{anomérique}}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3 :1, 125,8 MHz): δ = 25,2 (s, C^r), 25,7 (s, C^s), 26,6 (s, C^t), 39,6 (s, C^q), 47,9 (s, C^u), 61,4 (s, C^p), 62,2 (s, $\text{C}^{p'}$), 67,9 (s, CH_2OH), 68,9 (s, CH_2OH), 70,8 (s, 2 CHOH), 71,2 (s, 2 CHO), 72,7 (s, 2 CHOH), 75,5 (s, CHOH), 78,7 (s, CHOH), 102,9 (s, $\text{C}_{\text{anomérique}}$), 116,6 (q, $^1J_{\text{CF}} = 291,8$ Hz, CF_3), 162,9 (q, $^2J_{\text{CF}} = 35,2$ Hz, CO) ppm.

M.S. (Electrospray) : m/z = 465,5 [MNa^+]; 443,4 [MH^+]; 281,3 [$\text{MH}^+ - \text{GalOH}$].

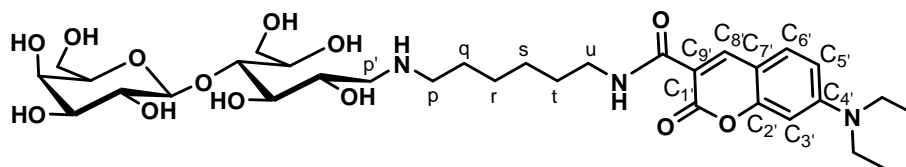
B.4.12 Synthèse du composé 24



250 mg d'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyle)carbodiimide (EDAC) (1,306 mmole) et 140 mg de N-hydroxysuccinimide (NHS) (1,220 mmole) sont mis en suspension dans 4 mL de DMF distillé à l'abri de la lumière et à température ambiante. Puis une solution de 300 mg de l'acide 7-diéthylamino-2-oxo-2H-chromène-3-carboxylique (1,148 mmole) dans 6 mL de DMF distillé est ajoutée au mélange réactionnel qui devient jaune instantanément. Puis il est agité pendant 72 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite stoppée avec 150 mL d'un mélange eau/glace. Après agitation, la phase organique jaune est séparée et lavée de nouveau avec 200 mL d'eau et séchée à l'abri de la lumière. L'ester de N-hydroxysuccinimide **24** est obtenu sous forme d'une poudre jaune (382 mg, 93%) et il sera utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): δ = 1,26 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6,9 Hz, 6H, 2 CH_3), 3,49 (q, $^3J_{\text{HH}}$ = 7,2 Hz, 4H, 2 CH_2), 6,48 (d, $^4J_{\text{HH}}$ = 2,4 Hz, 1H, C_8H), 6,65 (dd, $^3J_{\text{HH}}$ = 9,0 Hz, $^4J_{\text{HH}}$ = 2,4 Hz, 1H, C_6H), 7,26 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 6,6 Hz, 1H, C_5H), 8,56 (s, C_3H) ppm.

B.4.13 Synthèse du composé 18-Lf



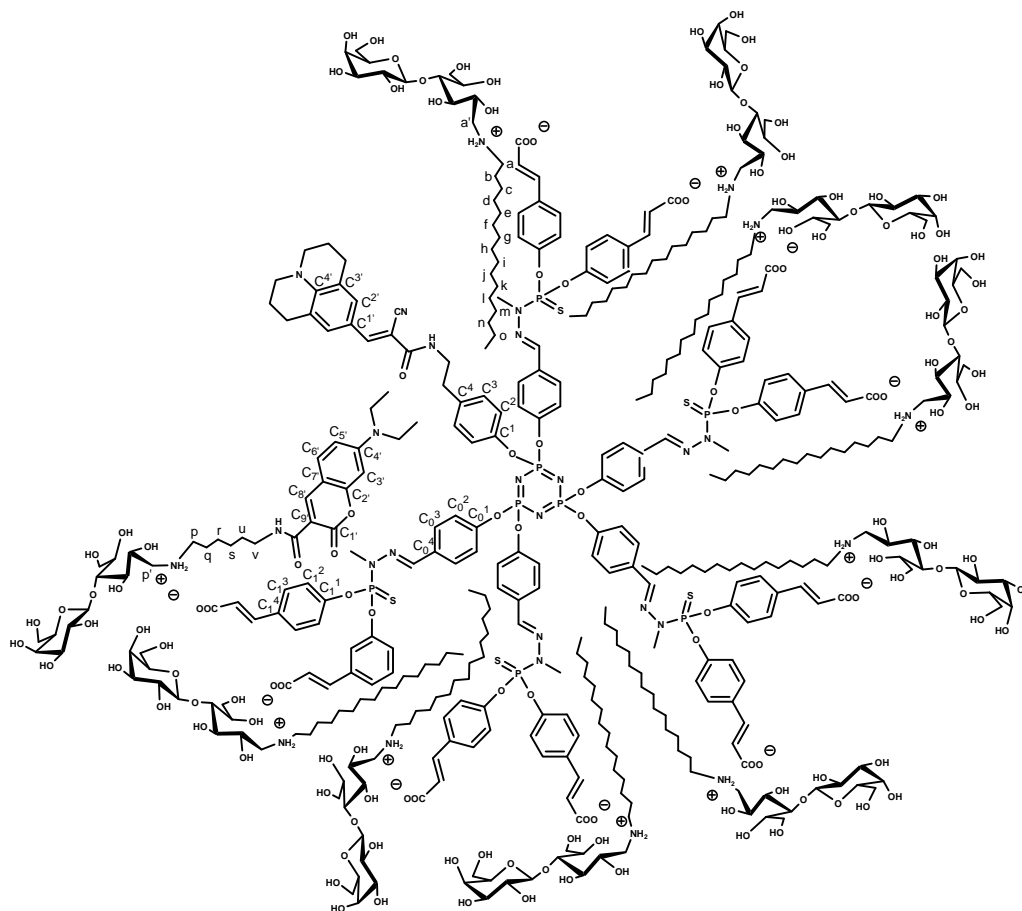
200 mg du composé **23** (0,298 mmole) et 107 mg du composé **24** (0,298 mmole) sont dissous dans 3 mL de DMF distillé. Puis on ajoute 104 μL d' Et_3N distillée (0,746 mmole). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 h à température ambiante en absence totale de lumière. Le brut réactionnel est précipité avec de l'éther. Puis le résidu solide est relavé avec un mélange MeOH /éther. Finalement,

le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/MeOH, 6 :1, Rf = 0,11) pour obtenir **18-Lf** sous forme d'un solide jaune (46 mg, 23%).

RMN ^1H (Acétone- d_6 , 300,1 MHz): δ = 1,25 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz, 6H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 1,41-1,46 (m, 2H, C $_t$ H et C $_s$ H), 1,59-1,64 (m, 2H, C $_t$ H), 1,83-1,85 (m, 2H, C $_q$ H), 3,04 (sl, 9H, OH et NH), 3,13-3,20 (m, 2H, C $_u$ H), 3,36-3,45 (m, 4H, C $_p$ H et C $_p$ H), 3,58 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz, 4H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 3,65-3,97 (m, 12H, 2 CHO, 2 CH $_2$ OH et 6 CHOH), 4,66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 1H, CH $_{\text{anomérique}}$), 6,56 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,1$ Hz, 1H, C $_3$ H), 6,84 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz, 1H, C $_5$ H), 7,62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 1H, C $_6$ H), 8,70 (s, 1H, C $_8$ H), 8,80 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,7$ Hz, 1H, NH) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Acétone- d_6 , 75,5 MHz): δ = 11,8 (s, N-CH $_2$ -CH $_3$), 25,8 (s, C $_q$), 25,9 (s, C $_v$), 31,1 (s, C $_l$), 38,8 (s, C $_s$), 44,6 (s, N-CH $_2$ -CH $_3$), 50,3 (s, C $_p$), 54,1 (s, C $_p$), 54,6 (s, C $_w$), 61,7 (s, CH $_2$ OH), 62,1 (s, CH $_2$ OH), 67,9 (s, CHOH), 69,7 (s, CHOH), 70,3 (s, CHO), 71,0 (s, CHO), 71,4 (s, CHOH), 73,2 (s, CHOH), 75,4 (s, CHOH), 80,6 (s, CHOH), 96,1 (s, C $_3$), 110,1 (s, C $_5$), 119,2 (s, C $_7$), 131,4 (s, C $_6$), 139,9 (s, C $_9$), 146,0 (s, C $_4$), 147,9 (s, C $_8$), 152,8 (s, C $_2$), 162,8 (s, C $_1$), 190,1 (s, CONH) ppm.

S.M. (Electrospray): m/z = 687,4 [MH $^+$]; 443,3 [MH $^+$ -chromophore].

B.4.14 Synthèse de l'assemblage catanionique fluorescent 28-Df(Lf)(L16)₉

50 mg de dendrimère **11-Df** (0,016 mmole), 82 mg de **L16** (0,144 mmole) et 11 mg de **Lf** (0,016 mmole) sont dissous dans l'eau distillée (10 mL). Le mélange réactionnel reste pendant 2 jours sous agitation magnétique vigoureuse à température ambiante. Le mélange final homogène et jaune est lyophilisé pour obtenir **28-Df(Lf)(L16)₁₀** sous forme d'un solide jaune cotonneux (145 mg, 100%).

RMN ³¹P{¹H} (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121,5 MHz): δ = 9,6 (N₃P₃), 62,4 (P=S), 63,6 (P=S) ppm.

RMN ¹H (D₂O/CD₃CN, 3:1, 500,1 MHz): δ = 1,68 (sl, 33H, CH₃ et N-CH₂-CH₃), 2,09 (sl, 242H, C_{c-o}H₂, C_fH₂, C_sH₂ et CH₂-CH₂-CH₂-N), 2,31-2,43 (m, 28H, C_bH₂, C_qH₂, C_uH₂, CH₂-CH₂-NH et CH₂-CH₂-CH₂-N), 3,30-3,90 (m, 63H, NCH₃, C_aH₂, C_aH₂, C_pH₂, C_pH₂, C_uH₂, N-CH₂-CH₃ et CH₂-CH₂-NH), 4,05-4,14 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N), 4,20-4,65 (m, 220H, 2 CH₂OH, 6 CHOH et 2CHO), 5,19-5,31 (m, 10H, CH_{anomérique}), 7,20-7,30 (m, 10H, CHCO), 7,60-7,80 (m, 16H, C₃H, C₅H,

C^2H , C^2H et C_0^2H), 7,85-7,95 (m, 20H, C_1^2H), 8,00-8,15 (m, 13H, Ar- \underline{CH} , C_6H et C^3H), 8,20-8,30 (m, 20H, C_1^3H), 8,32-8,40 (m, 10H, C_0^3H), 8,55-8,65 (m, 7H, C_8H , $CH=N$ et $HC=C-CN$) ppm.

RMN $^{13}C\{^1H\}$ (D_2O/CD_3CN , 3:1, 75,5 MHz): δ = 11,5 (s, N- $\underline{CH_2-CH_3}$), 14,1 (s, CH_3), 23,9 (s, $\underline{CH_2-CH_2-N}$), 27, 0 (s, $\underline{CH_2-CH_2-CH_2-N}$), 31,0 (sl, C_{q-u} et C_{b-o}), 32,9 (s, NCH_3), 36,9 (s, $\underline{CH_2-CH_2-NH}$), 41,1 (s, $\underline{CH_2-CH_2-NH}$), 43,2 (s, N- $\underline{CH_2-CH_3}$), 50,3 (sl, $\underline{CH_2-CH_2-CH_2-N}$, C_a , C_p , C_a' et C_p'), 52,9 (s, C_w), 60,2 (s, CH_2OH), 61,9 (s, CH_2OH), 68,5 (s, $CHOH$), 71,1 (s, $CHOH$), 73,4 (s, CHO), 75,0 (s, CHO), 78,8 (s, $CHOH$), 82,8 (s, $CHOH$), 95,5 (sl, $\underline{C-CN}$ et C_3), 102,3 (s, $C_{anomérique}$), 110,1 (s, C_5), 115,0 (s, CN), 116,1 (s, C_7), 121,3 (s, $CHCO$), 122,8 (s, C^3), 124,0 (s, C^2), 124,2 (s, C_0^2), 124,8 (s, C_1^2), 128,7 (s, C_0^3), 130,2 (s, C_1^3 et C_6), 133,7 (s, C^3 , C^2 , C^1 , C_1^4 , C_0^4 et C^4), 138,1 (s, C_9), 141,1 (s, Ar- \underline{CH}), 143,7 (s, C^4), 144,1 (s, C_4), 146,6 (s, C^1), 148,2 (s, C_8), 150,1 (s, C_0^1), 152,8 (s, C_2), 153,7 (sl, $HC=C-CN$ et C_1^1), 162,8 (s, C_1), 167,9 (s, $CONH$), 173,1 (s, \underline{COOL}) ppm.

C Tests biologiques

Les tests antiviraux *in vitro* ont été réalisés par le Dr. Christiane Moog à l'Institut de Virologie INSERM à Strasbourg.

Les lignées cellulaires CEM-SS et MT4 ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Ce milieu biologique contient 100 UI/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine, 2 mM de glutamine auquel additionné 10% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté 30 minutes à 56 °C. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37 °C sous 5% de CO_2 et repiquées 3 fois par semaine.

Les composés dendritiques ont été analysées pour leur capacité à inhiber la réplication du VIH-1 IIIB dans des lignées cellulaires MT4 et du virus VIH-1 LAI dans des lignées cellulaires CEM-SS. L'activité inhibitrice de l'antiviral AZT a été analysée en parallèle dans chaque test, comme référence interne. Deux expériences indépendantes ont été effectuées avec différentes concentrations. La CI_{50} et la CC_{50} ont été déterminées pour les deux expériences.

C.1 Conditions expérimentales d'infection des cellules CEM-SS et MT4

Les cellules CEM-SS ont été infectées par le VIH-1 LAI et les cellules MT4 par le VIH-1 IIIB.

Le virus VIH-1 LAI et VIH-1 IIIB, conservés à -80 °C, sont décongelés en présence de sérum pendant 5 minutes à 37 °C. Des aliquots de virus sont ensuite incubés avec respectivement des cellules CEM-SS et des cellules MT4 pendant 1 h, à 37 °C. Les virus qui n'ont pas pénétré dans les cellules sont éliminés par trois lavages successifs dans le RPMI 1640. Ces cultures cellulaires infectées par le VIH sont ensuite reversées dans un milieu de RPMI et sont traitées avec des solutions des produits à tester (solutions de différentes concentrations (10^{-3} M à 10^{-7} M) obtenues par dilution d'une solution mère des dérivés catanioniques dendritiques et des sels de sodium correspondants) dans le RPMI. Ces cultures cellulaires sont maintenues à 37 °C sous 5% de CO₂ pendant 5 jours. De plus, on maintient des cultures cellulaires infectées et non traitées et des cultures cellulaires non infectées, traitées et non traitées, dans ces mêmes conditions expérimentales.

Les tests d'évaluation de l'activité anti-VIH et de la cytotoxicité des dérivés dendritiques sont réalisés après 5 jours d'incubation.

C.2 Evaluation de l'activité anti-VIH

La production de virus sur des cellules CEM-SS est évaluée après 5 jours d'incubation par mesure de l'activité de la transcriptase inverse du VIH qui est présente dans le liquide surnageant. Le pourcentage de l'inhibition de la TI, qui donne les valeurs de CI₅₀, est déterminé par comparaison avec les cellules infectées et non traitées. L'inhibition de la TI est évaluée par la mesure de l'incorporation d'uridine radioactive. Pour cela, une quantité précise d' [³H]-uridine est additionnée à un volume minimal de milieu de culture frais puis les cellules sont incubées pendant 6 h. Ensuite, elles sont lysées avec 1% de SDS (dodecyl sulfate de sodium) puis déposées sur des carrés de papier Whatman et les ARN sont précipités en présence de 10% d'acide trichloracétique (TCA) pendant 20 minutes à 4 °C. Après 2 lavages avec 5% TCA et 2 lavages avec 70% éthanol, la radioactivité incorporée est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman, LS 1800).

Le pourcentage d'inhibition de la transcriptase inverse est déterminé par rapport aux cellules infectées non traitées.

$$\% \text{ d'inhibition de la réplication virale} = 100 - \frac{\text{Rad}_{\text{des cellules infectées traitées}} - \text{Rad}_{\text{des cellules non infectées non traitées}}}{\text{Rad}_{\text{des cellules infectées non traitées}} - \text{Rad}_{\text{des cellules non infectées non traitées}}}$$

Rad = radioactivité

Dans le cas des cellules MT4, la détermination de l'activité antivirale des composés testés après 5 jours d'incubation est basée en la réduction de la pathogénécité induite par le VIH. L'activité métabolique peut être mesurée grâce à la capacité des déshydrogénases mitochondriales des cellules métaboliquement actives à réduire le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) de couleur jaune, en formazan de couleur bleu-violet (Figure C.1), qui précipite sous forme de cristaux dans les cellules.

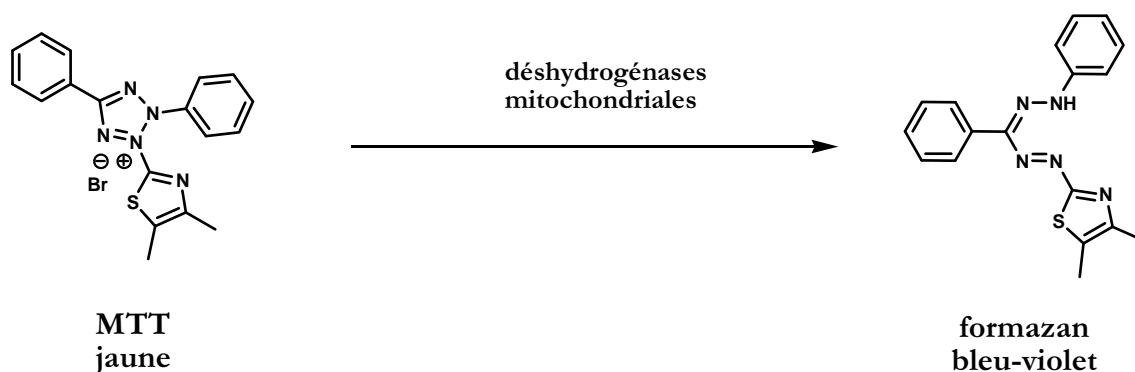


Figure C.1 Schéma de la réaction de réduction du MTT en formazan

Les cristaux de formazan sont solubilisés dans l'isopropanol contenant HCl 0,04 N et 10% de Triton-X100. Après la solubilisation, la quantité de formazan produite est évaluée par mesure de sa densité optique à 540 nm (DO_{540}) en permettant ainsi de déterminer le nombre de cellules vivantes. La quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à la CI_{50} .

C.3 Evaluation de la cytotoxicité

Le test MTT a aussi été utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité dans les deux lignées cellulaires.

Le pourcentage de toxicité est calculé par rapport aux cellules non infectées et non traitées avec les composés anti-VIH testés.

$$\% \text{ Cytotoxicité} = 100 - \frac{DO_{540} \text{ des cellules non infectées traitées}}{DO_{540} \text{ des cellules non infectées non traitées}} \times 100$$

D Techniques de caractérisation physico-chimique

D.1 Préparation des solutions des composés cationiques et leurs précurseurs anioniques

Les solutions mères aqueuses des dendrimères cationiques et leurs précurseurs ont été préparées par solubilisation des différents produits sous forme de poudre dans l'eau ultrapure. Les solutions de titre désiré ont été préparées par dilutions successives des solutions mères. Toutes les solutions ont été laissées à température ambiante pendant 1 heure au moins avant les prises de mesures.

Les solutions mères des dendrimères cationiques dans le PBS sont préparées par solubilisation des composés dans une solution aqueuse de PBS 0,15 M (force ionique dans le milieu biologique).

D.2 Mesure de tension de surface

Les mesures de tension de surface des dendrimères anioniques ont été réalisées avec un tensiomètre Krüss G10, model DSA 10-MK2 par la méthode de la goutte pendante. Le principe de l'appareil est l'analyse de la forme du profil de la goutte formée au bout d'un capillaire. Cette forme dépend de la compétition entre forces de gravité et forces capillaires. La forme de la goutte est décrite par l'équation de Young-Laplace qui, pour un système asymétrique tel que celui de la goutte, se simplifie en équation de Bashforth-Adams. Sa résolution permet d'avoir accès à la tension de surface.

Les mesures de tension de surface des dendrimères cationiques ont été réalisées avec un tensiomètre Krüss EasyDyne par la méthode de l'anneau selon Du Noüy à 25°C. La technique consiste à déformer l'interface air-eau et à mesurer la force nécessaire à la rupture du film de surface. Les valeurs ont été corrigées en utilisant le tableau de correction Harkins-Jordan. Les mesures en solution de PBS ont été réalisées par Mme. F. Rodrigues au laboratoire des IMRCP.

D.3 Détermination des liaisons hydrogène intermoléculaires par infrarouge

Les mesures pour la détermination des liaisons hydrogène intermoléculaires ont été réalisées par Mme C. Routaboul au Service Commun de Spectroscopies Infrarouge et Raman de l'Université

Paul Sabatier (Toulouse). Des solutions aqueuses des dendrimères anioniques **1c-G1** et **2c-G1** ont été préparées par dilutions successives d'une concentration mère de ces dendrimères dans l'eau distillée. Les échantillons sont préparés à des concentrations supérieures et inférieures à la CAC. Puis elles ont été observées à 25 °C avec un spectromètre Nexus Thermo Nicolet.

D.4 Diffusion quasi-élastique de la lumière

Les études de diffusion quasi-élastique de la lumière des dendrimères cationiques et leurs précurseurs anioniques ont été réalisées à l'aide d'un appareil Malvern Instrument Zetasizer 3000HR tandis que pour les dendrimères fluorescents, nous avons utilisé un appareil Malvern Instrument Zetasizer 3000HSA à 298K.

La lumière émise par un laser, lors de l'interaction avec des particules en mouvement (mouvement brownien), est diffusée dans toutes les directions. Pour des objets sphériques, la diffusion est maximale pour un angle de 90° avec la lumière incidente. La lumière réémise par les objets subit une modification de sa fréquence en raison d'un effet Doppler, et est donc dépendante de la vitesse de diffusion des particules. La relation de Stokes-Einstein, relie le rayon hydrodynamique r_H des particules à leurs coefficients de diffusion D_T :

$$r_H = kT/3\pi\eta D_T$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue, et η la viscosité du milieu.

L'intensité diffusée est dépendante du nombre de particules diffusantes. Une distribution de la taille des particules peut être déterminée en appliquant un modèle statistique. Afin d'obtenir la distribution en taille des agrégats, le modèle Contin a été employé.

Les échantillons sont préparés à des concentrations supérieures à la CAC. La précision des mesures est de ± 5 nm.

D.5 Microscopie électronique par transmission

Pour déterminer la morphologie des agrégats formés spontanément nous avons utilisé dans un premier temps la microscopie électronique à transmission (MET).

Les solutions aqueuses d'objets préparées à des concentrations supérieures à la CAC dans l'eau ont été déposées sur une grille de cuivre (Formvar) recouverte d'un film de carbone. L'excès de solution est enlevé par capillarité (papier filtre) et le solvant est évaporé. La grille est ensuite déposée

dans une goutte de contrastant (phosphotungstate de sodium, 2% m/m neutralisé à pH = 7°, dont l'excès est également retiré par capillarité, puis la grille est laissée sécher à l'air libre. Les études ont été réalisées en utilisant un microscope de type JEOL 200 CX qui opère à 200 kV.

L'échantillon est soumis à un faisceau d'électrons et les zones de l'échantillon de haute densité moléculaire vont s'opposer au passage des électrons en raison d'une densité électronique plus importante et permettre ainsi l'apparition d'un effet de contraste. L'agent contrastant ajouté est un métal lourd qui a une bonne affinité pour les zones polaires, et qui renforce ainsi cet effet. Les observations ont été faites au moins deux fois.

D.6 Cryofracture

Les études de cryofracture ont été réalisées par C. Bololoi et Mme. Tiersche au Max Planck Institut à Golm (Allemagne).⁽¹¹⁾ Cette technique permet d'obtenir une réplique de la surface fracturée d'un échantillon cryofixé en évitant d'utiliser un agent de contraste. Pour cela, une petite goutte de solution de dendrimère à des concentrations supérieures à leur CAC est déposée sur un support très fin de cuivre qui est très rapidement plongé dans l'azote liquide à pression atmosphérique. Ensuite, l'échantillon congelé est introduit dans la table porte-échantillon, dans l'enceinte de l'appareil de cryofracture GATAN alto 2500 et fracturée à une température de -180°C, gravé pendant 60s et ombré avec du Pt-C, sous un vide élevé. La réplique, lavée et rincée, est observée dans un cryo-SEM JSM-6400.

E Spectrofluorimétrie

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre PTI (Photon Technology International) sous contrôle du logiciel FELIX qui permet le recueil des données. Des mesures préliminaires sur le tensioactif dérivé de sucre fluorescent nous ont permis de déterminer la longueur d'onde d'excitation et les conditions optimales de mesure. Les mesures de l'émission de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un détecteur à compteur de photons, avec un temps d'intégration de 1 s/nm et des bandes passantes d'émission et d'excitation de 5 nm. De plus, toutes les mesures sont réalisées à une température de 25 °C maintenue par un bloc thermostaté dans une cuve en quartz de 10x4 mm avec un trajet optique de 10 mm orienté dans la direction de la lumière incidente.

Les mesures de FRET ont été réalisées sur des solutions des espèces fluorescentes dans l'eau distillée (10^{-5} M). Pour la détermination des constantes de dissociation, les mesures ont été réalisées sur des solutions des mélanges dendrimère-sucres fluorescents dans le PBS 0,15 M et à une concentration fixe en tensioactif dérivé de sucre.

F Bibliographie

- (1) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*. Third Edition, Oxford, 1988, 391 p.
- (2) Launay, N.; Caminade, A. M.; Lahana, R.; Majoral, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1589.
- (3) Launay, N.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3282.
- (4) Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
- (5) Poupot, M.; Griffe, L.; Marchand, P.; Maraval, A.; Rolland, O.; Martinet, L.; L'Faqihi-Olive, F. E.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Fournie, J. J.; Majoral, J. P.; Poupot, R., *FASEB J.* **2006**, *20*, 2339.
- (6) Latge, P.; Rico, I.; Garelli, R.; Lattes, A., *J. Dispersion Sci. Tech.* **1991**, *12*, 227.
- (7) Garelli-Calvet, R.; Latge, P.; Rico, I.; Lattes, A.; Puget, A., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1992**, *1109*, 55.
- (8) Spataro, G. *Elaboration de dendrimères phosphorés : applications en biologie*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2007**.
- (9) Bololoi, C. *Nouveaux amphiphiles catanioniques analogues du galactosylceramide: corrélation structure, propriétés physico-chimiques et activité anti-VIH*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2008**.
- (10) Rolland, O. *Architectures dendritiques multifonctionnelles: De nouveaux outils pour la nanomédecine*. Université Paul Sabatier, Toulouse, **2007**.
- (11) Navarro, S.; Shkilnyy, A.; Tiersch, B.; Taubert, A.; Menzel, H., *Langmuir* **2009**, *25*, 10558.

Annexes

Sommaire

Liste des produits synthétisés.....	9-A
Liste de Spectres de RMN.....	17-A
<i>Composé 1a-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	19-A
<i>Composé 1a-G1</i> RMN ^1H	19-A
<i>Composé 1a-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	20-A
<i>Composé 1a-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -DEPT.....	20-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	21-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN ^1H	21-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	22-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	22-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN ^1H - $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ HMQC.....	23-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN ^1H - $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ HMQC.....	23-A
<i>Composé 1b-G1</i> RMN ^1H - ^1H COSY.....	24-A
<i>Composé 1c-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	24-A
<i>Composé 1c-G1</i> RMN ^1H	25-A
<i>Composé 1c-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	25-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	26-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN ^1H	26-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	27-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	27-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	28-A
<i>Composé 1d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	28-A
<i>Composé 2d-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	29-A
<i>Composé 2d-G1</i> RMN ^1H	29-A
<i>Composé 2d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	30-A
<i>Composé 2d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	30-A
<i>Composé 2d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	31-A
<i>Composé 6</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	31-A
<i>Composé 6</i> RMN ^1H	32-A
<i>Composé 6</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	32-A

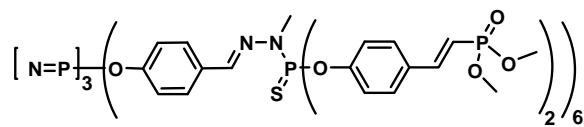
Composé 3a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	33-A
Composé 3a RMN ^1H	33-A
Composé 3a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	34-A
Composé 3a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	34-A
Composé 3a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	35-A
Composé 3a-G1 RMN ^1H	35-A
Composé 3a-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	36-A
Composé 3a-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	36-A
Composé 3b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	37-A
Composé 3b-G1 RMN ^1H	37-A
Composé 3b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	38-A
Composé 3c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	38-A
Composé 3c-G1 RMN ^1H	39-A
Composé 3c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	39-A
Composé 3d-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	40-A
Composé 3d-G1 RMN ^1H	40-A
Composé 3d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	41-A
Composé 3d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	41-A
Composé 3d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	42-A
Composé 9 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	42-A
Composé 9 RMN ^1H	43-A
Composé 9 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	43-A
Composé 7 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	44-A
Composé 7 RMN ^1H	44-A
Composé 7 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	45-A
Composé 4a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	45-A
Composé 4a RMN ^1H	46-A
Composé 4a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	46-A
Composé 4a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	47-A
Composé 4a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	47-A
Composé 4a-G1 RMN ^1H	48-A
Composé 4a-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	48-A
Composé 4a-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	49-A
Composé 4b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	49-A

Composé 4b-G1 RMN ^1H	50-A
Composé 4b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	50-A
Composé 4c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	51-A
Composé 4c-G1 RMN ^1H	51-A
Composé 4c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	52-A
Composé 4d-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	52-A
Composé 4d-G1 ^1H NMR.....	53-A
Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	53-A
Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	54-A
Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	54-A
Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	55-A
Composé 10 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	55-A
Composé 10 RMN ^1H	56-A
Composé 10 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	56-A
Composé 10 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	57-A
Composé 8 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	57-A
Composé 8 RMN ^1H	58-A
Composé 8 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	58-A
Composé 5a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	59-A
Composé 5a RMN ^1H	59-A
Composé 5a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	60-A
Composé 5a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	60-A
Composé 5a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	61-A
Composé 5a-G1 RMN ^1H	61-A
Composé 5a-G1 RMN ^1H	62-A
Composé 5a-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	62-A
Composé 5b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	63-A
Composé 5b-G1 RMN ^1H	63-A
Composé 5b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	64-A
Composé 5b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT.....	64-A
Composé 5c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	65-A
Composé 5c-G1 RMN ^1H	65-A
Composé 5c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	66-A
Composé 5c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	66-A

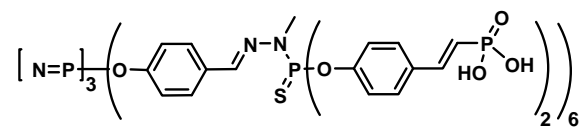
<i>Composé 5d-G1</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	67-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN ^1H	67-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN ^1H	68-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN ^1H	68-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN ^1H	69-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	69-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	70-A
<i>Composé 5d-G1</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	70-A
<i>Composé 13</i> RMN ^1H	71-A
<i>Composé 13</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	71-A
<i>Composé 17</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	72-A
<i>Composé 17</i> RMN ^1H	72-A
<i>Composé 17</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	73-A
<i>Composé 17</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	73-A
<i>Composé 15</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	74-A
<i>Composé 15</i> RMN ^1H	74-A
<i>Composé 15</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	75-A
<i>Composé 15</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD.....	75-A
<i>Composé 14</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	76-A
<i>Composé 14</i> RMN ^1H	76-A
<i>Composé 14</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	77-A
<i>Composé 14</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	77-A
<i>Composé 11-Df</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	78-A
<i>Composé 11-Df</i> RMN ^1H	78-A
<i>Composé 11-Df</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	79-A
<i>Composé 11-Df</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	79-A
<i>Composé 25-Df(Na)₁₀</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	80-A
<i>Composé 25-Df(Na)₁₀</i> RMN ^1H	80-A
<i>Composé 25-Df(Na)₁₀</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	81-A
<i>Composé 26-Df(L16)₁₀</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	81-A
<i>Composé 26-Df(L16)₁₀</i> RMN ^1H	82-A
<i>Composé 26-Df(L16)₁₀</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	82-A
<i>Composé 27-Df(L8)(L16)₉</i> RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	83-A
<i>Composé 27-Df(L8)(L16)₉</i> RMN ^1H	83-A

<i>Composé 27-Df(L8)(L16)</i> , RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	84-A
<i>Composé 22</i> RMN ^1H	84-A
<i>Composé 23</i> RMN ^1H	85-A
<i>Composé 23</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	85-A
<i>Composé 23</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD.....	86-A
<i>Composé 23</i> RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSQC.....	86-A
<i>Composé 23</i> RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC.....	87-A
<i>Composé 23</i> RMN ^1H - ^1H COSY.....	87-A
<i>Composé 24</i> RMN ^1H	88-A
<i>Composé 18-Lf</i> RMN ^1H	88-A
<i>Composé 18-Lf</i> RMN ^1H	89-A
<i>Composé 18-Lf</i> RMN ^1H	89-A
<i>Composé 18-Lf</i> RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	90-A
<i>Composé 28-Df(Lf)(L16)</i> , RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	90-A
<i>Composé 28-Df(Lf)(L16)</i> , RMN ^1H	91-A
<i>Composé 28-Df(Lf)(L16)</i> , RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	91-A
Liste de publications.....	93-A

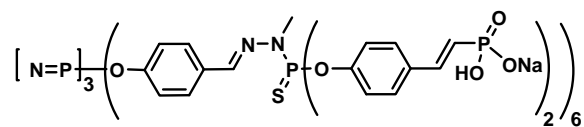
Liste des produits synthétisés



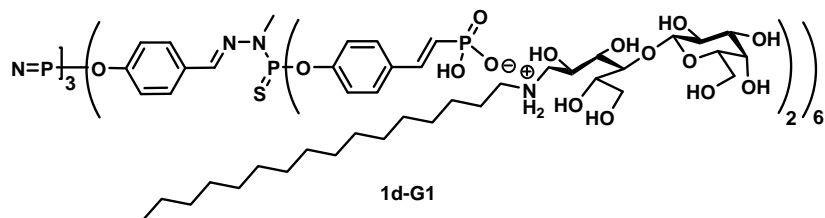
1a-G1



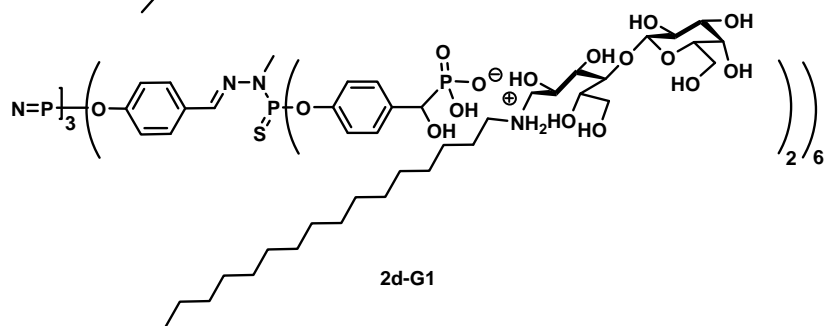
1b-G1



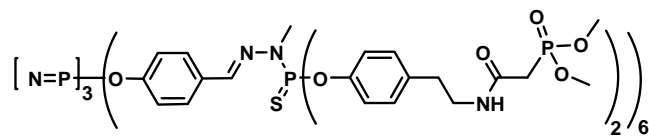
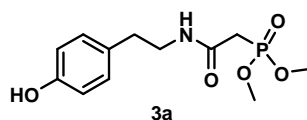
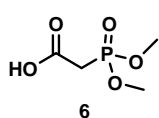
1c-G1



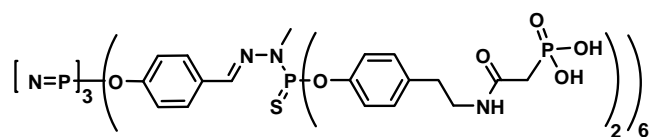
1d-G1



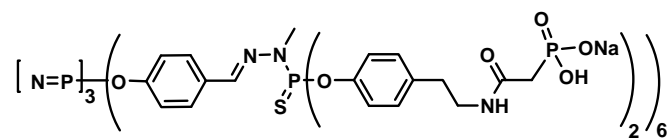
2d-G1



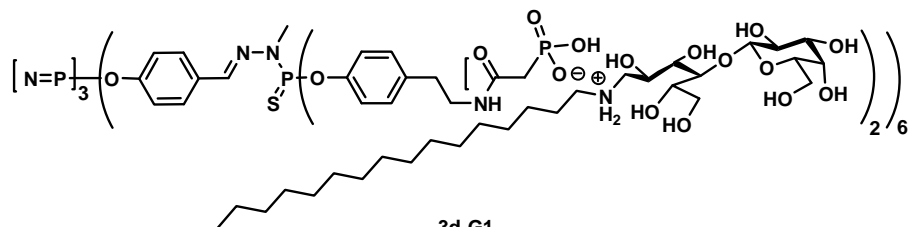
3a-G1



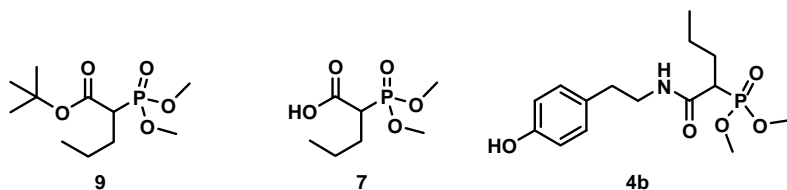
3b-G1



3c-G1



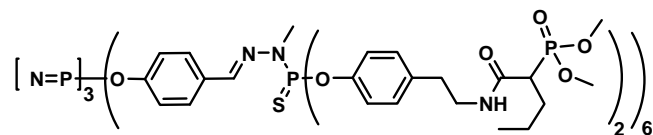
3d-G1



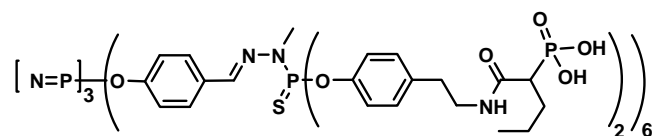
9

7

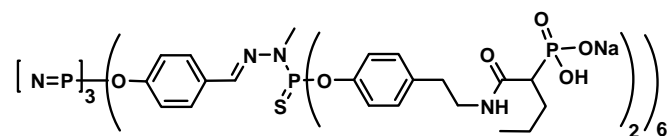
4b



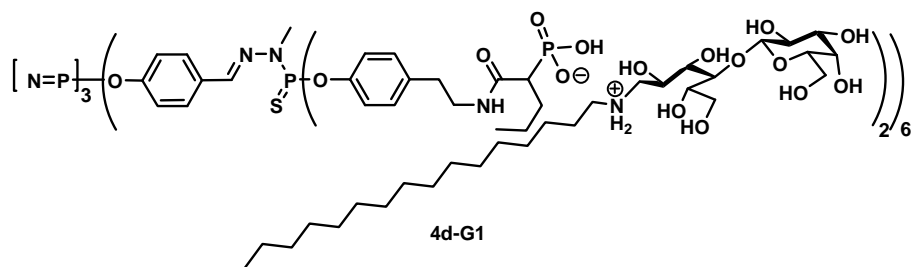
4a-G1



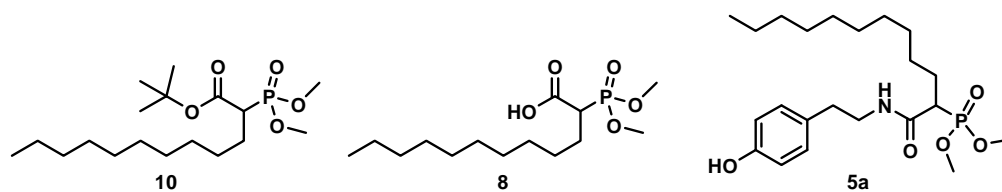
4b-G1



4c-G1



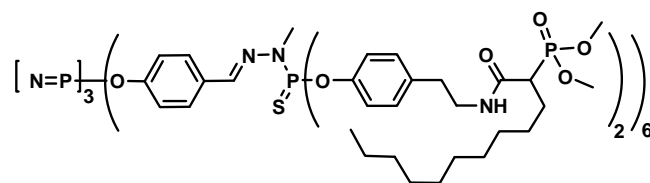
4d-G1



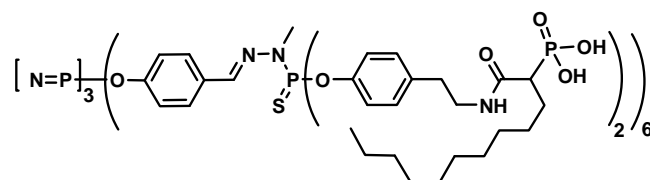
10

8

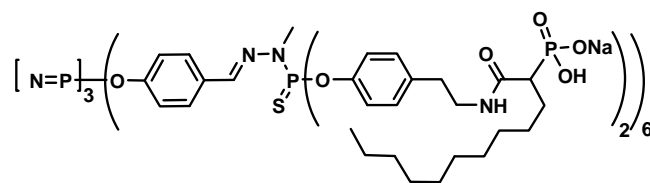
5a



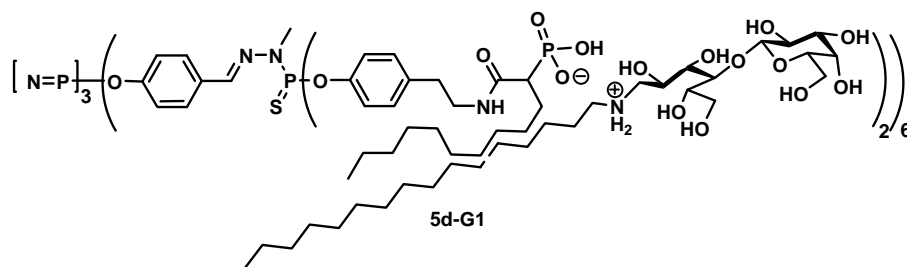
5a-G1



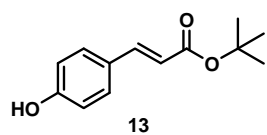
5b-G1



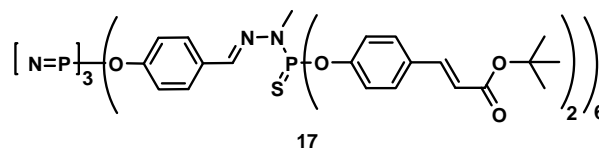
5c-G1



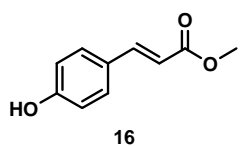
5d-G1



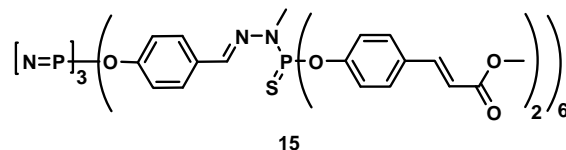
13



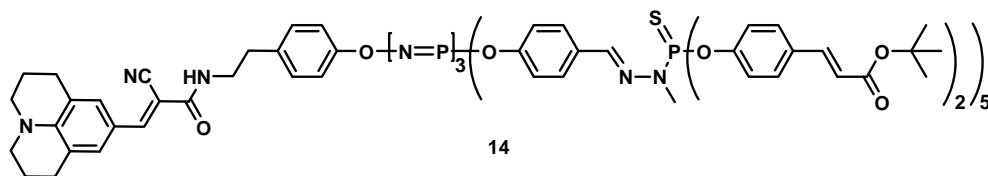
17



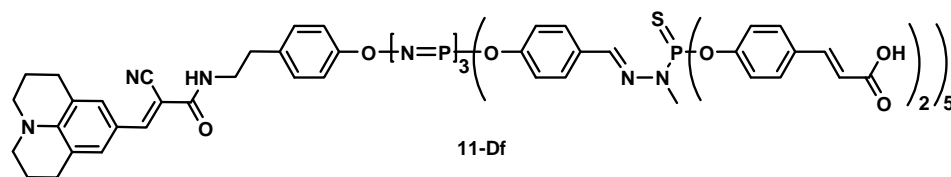
16



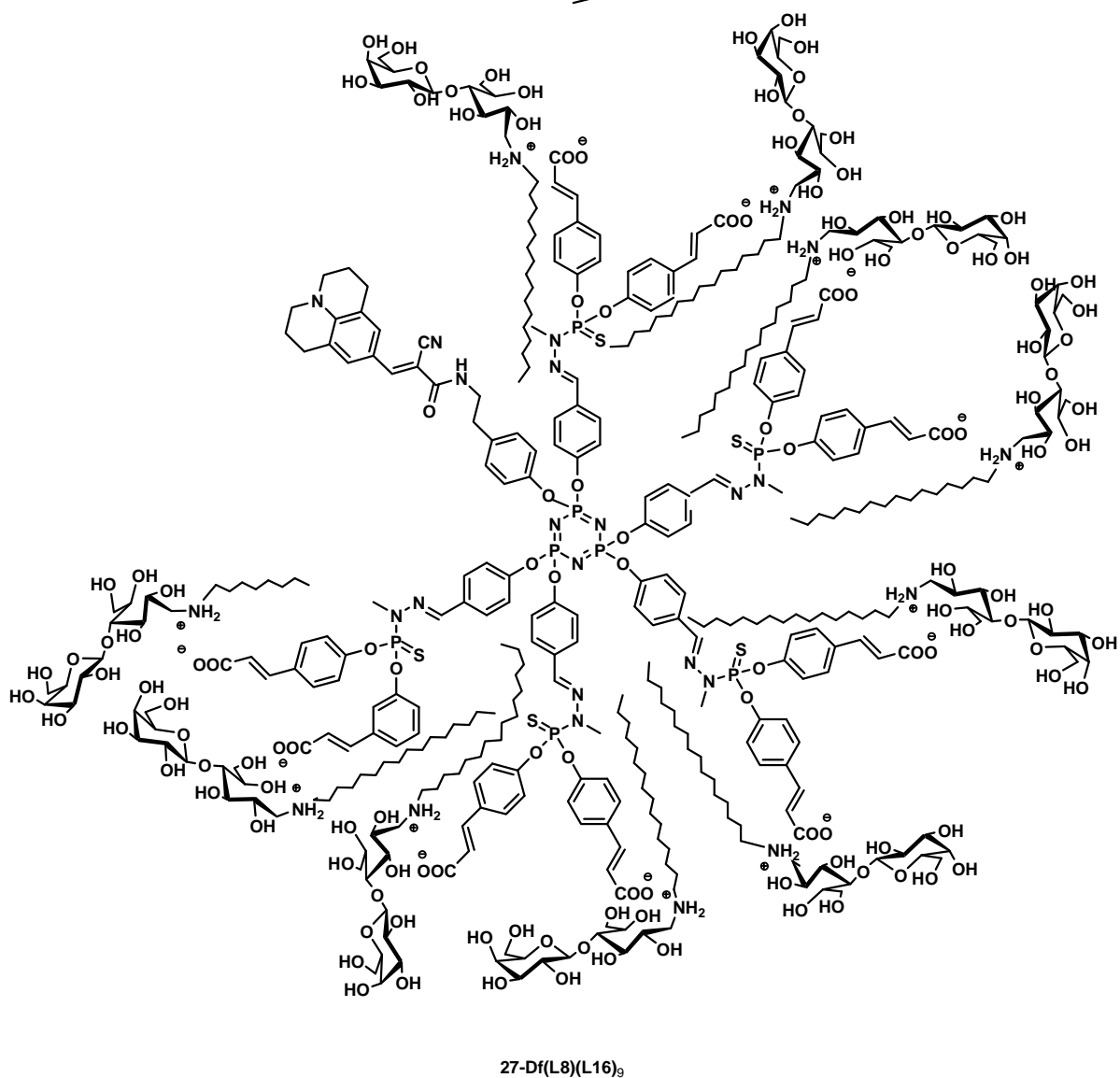
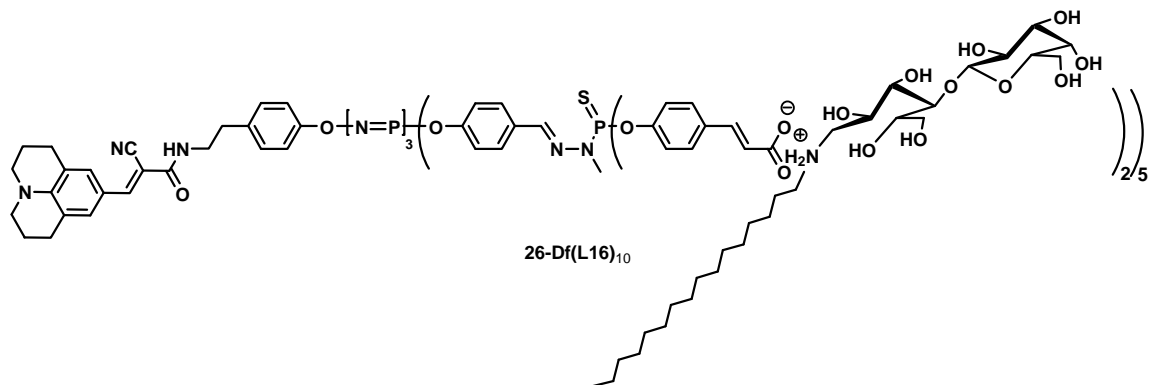
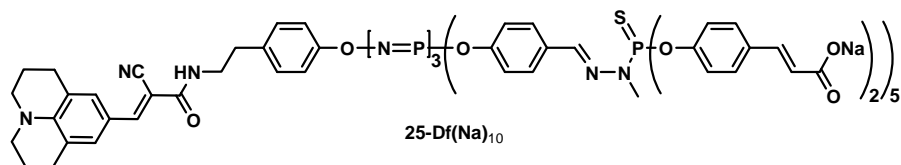
15

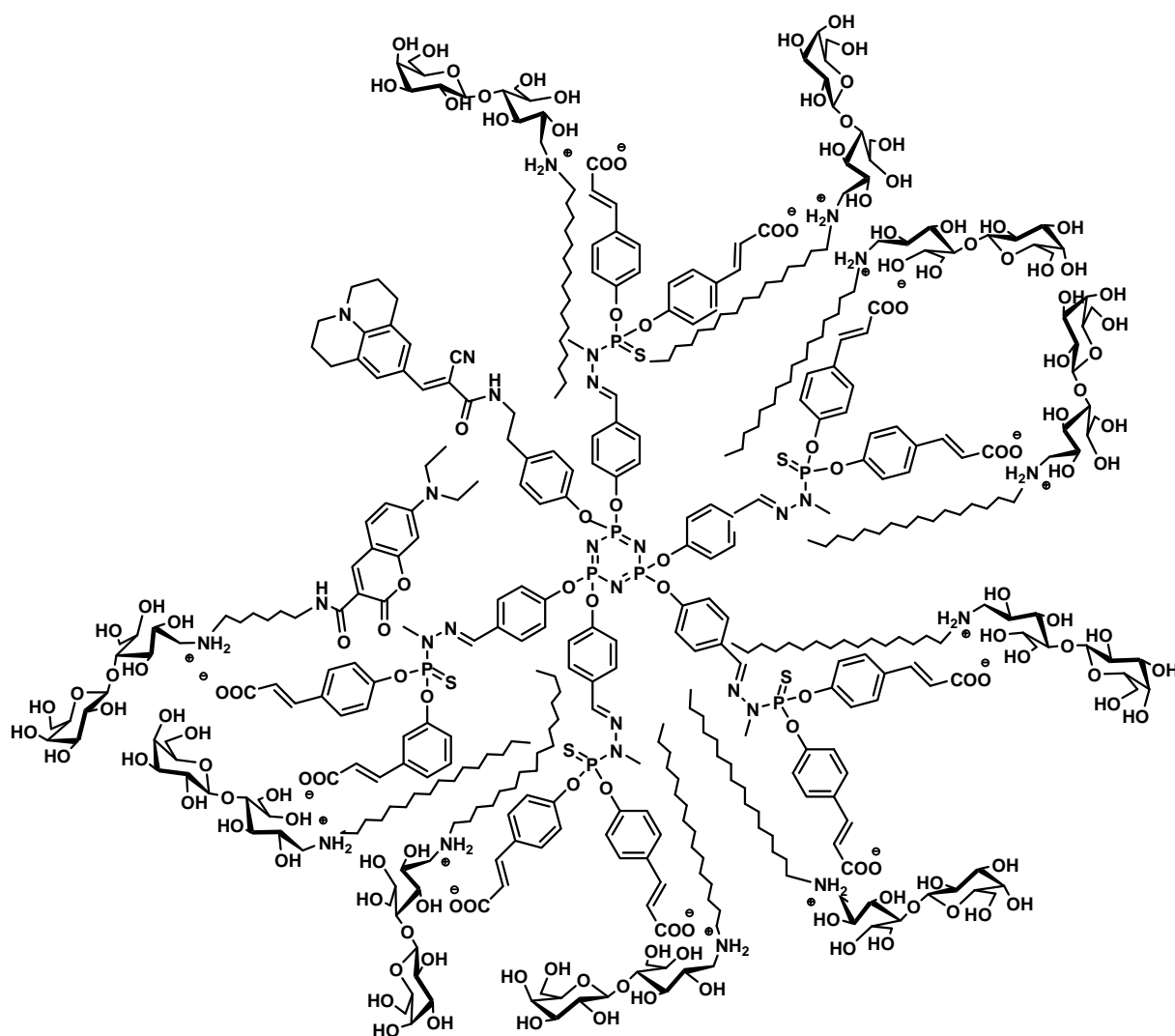
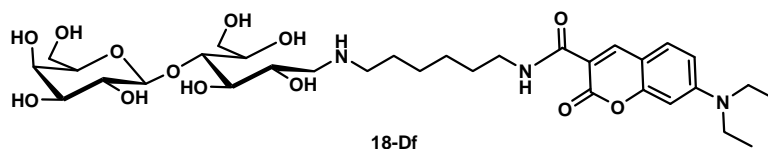
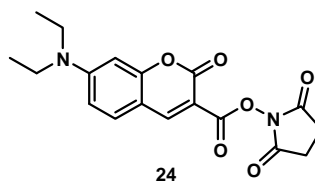
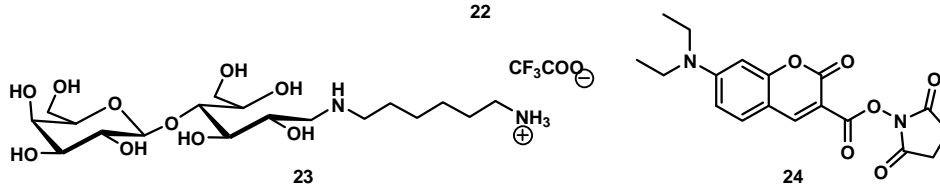
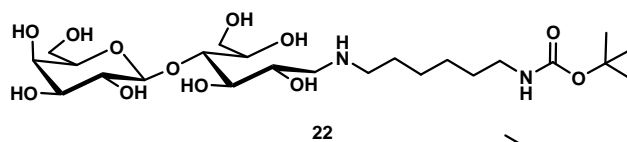


14



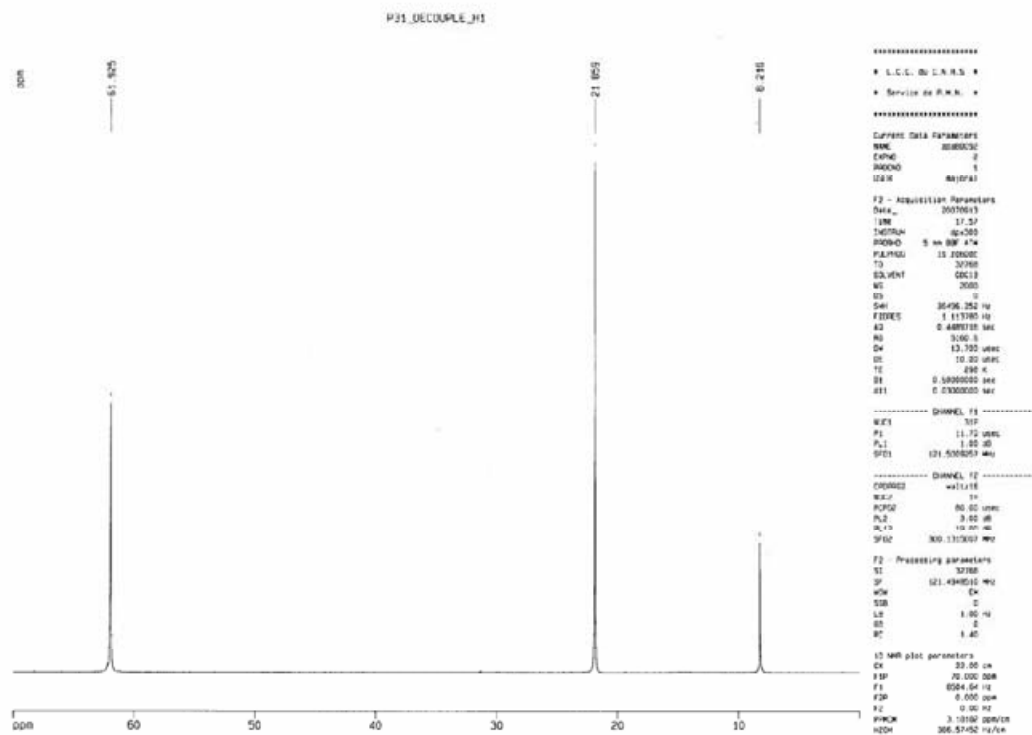
11-Df



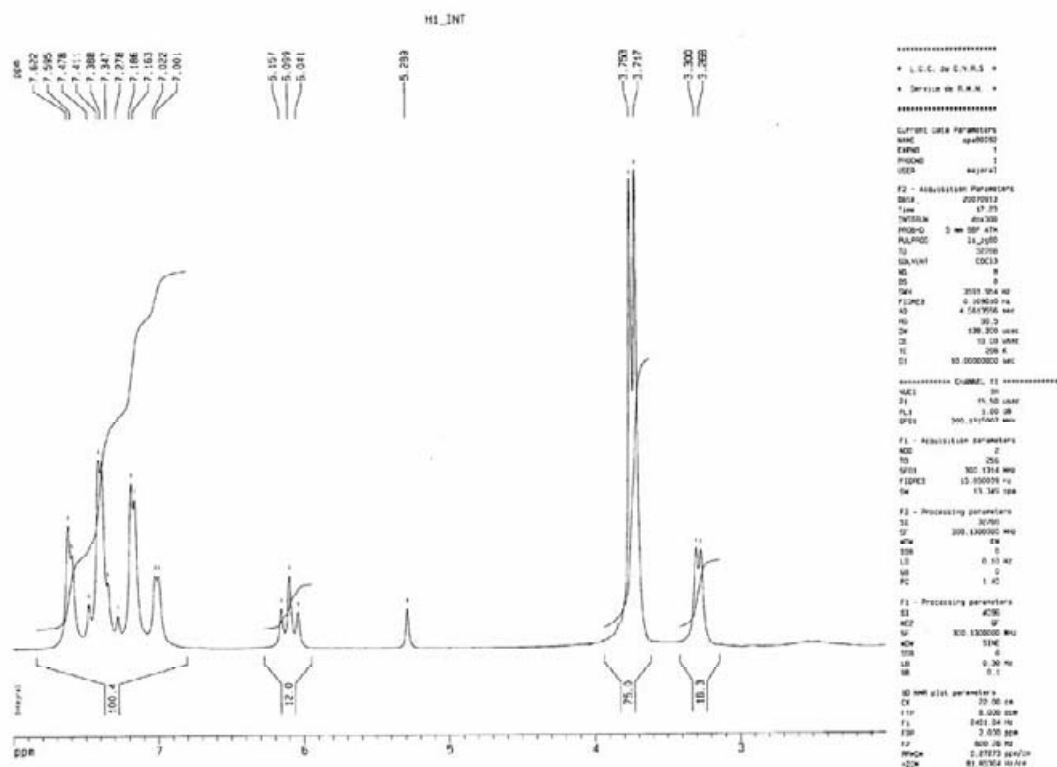


Liste de Spectres de RMN

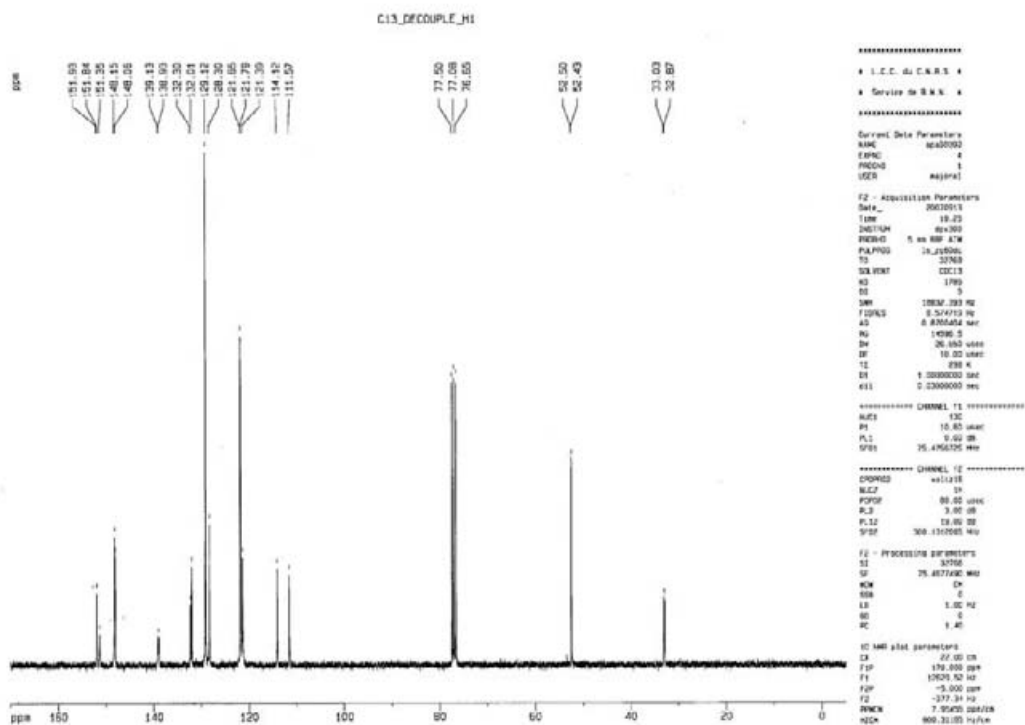
Composé 1a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



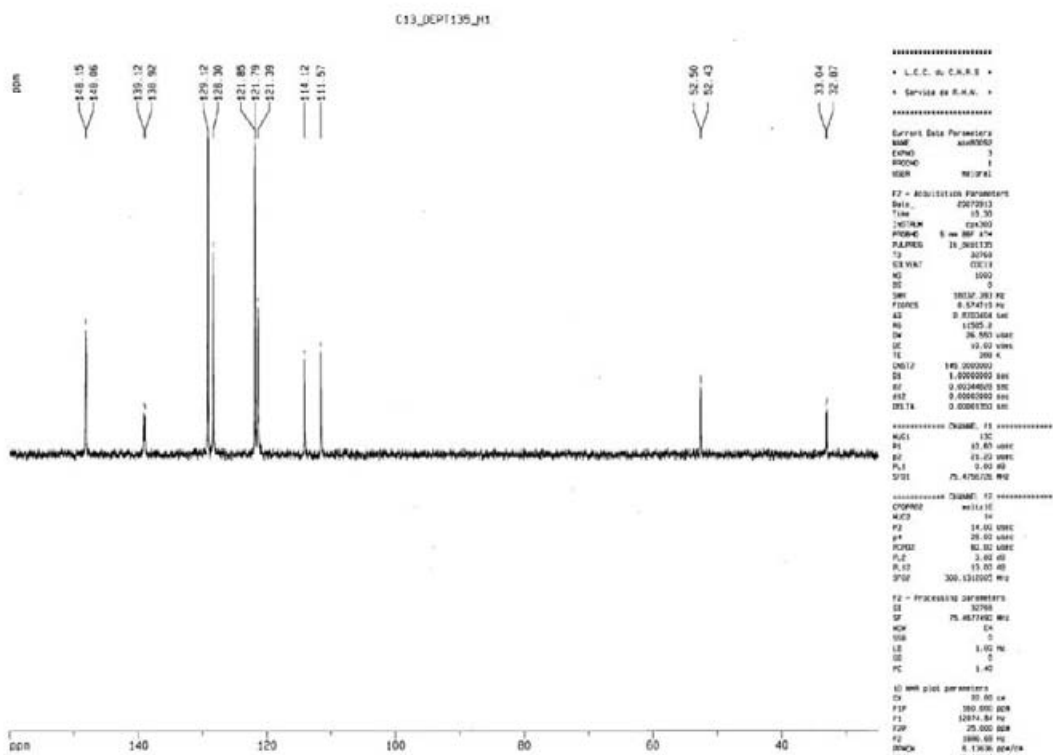
Composé 1a-G1 RMN ^1H

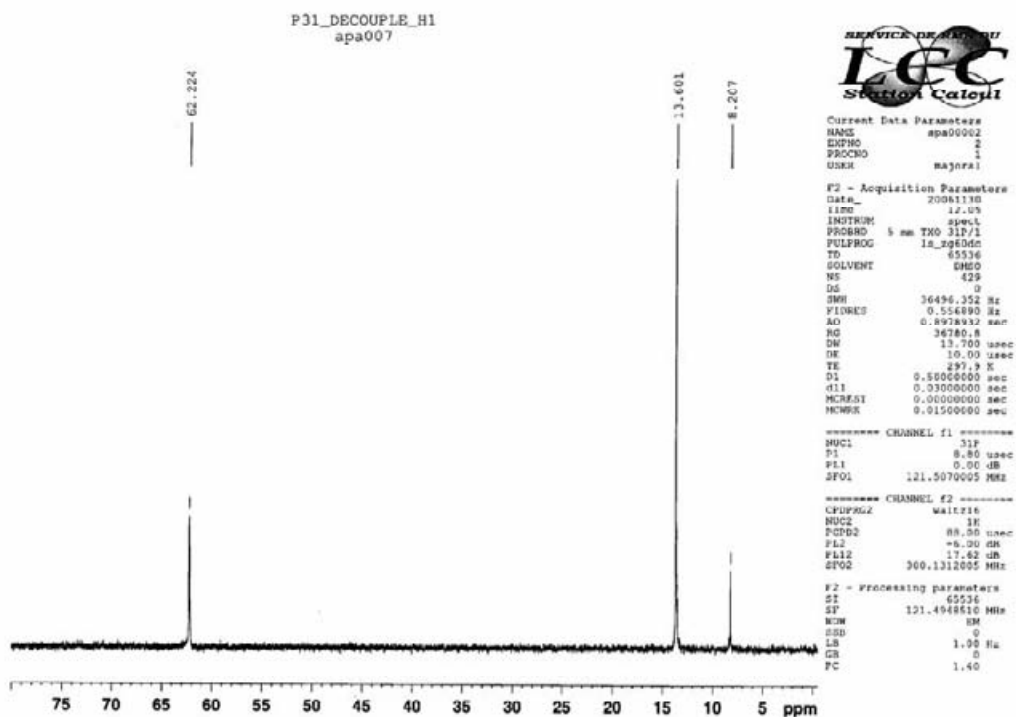
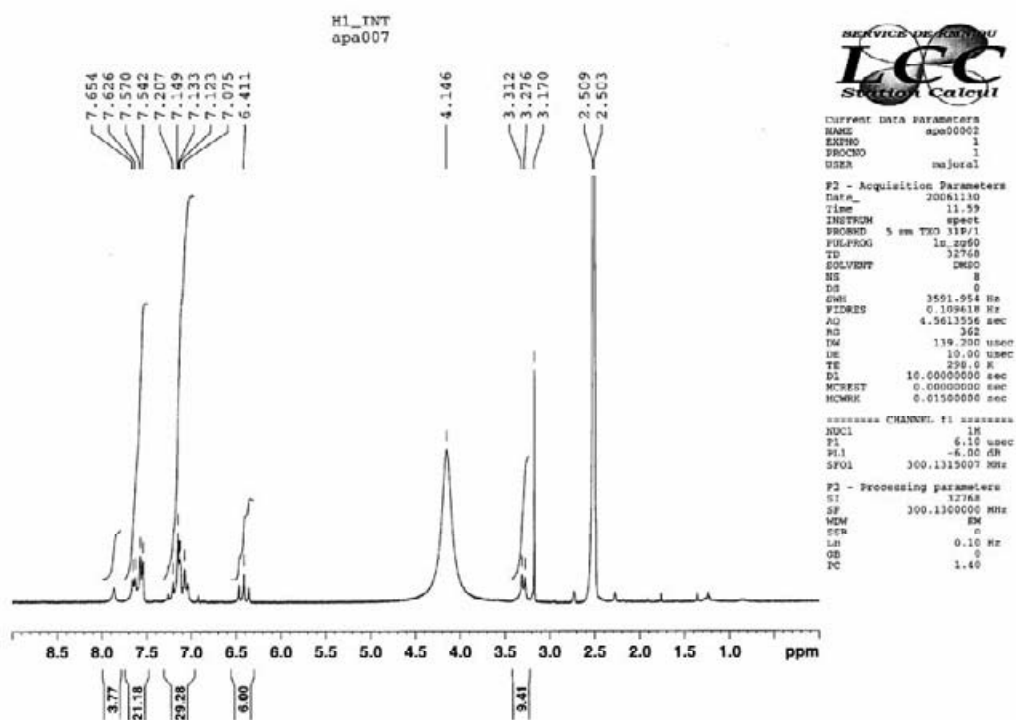


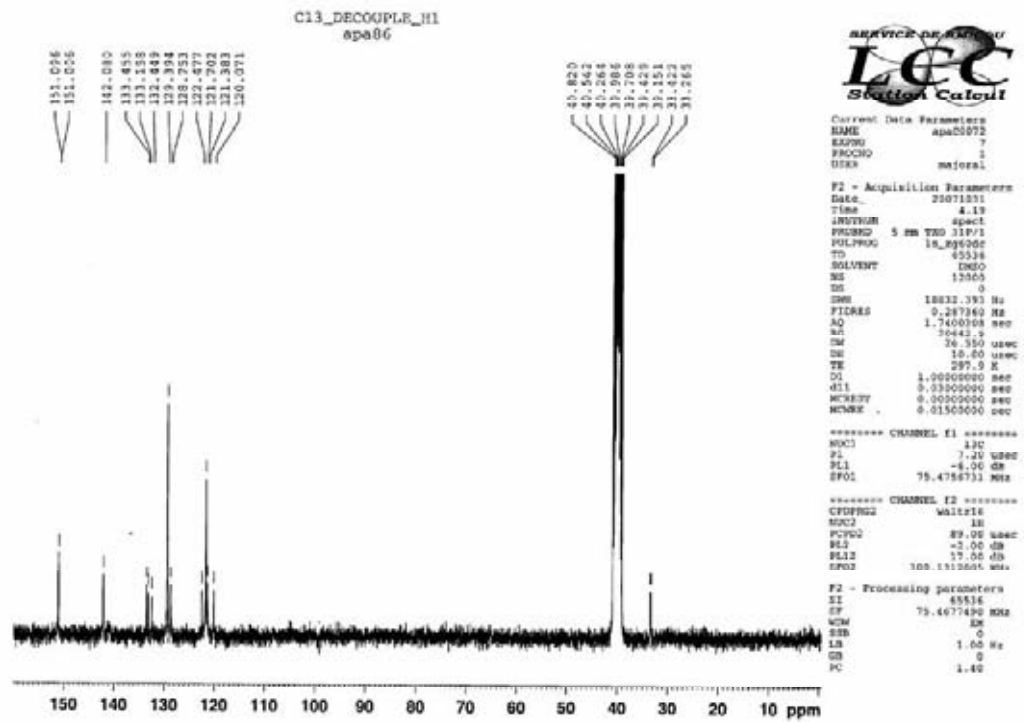
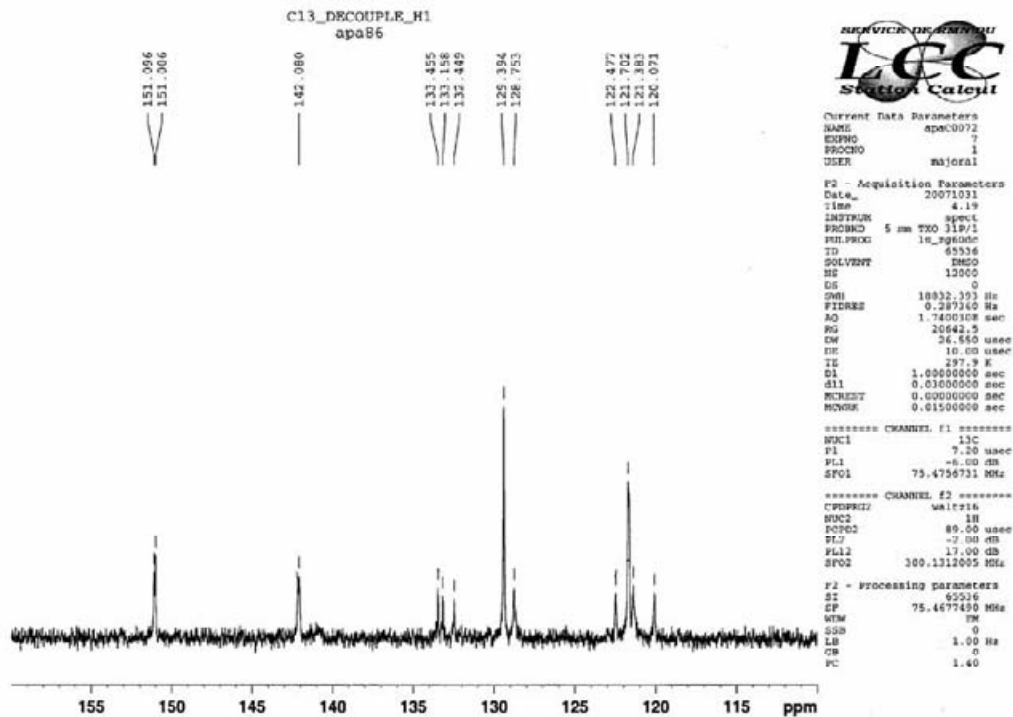
Composé 1a-G1 RMN ¹³C{¹H}



Composé 1a-G1 RMN ¹³C{¹H}-DEPT

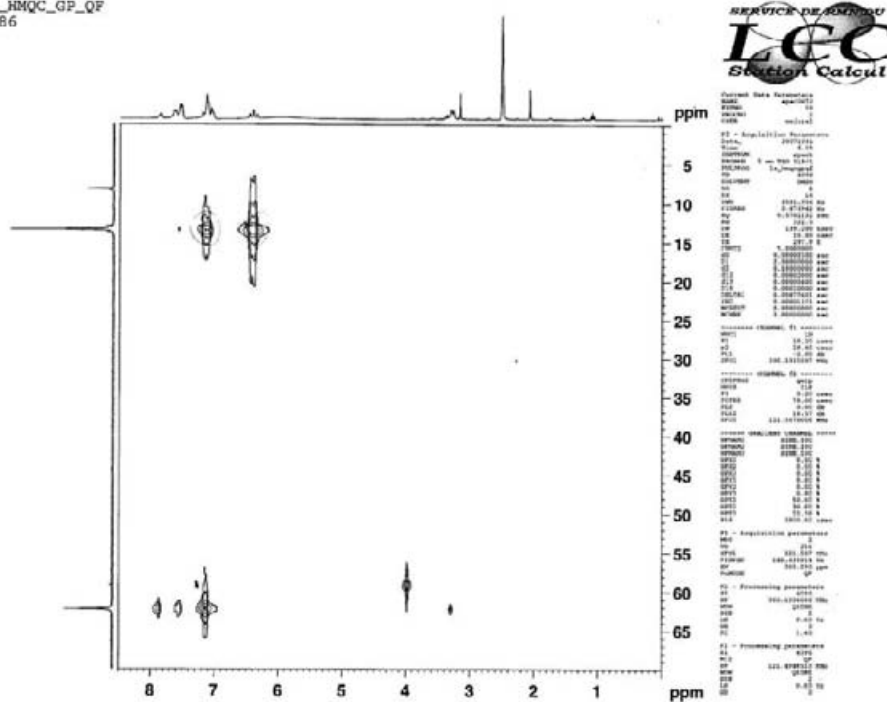


Composé 1b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Composé 1b-G1 RMN ^1H 

Composé 1b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Composé 1b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

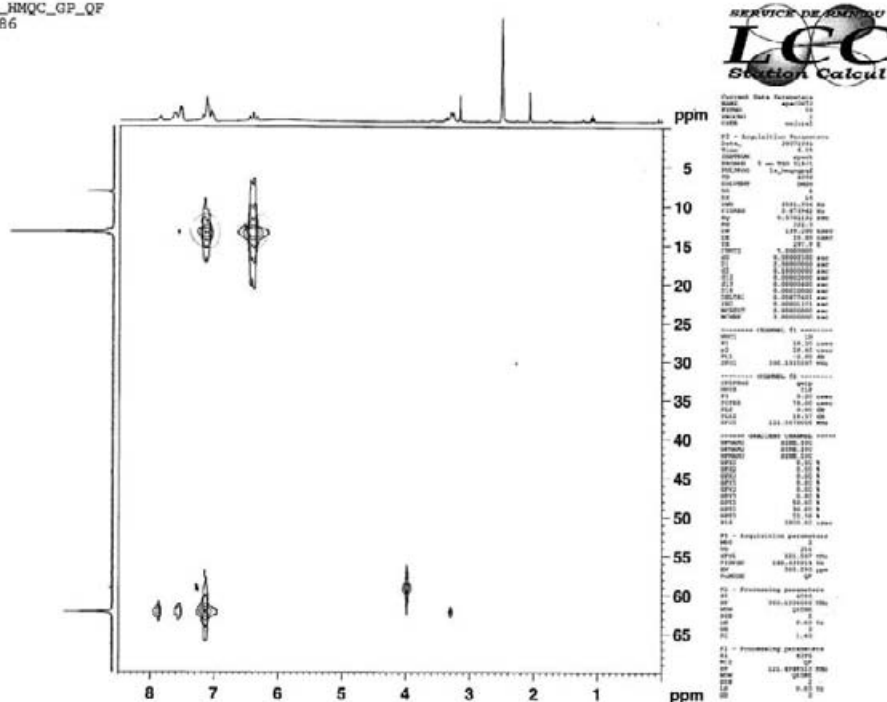
Composé 1b-G1 RMN ¹H-³¹P{¹H} HMQC

F31_HMQC_GP_QF
apa86

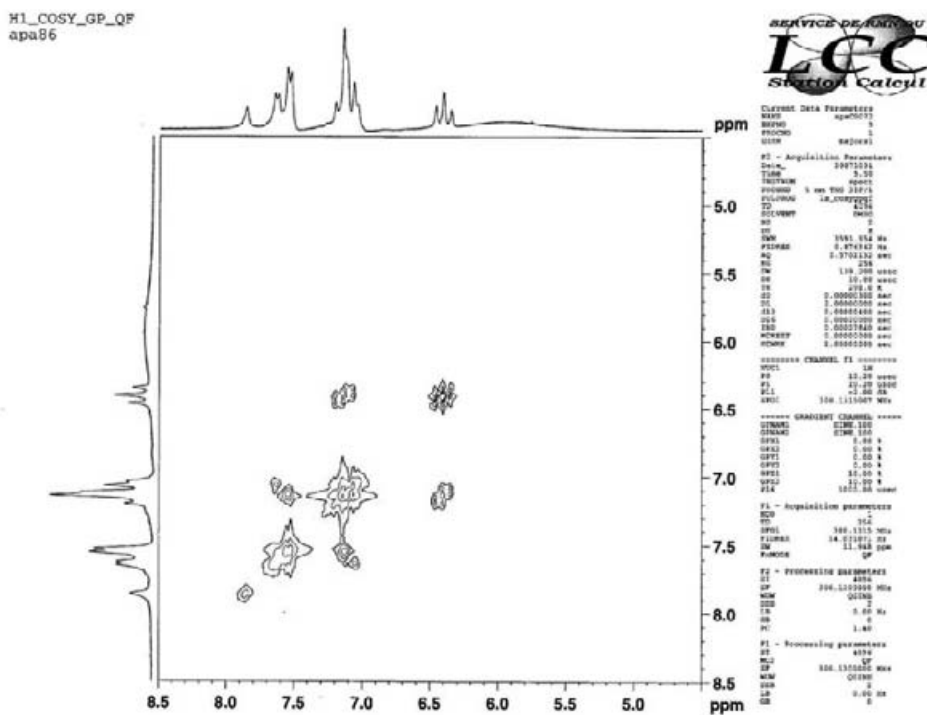


Composé 1b-G1 RMN ¹H-³¹P{¹H} HMQC

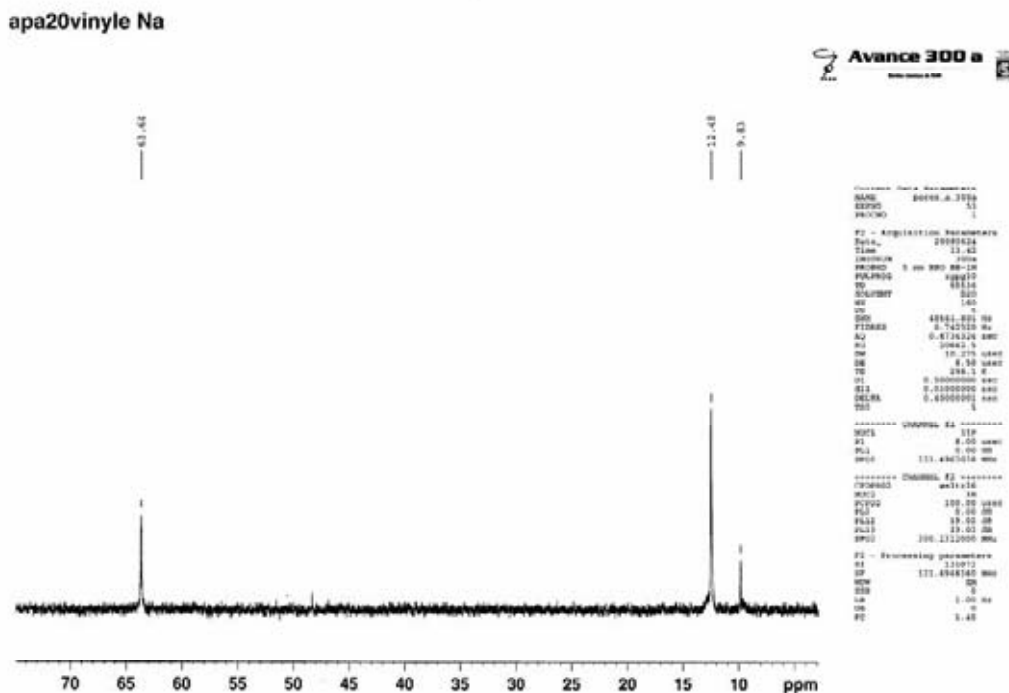
F31_HMQC_GP_QF
apa86

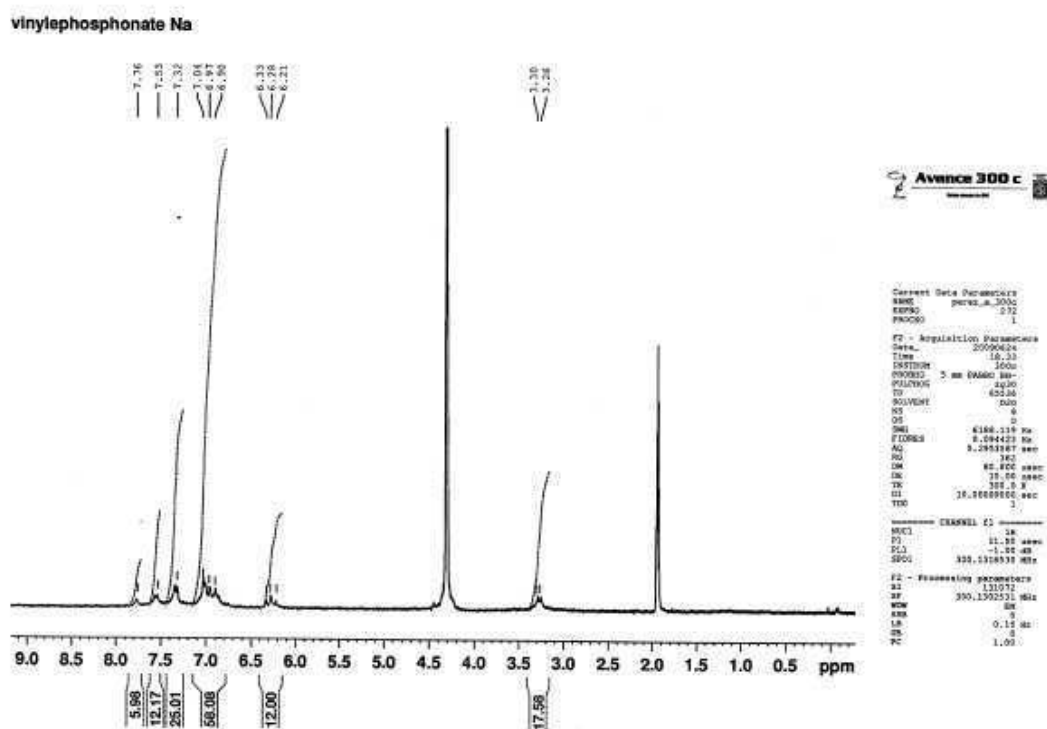
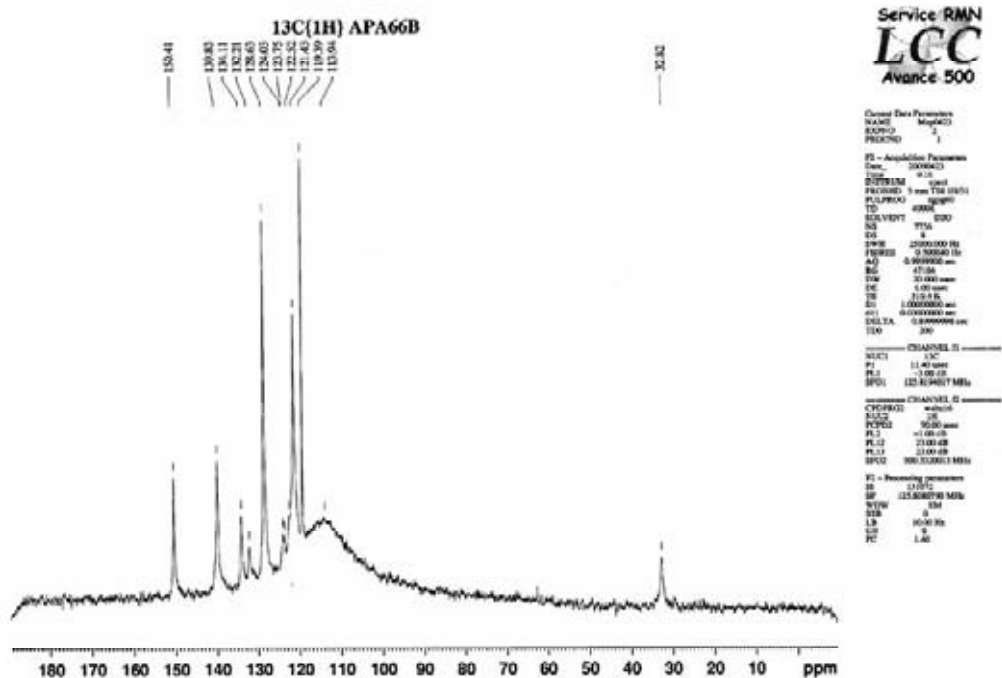


Composé 1b-G1 RMN ^1H - ^1H COSY

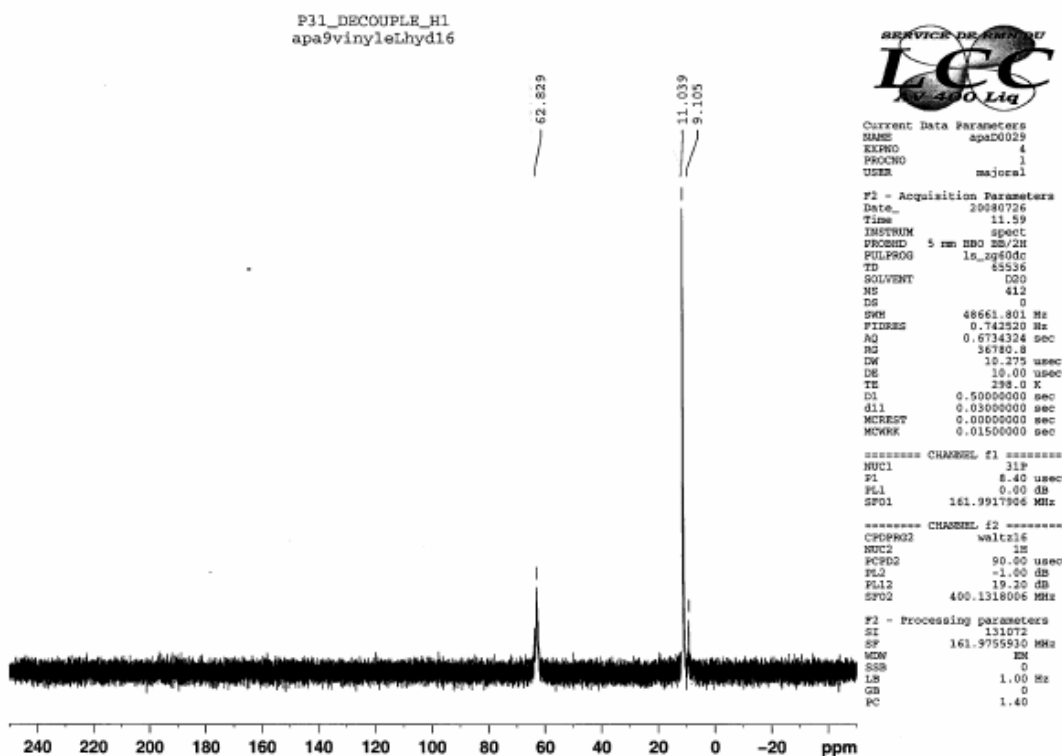


Composé 1c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

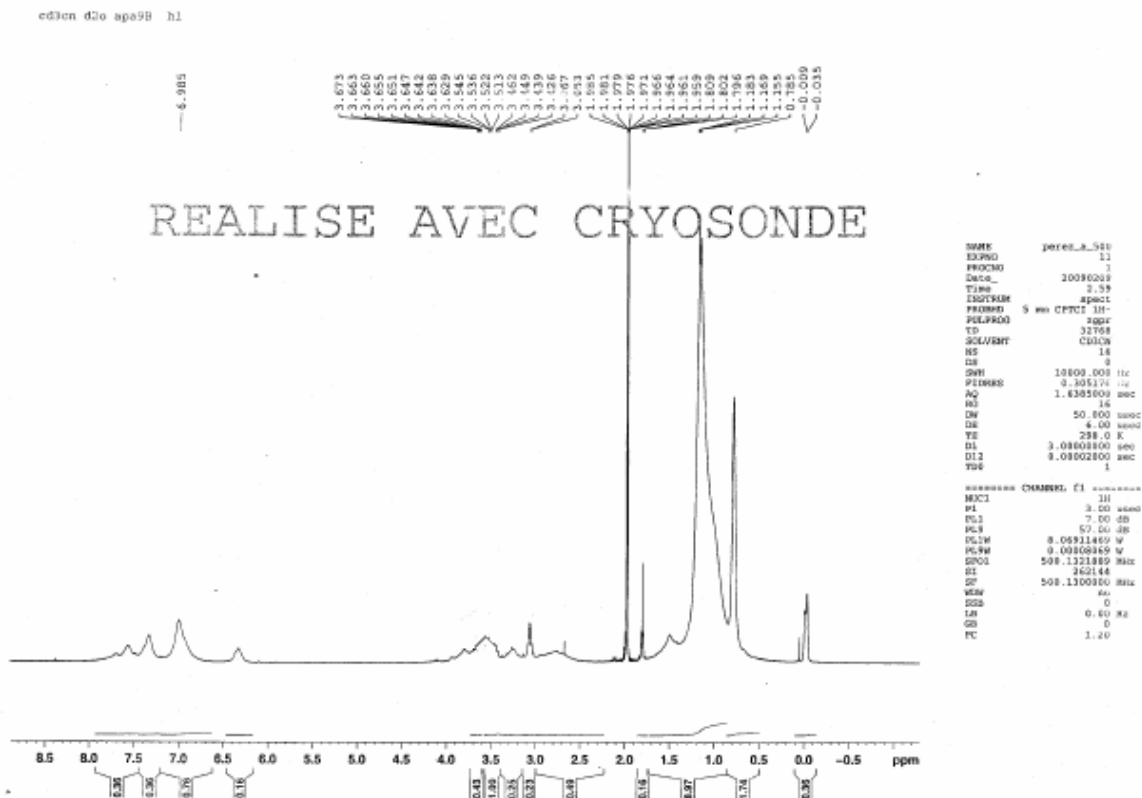


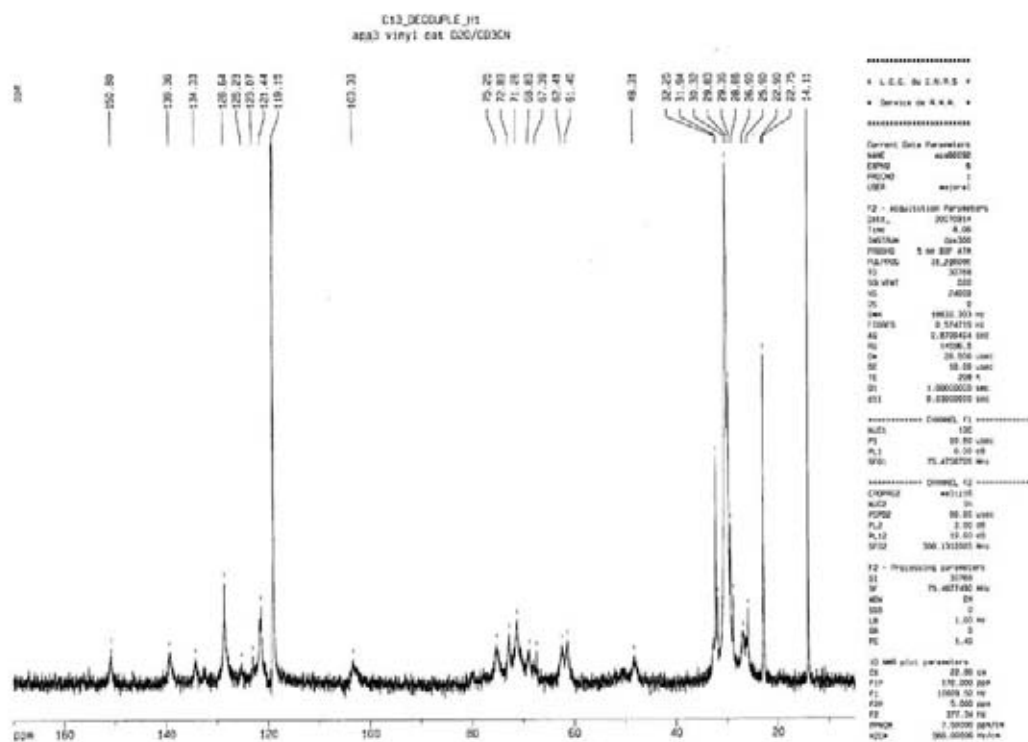
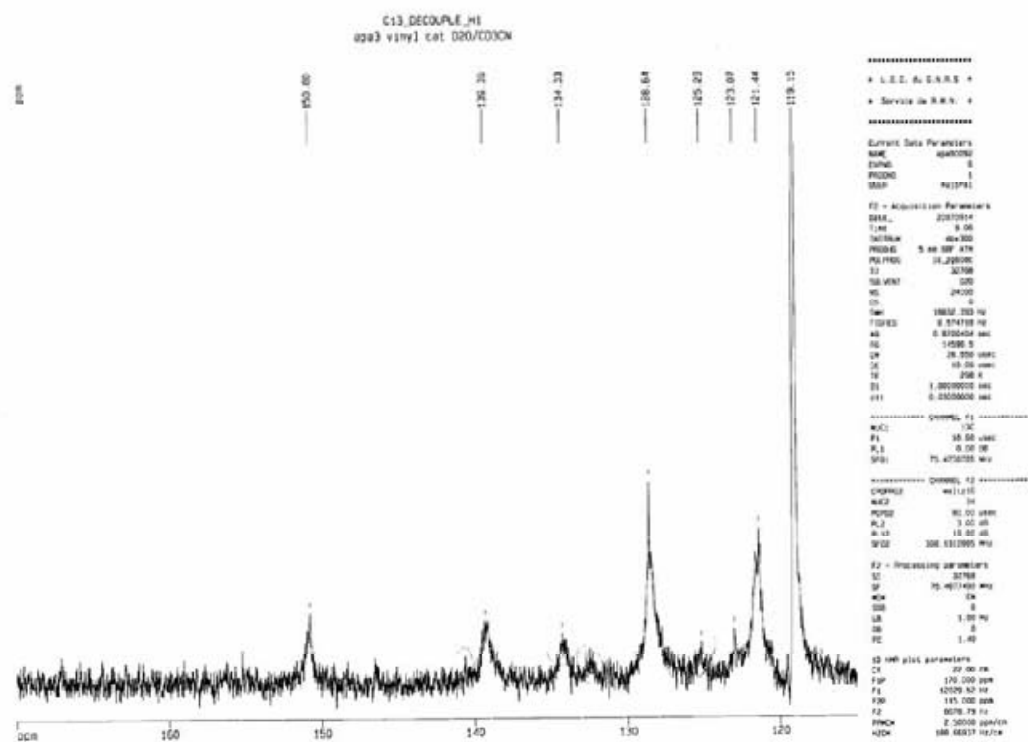
Composé 1c-G1 RMN ^1H Composé 1c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

Composé 1d-G1 RMN ³¹P{¹H}

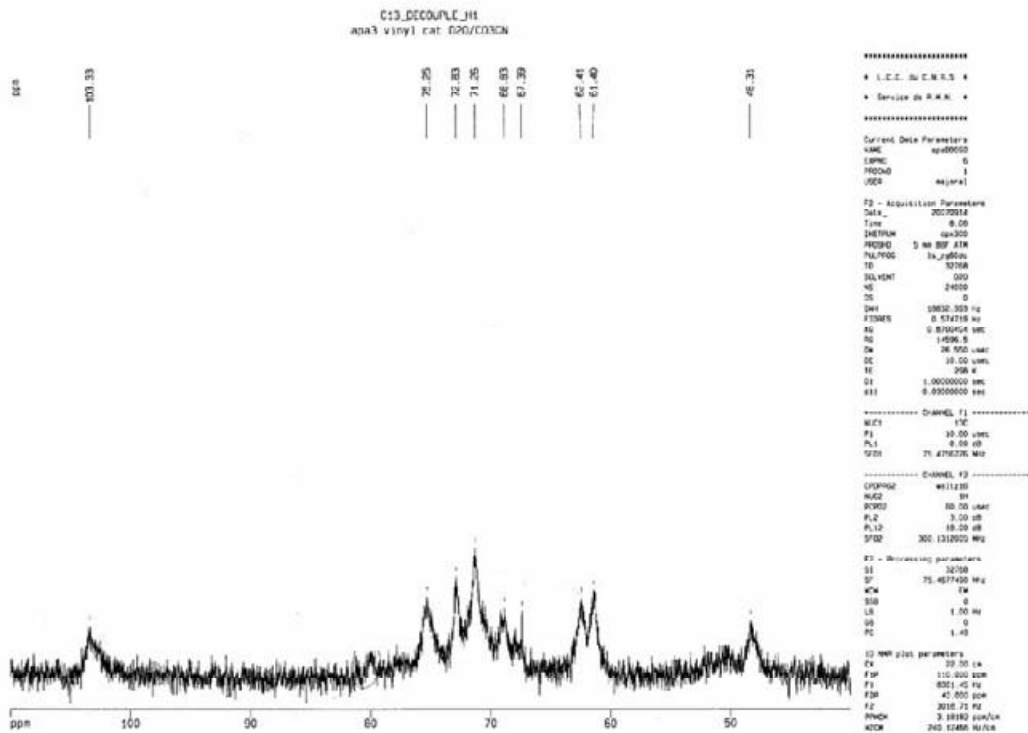


Composé 1d-G1 RMN ¹H

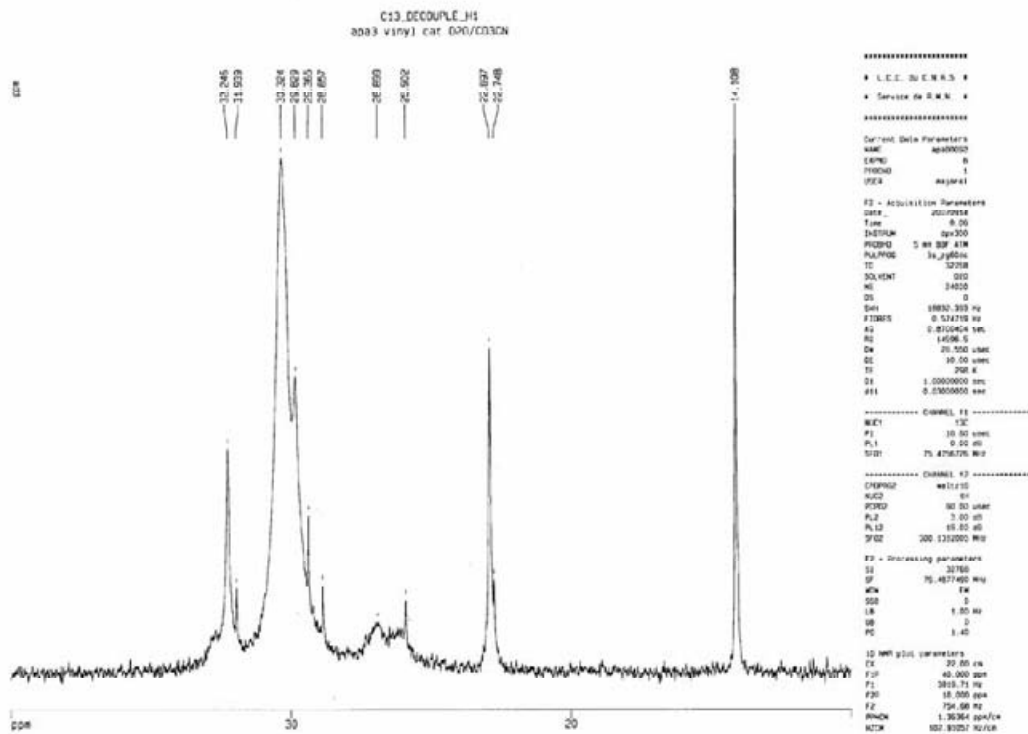


Composé 1d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Composé 1d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

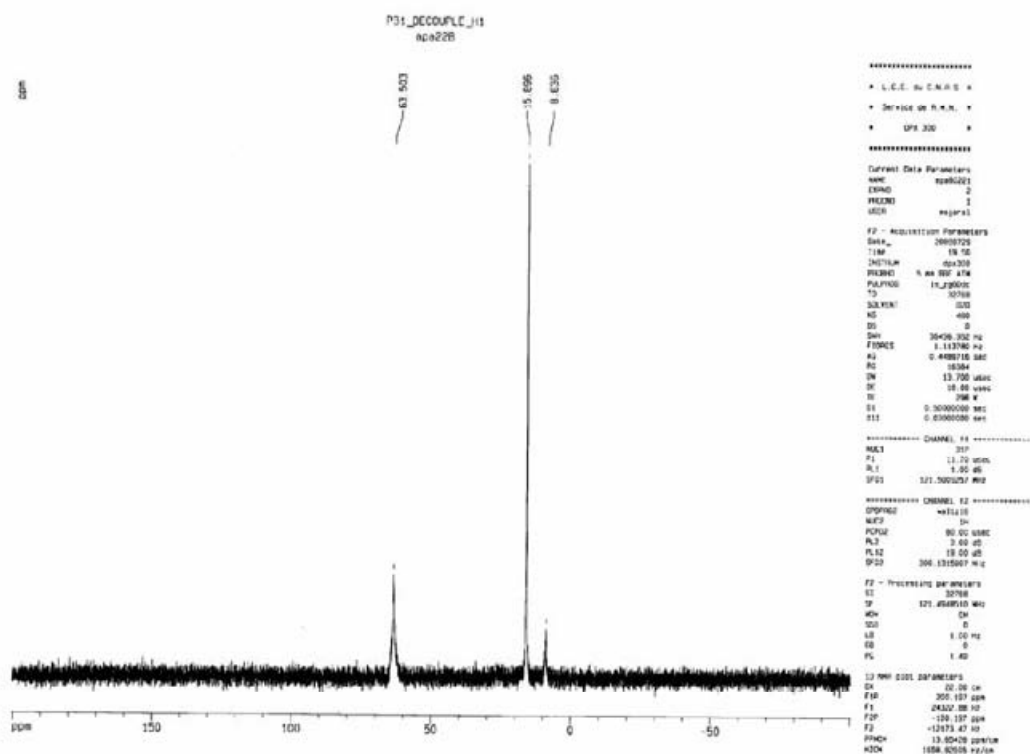
Composé 1d-G1 RMN ¹³C{¹H}



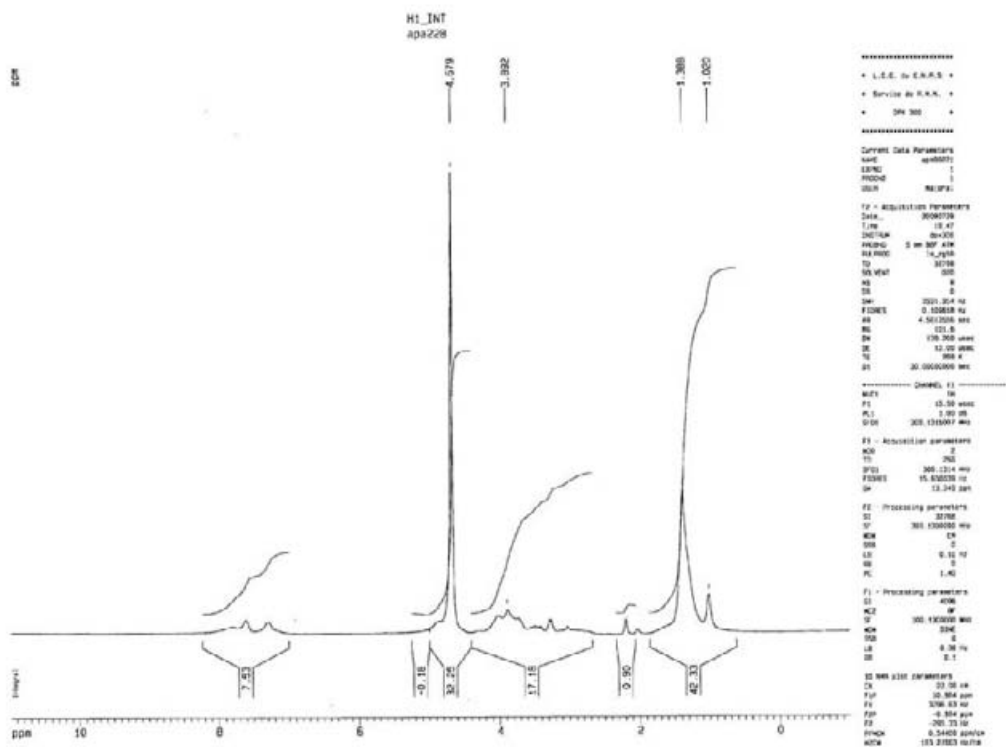
Composé 1d-G1 RMN ¹³C{¹H}



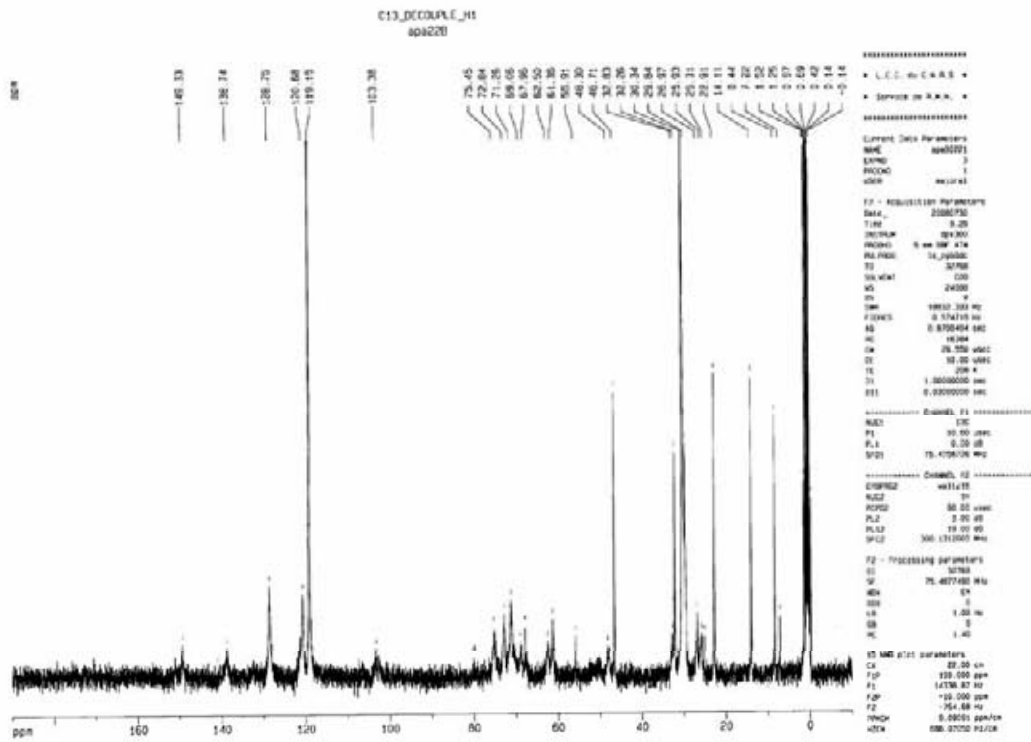
Composé 2d-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



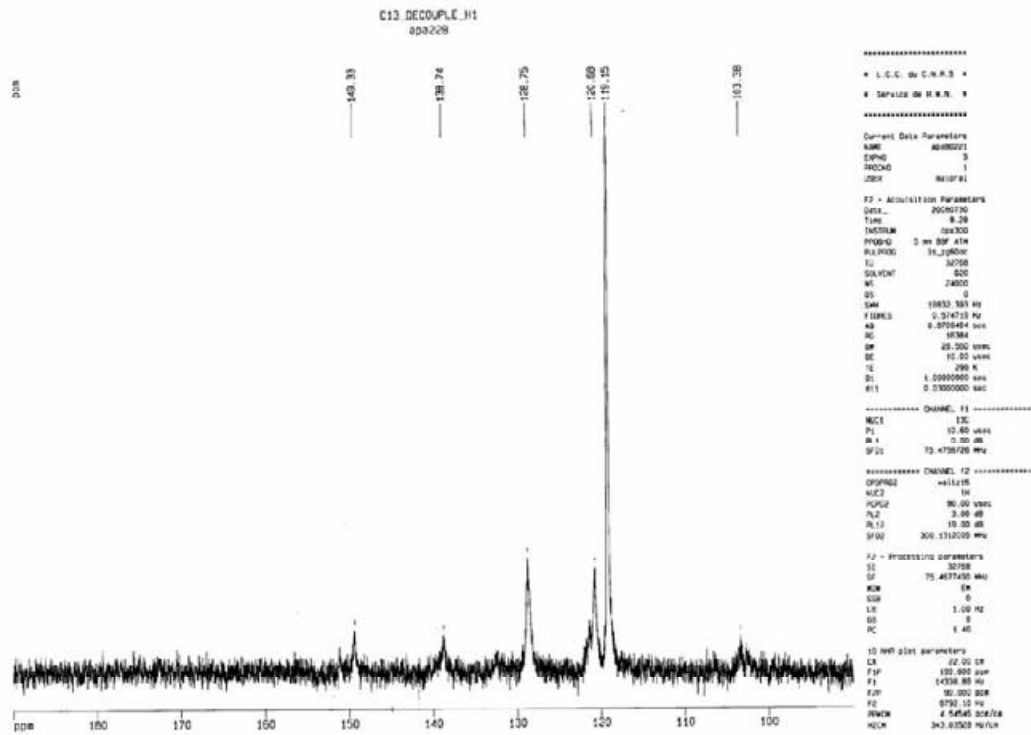
Composé 2d-G1 RMN ^1H



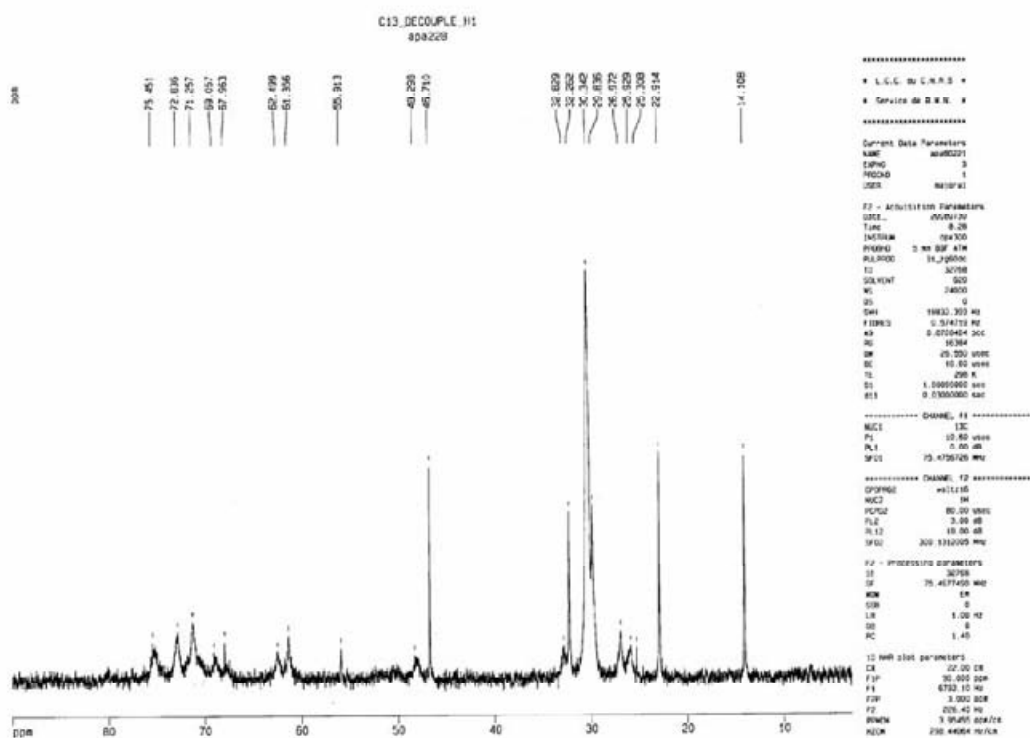
Composé 2d-G1 RMN ¹³C{¹H}



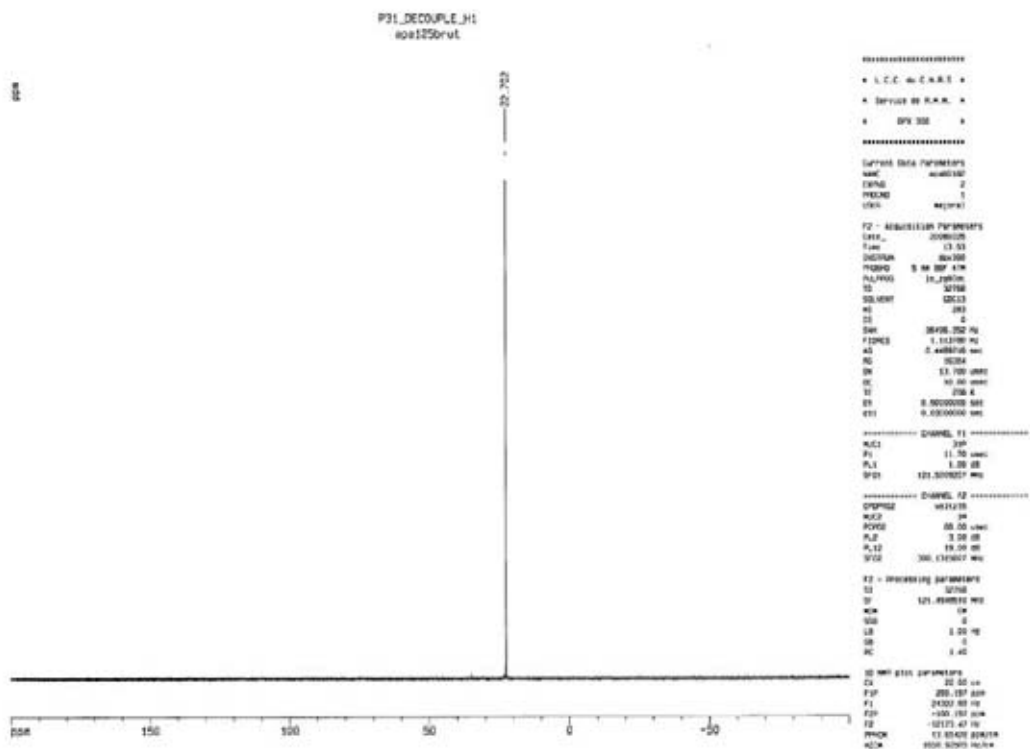
Composé 2d-G1 RMN ¹³C{¹H}



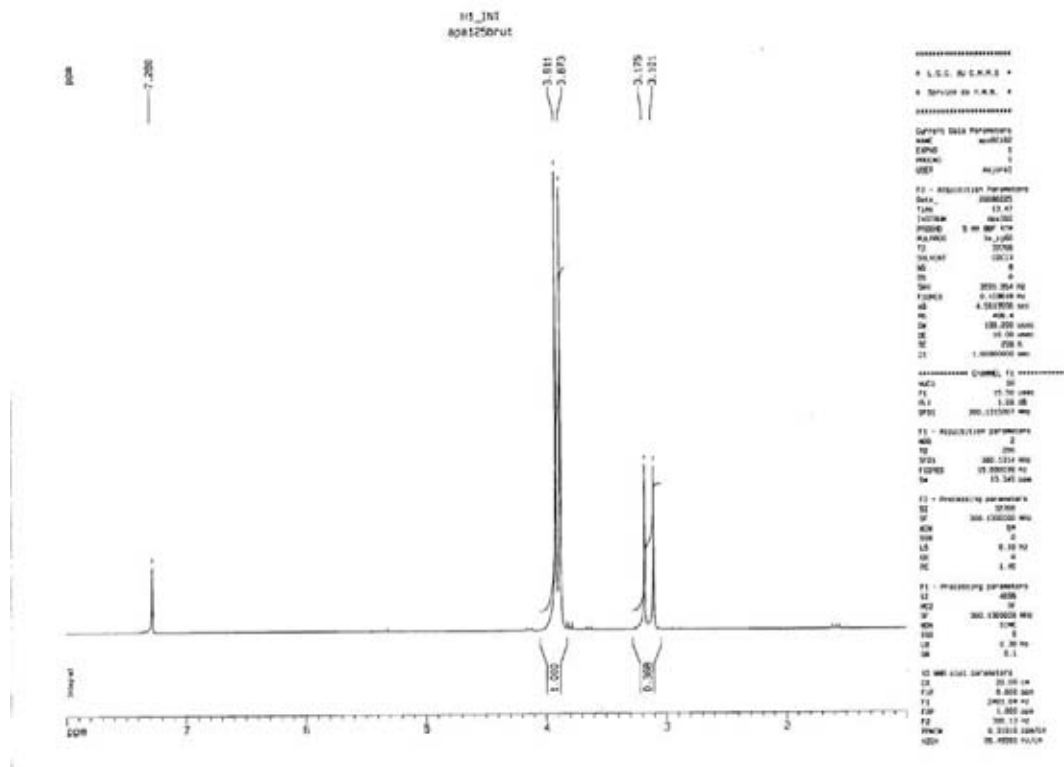
Composé 2d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



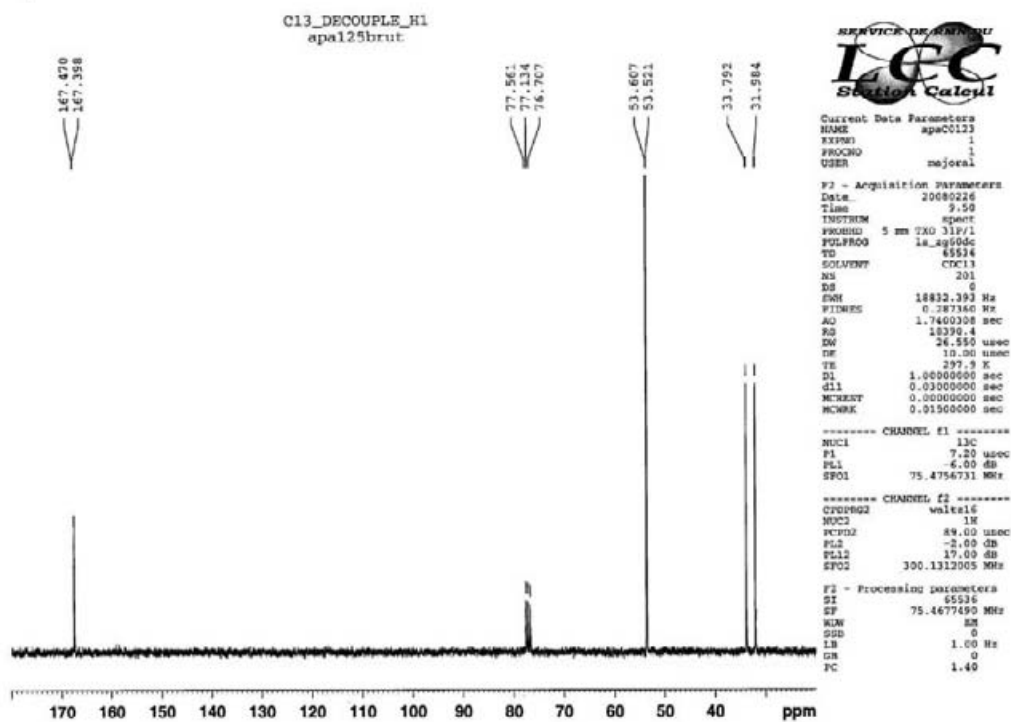
Composé 6 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



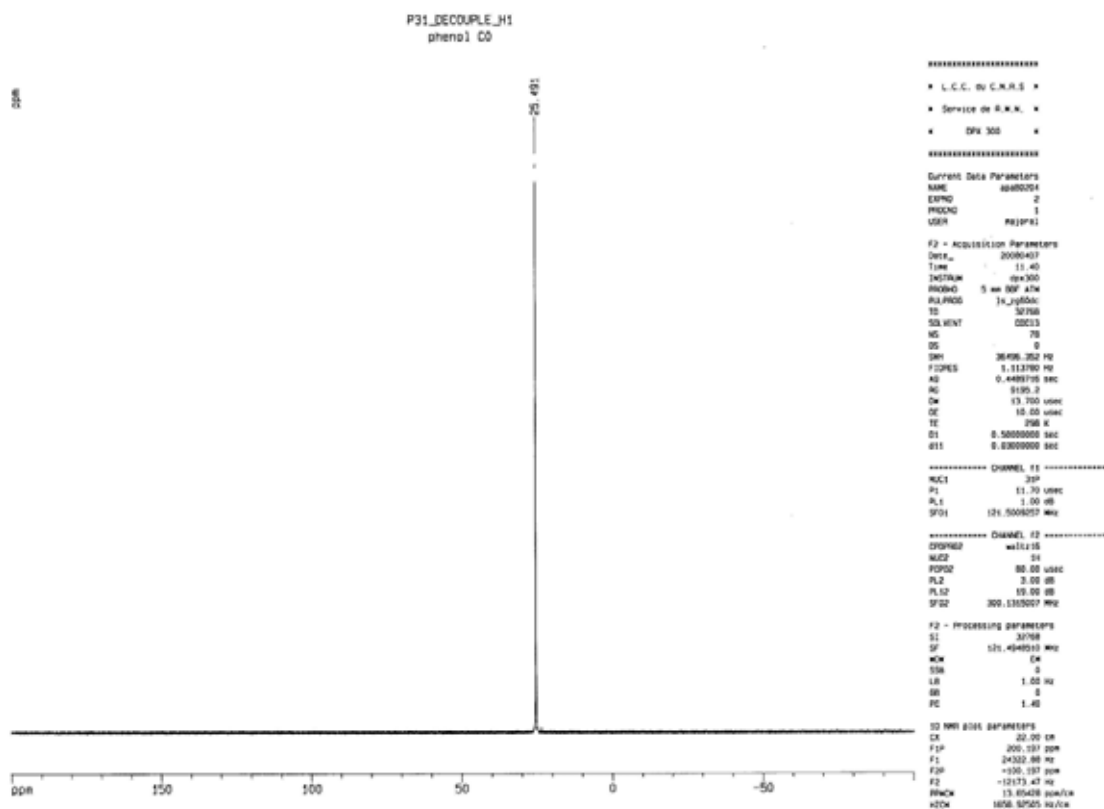
Composé 6 RMN ¹H



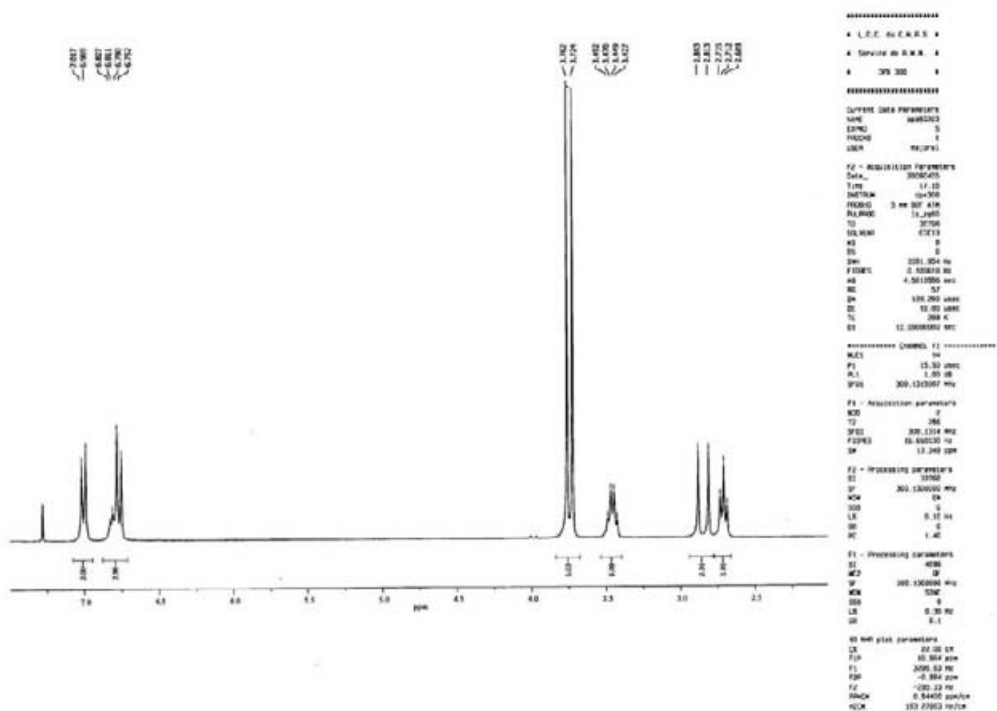
Composé 6 RMN ¹³C{¹H}



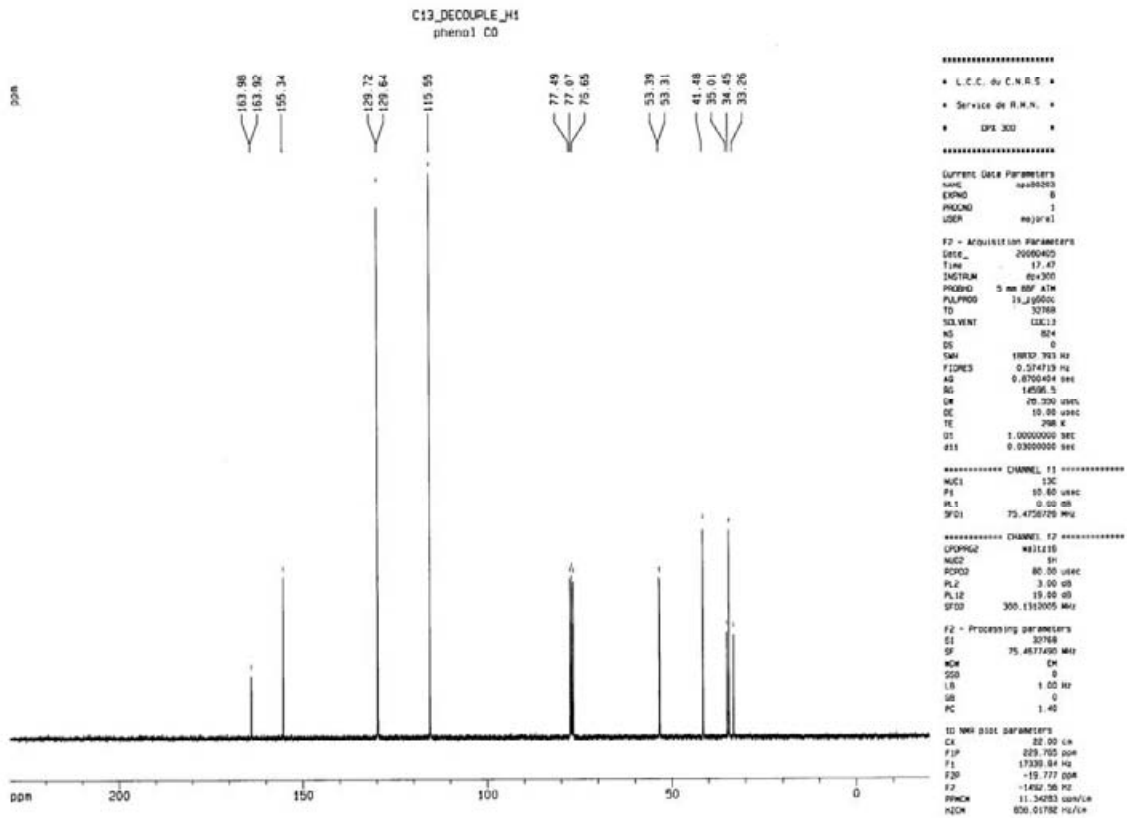
Composé 3a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



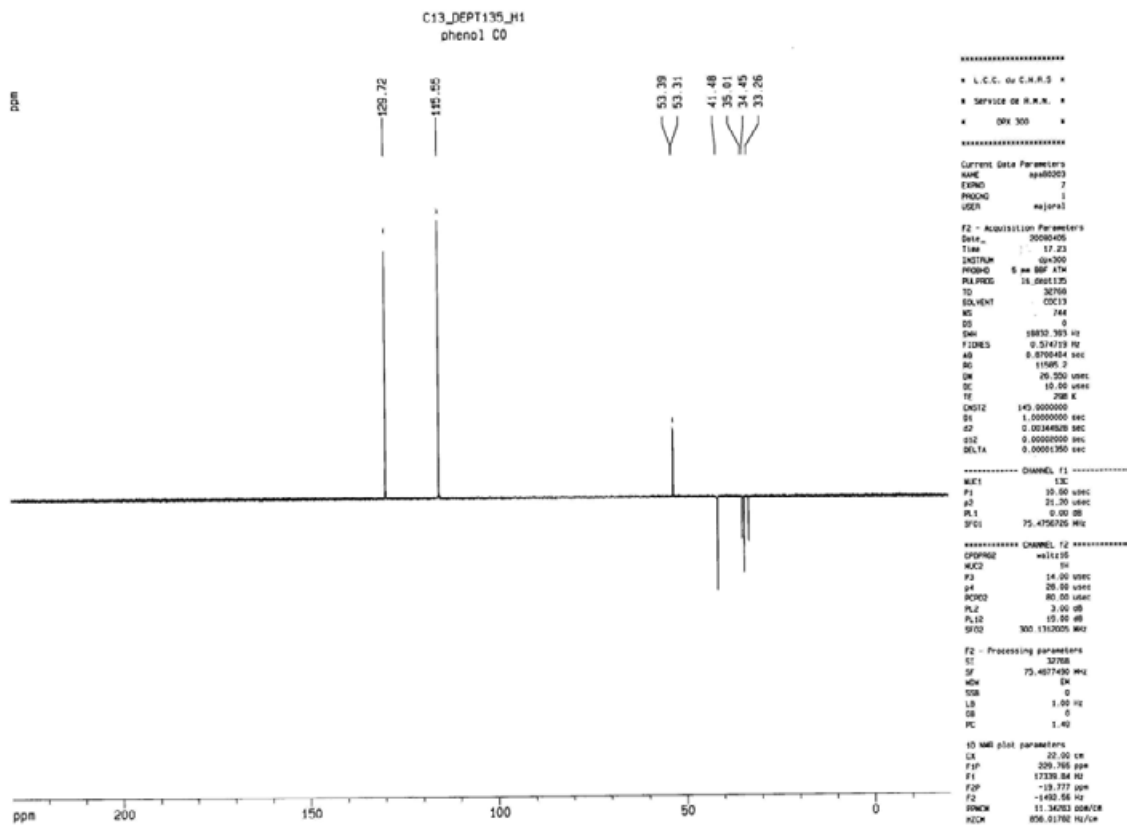
Composé 3a RMN ^1H

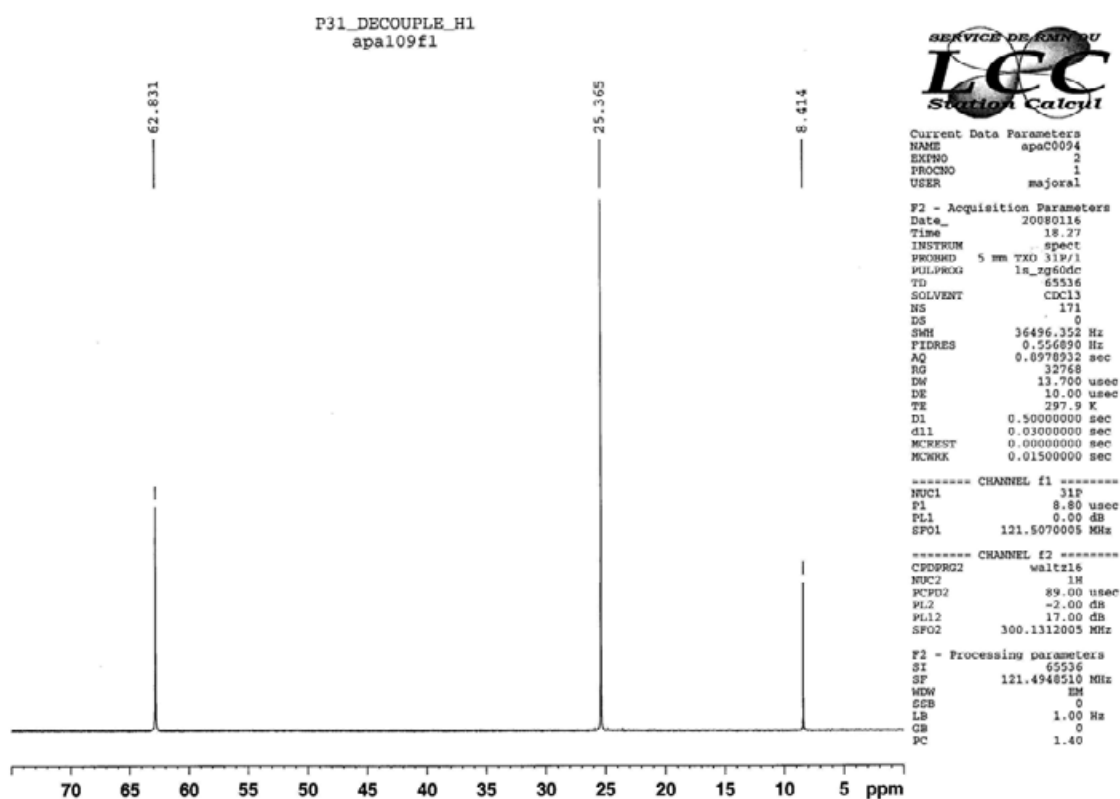
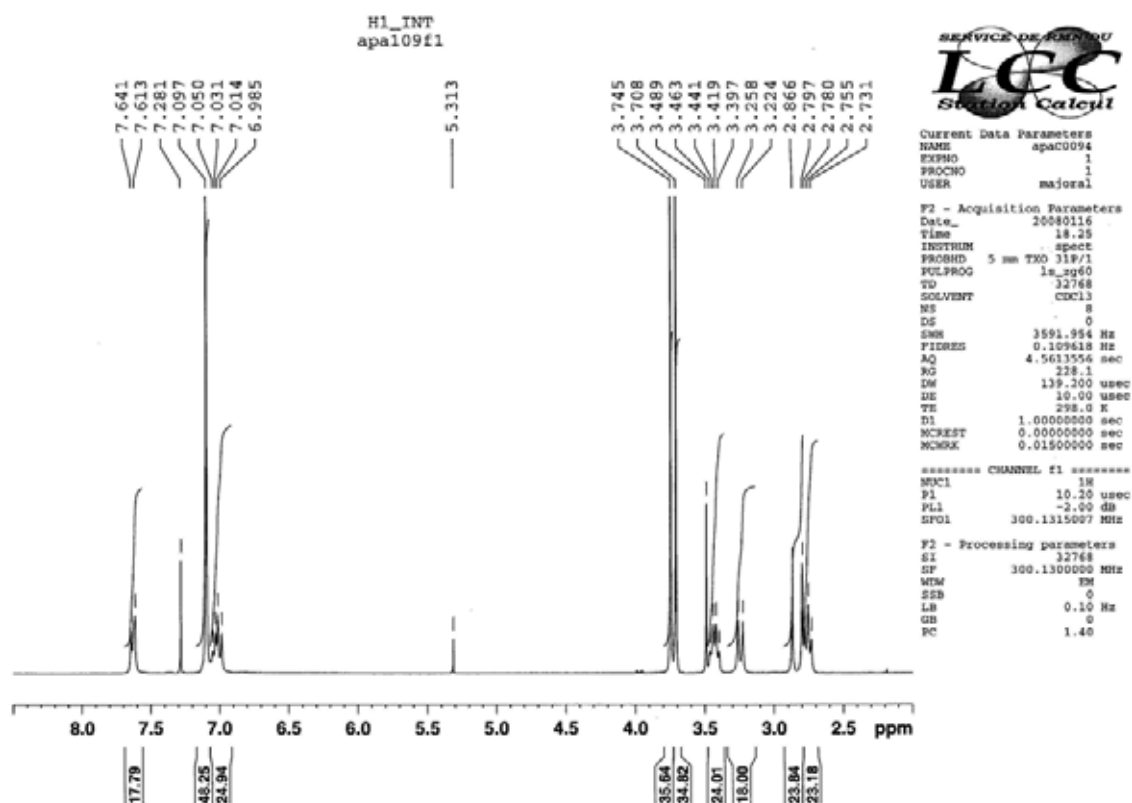


Composé 3a RMN ¹³C{¹H}

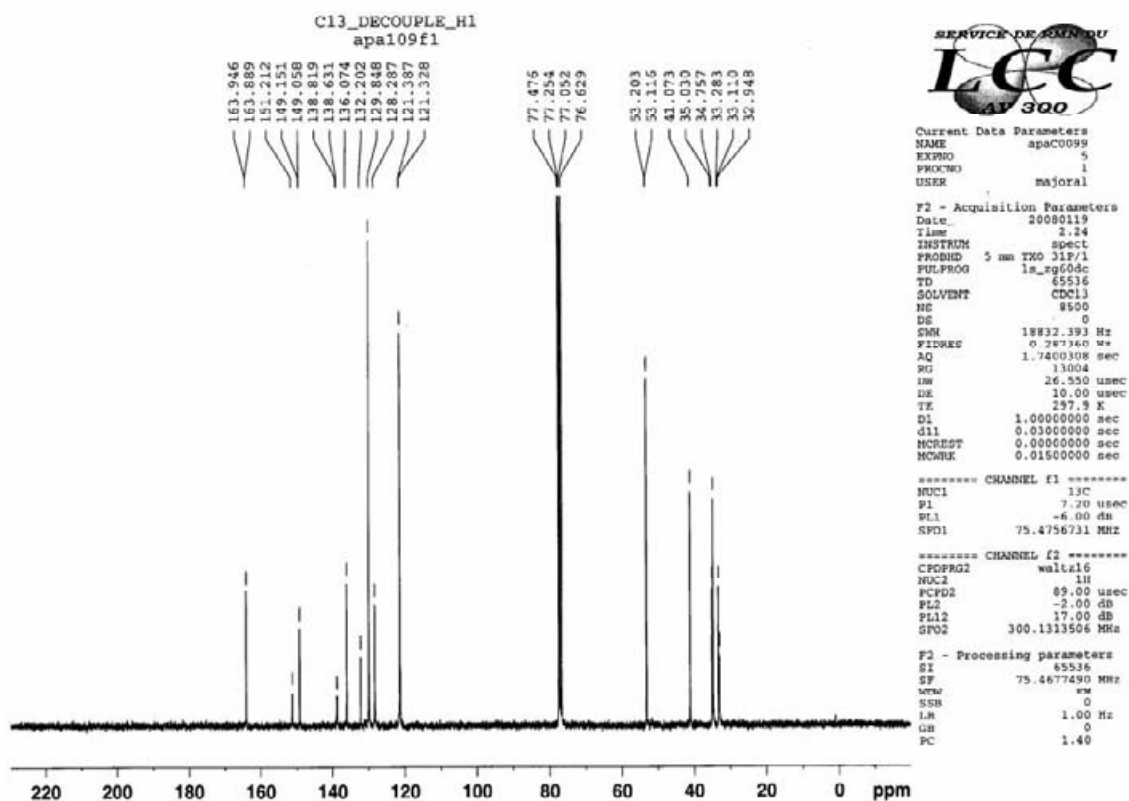


Composé 3a RMN ¹³C{¹H};DEPT

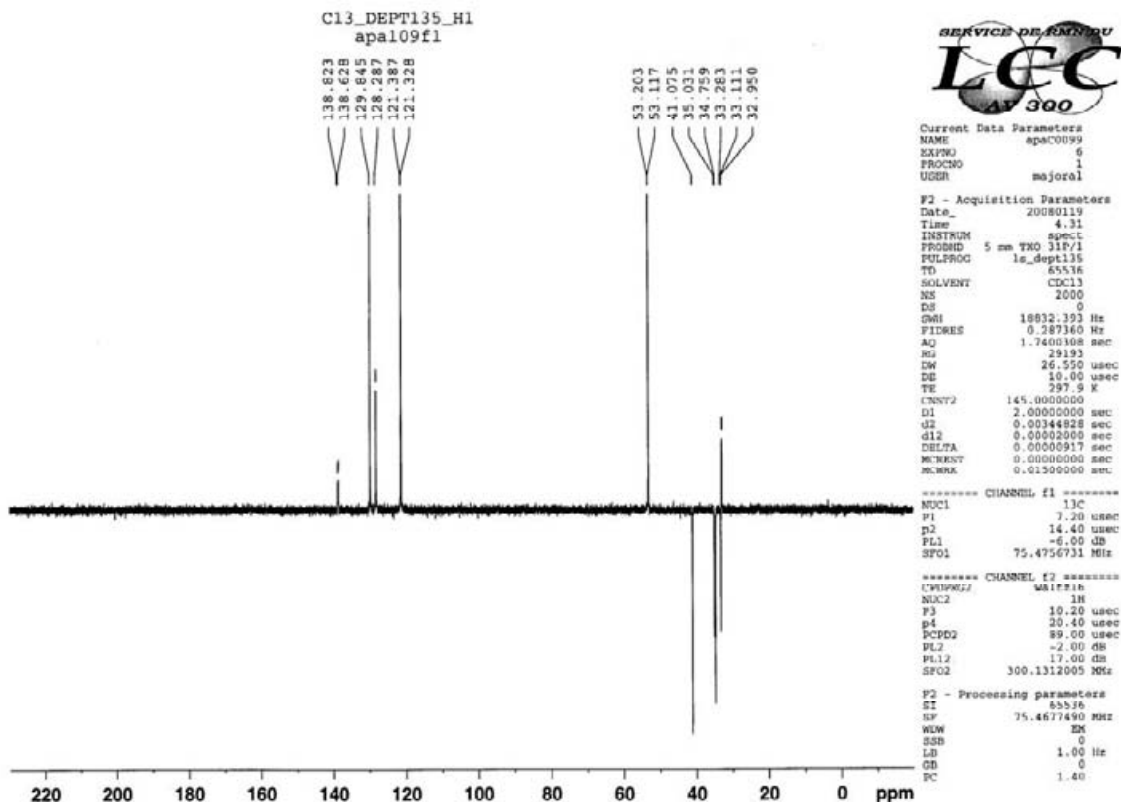


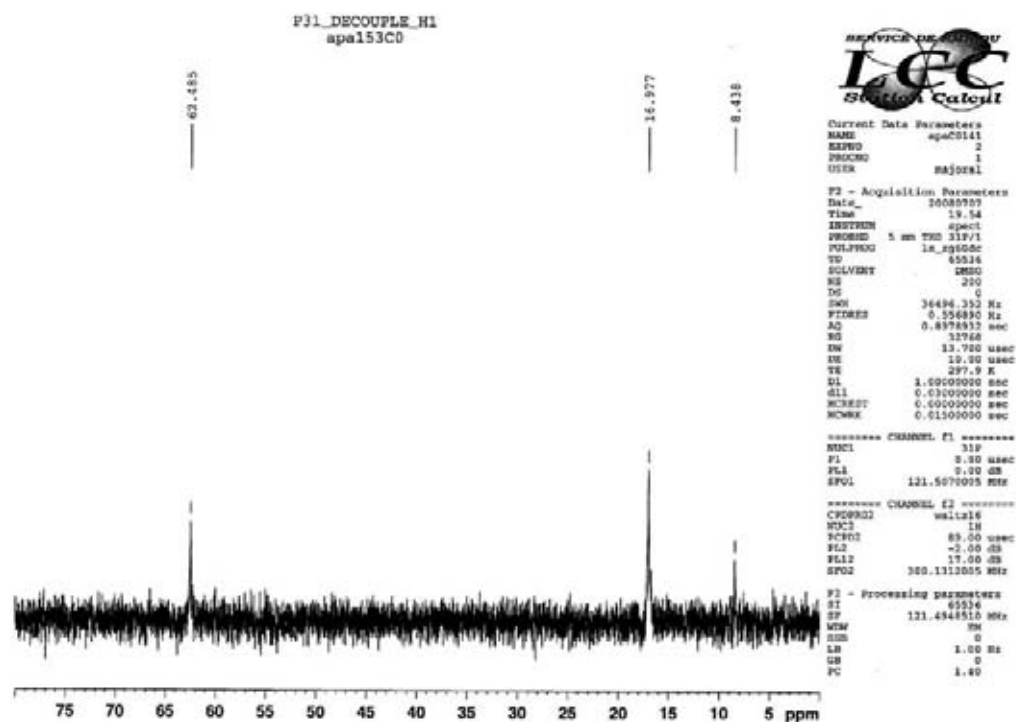
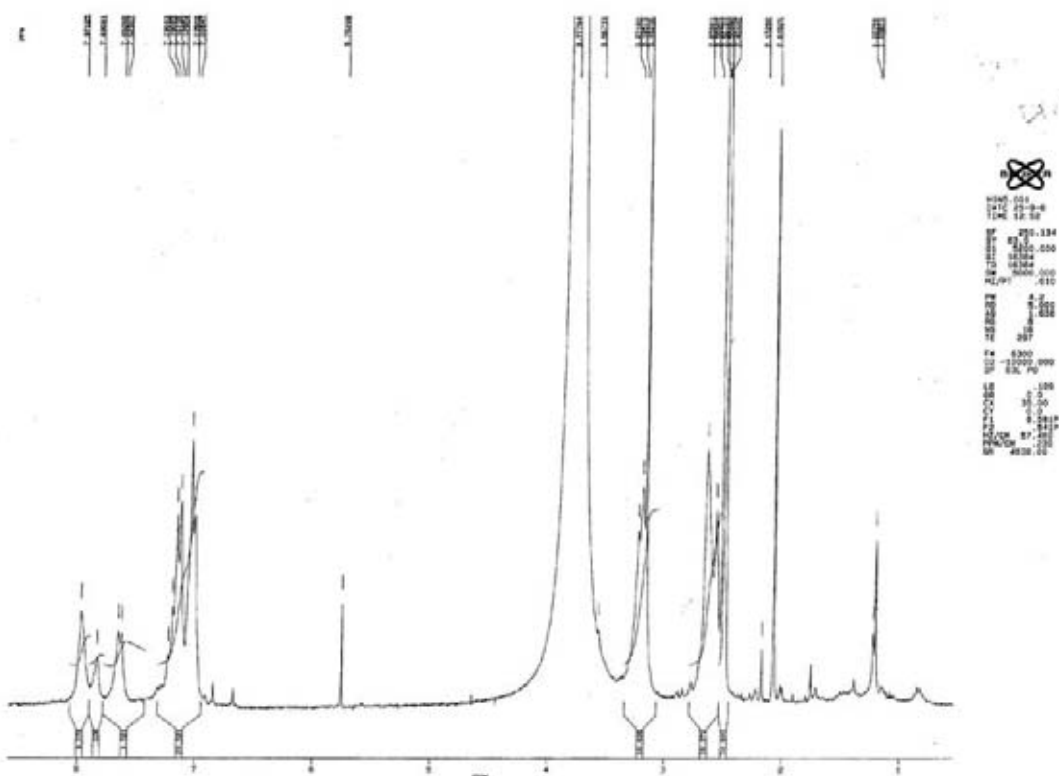
Composé 3a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Composé 3a-G1 RMN ^1H 

Composé 3a-G1 RMN ¹³C{¹H}

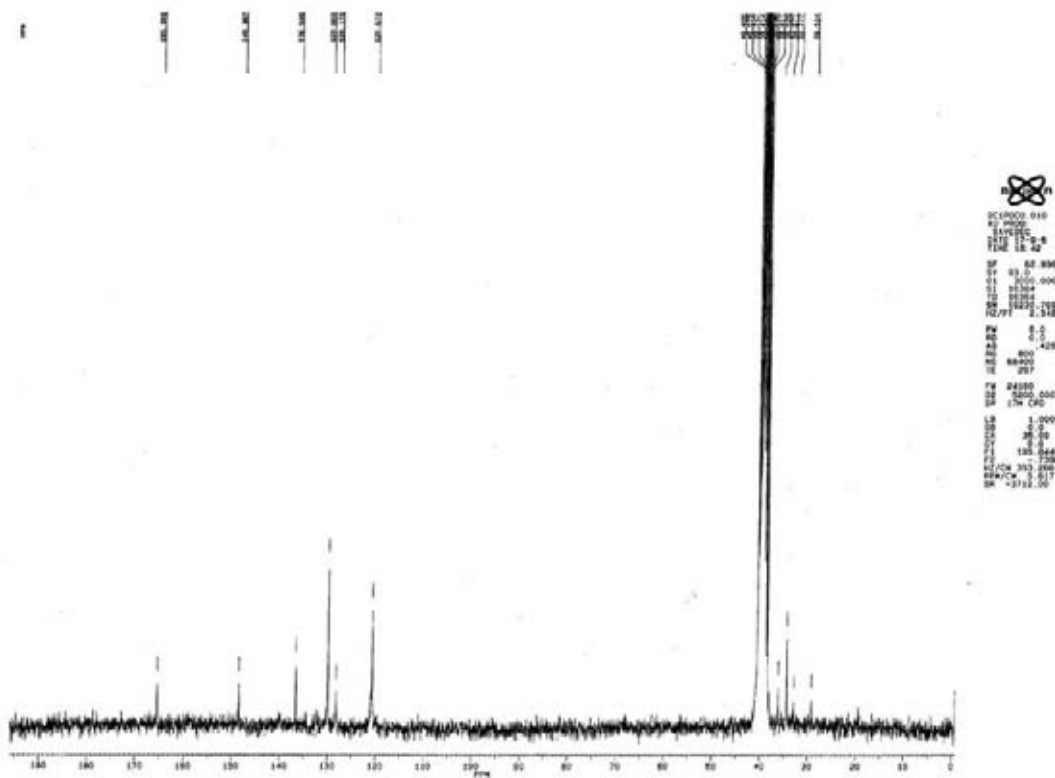


Composé 3a-G1 RMN ¹³C{¹H} DEPT

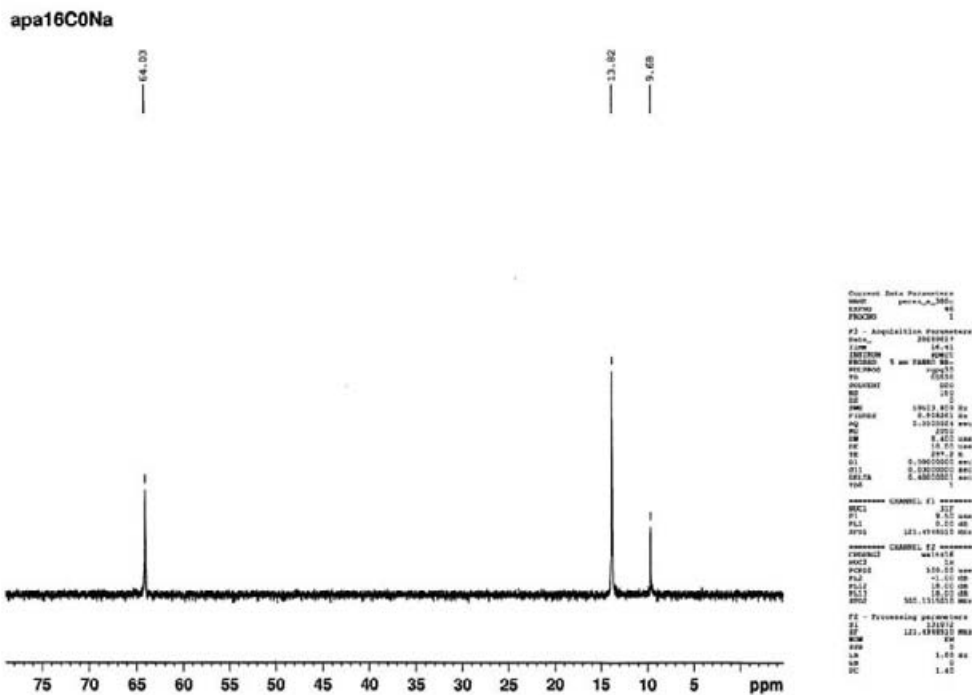


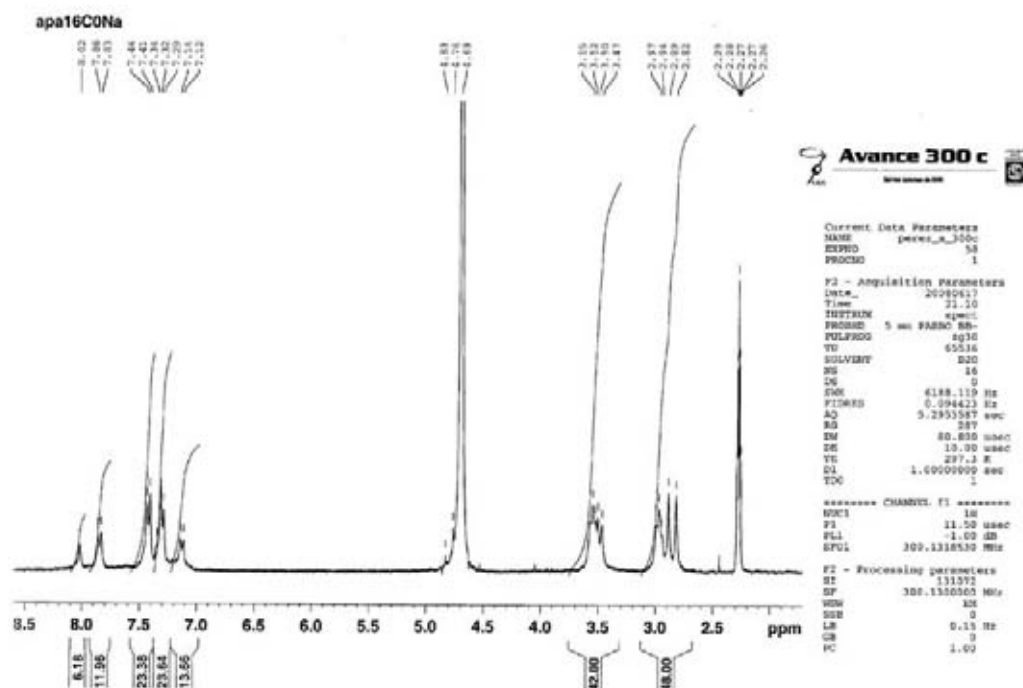
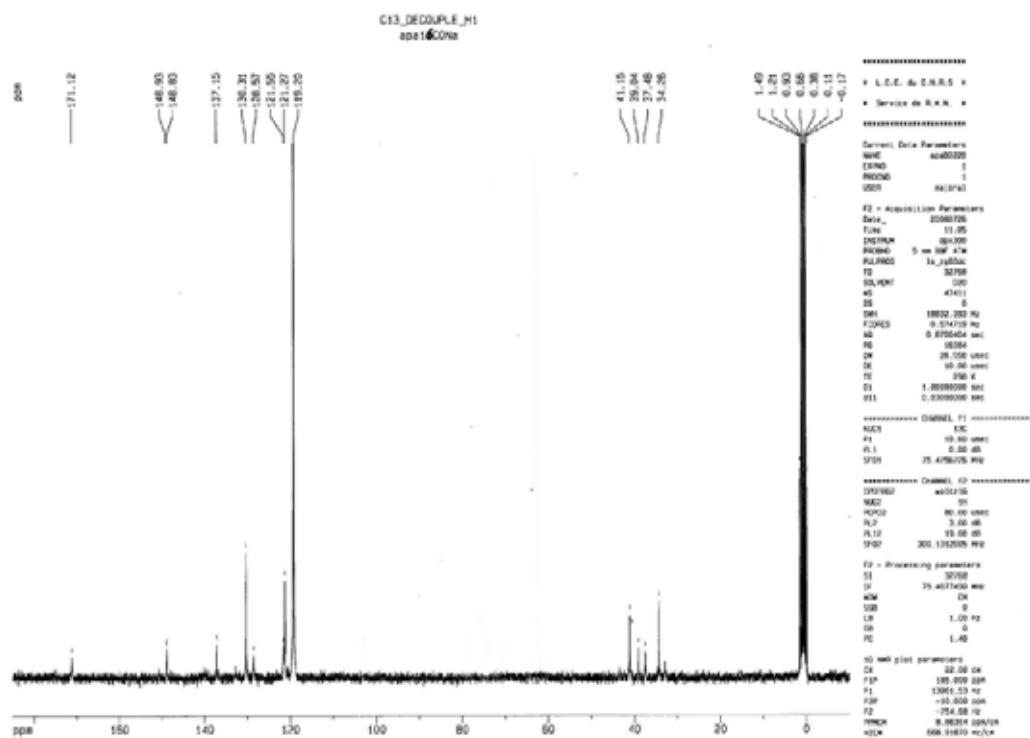
Composé 3b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Composé 3b-G1 RMN ^1H 

Composé 3b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

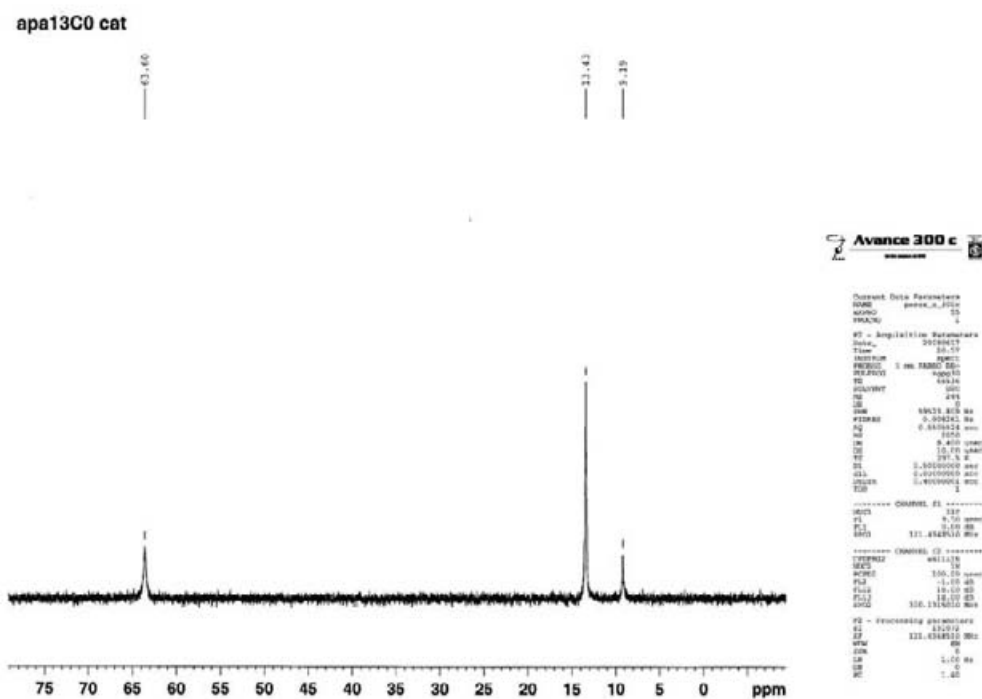


Composé 3c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

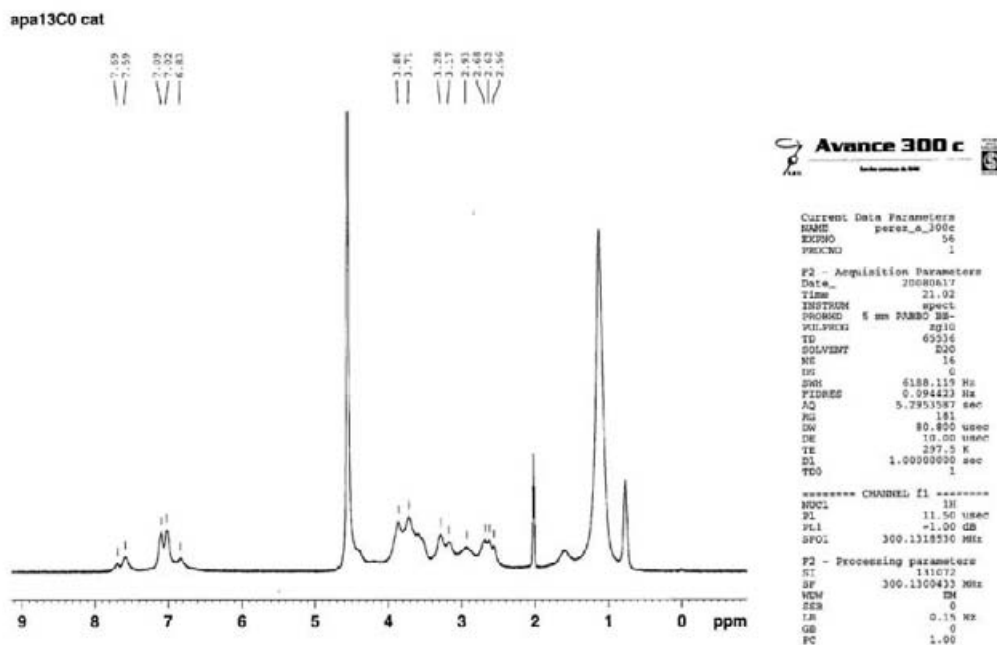


Composé 3c-G1 RMN ^1H Composé 3c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

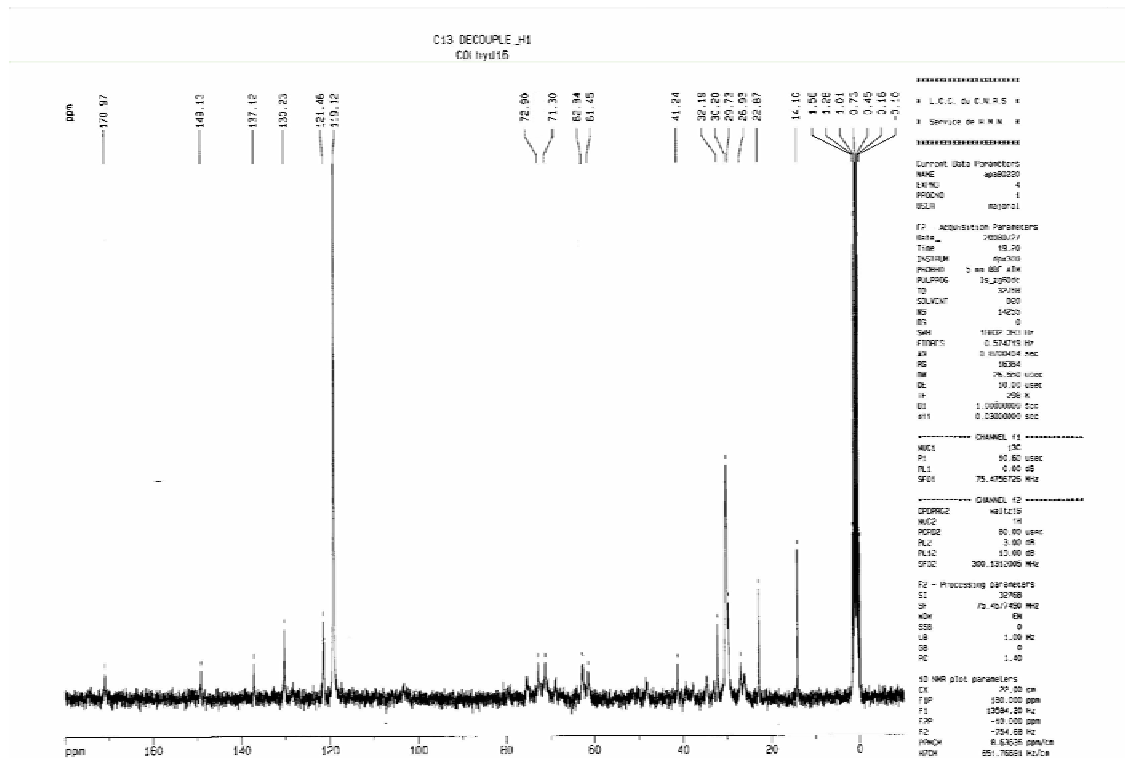
Composé 3d-G1 RMN ³¹P{¹H}



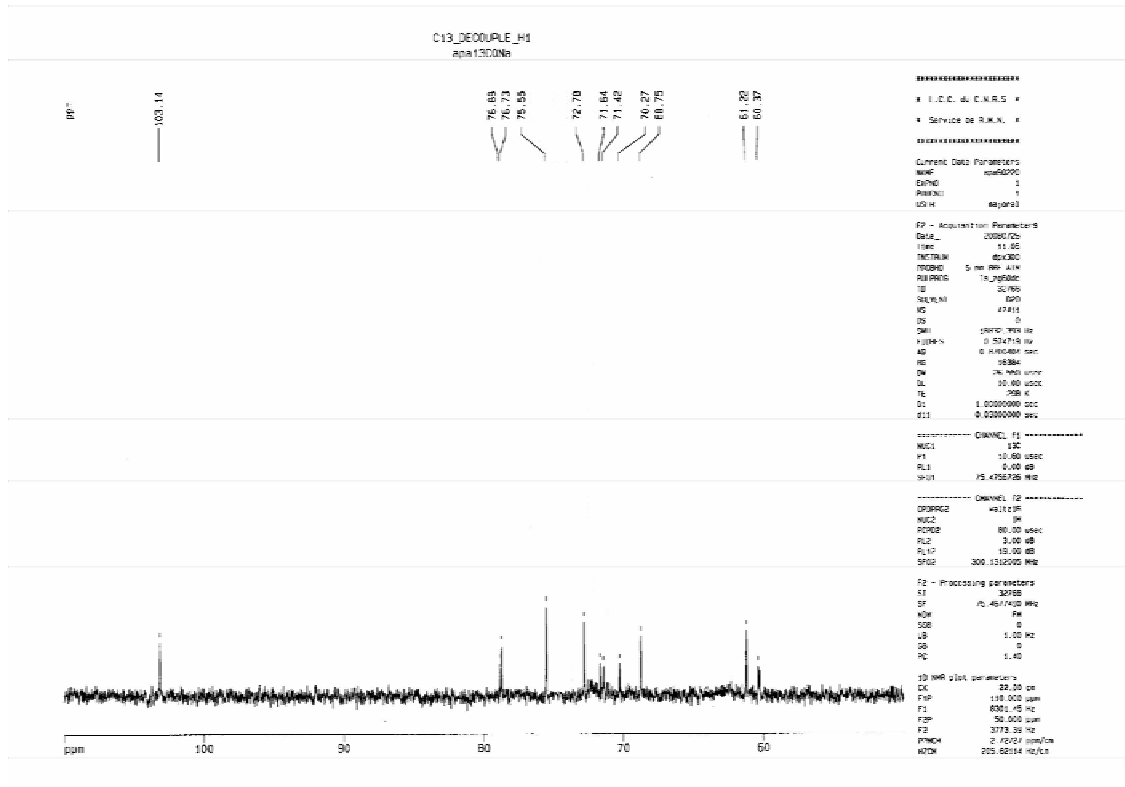
Composé 3d-G1 RMN ¹H



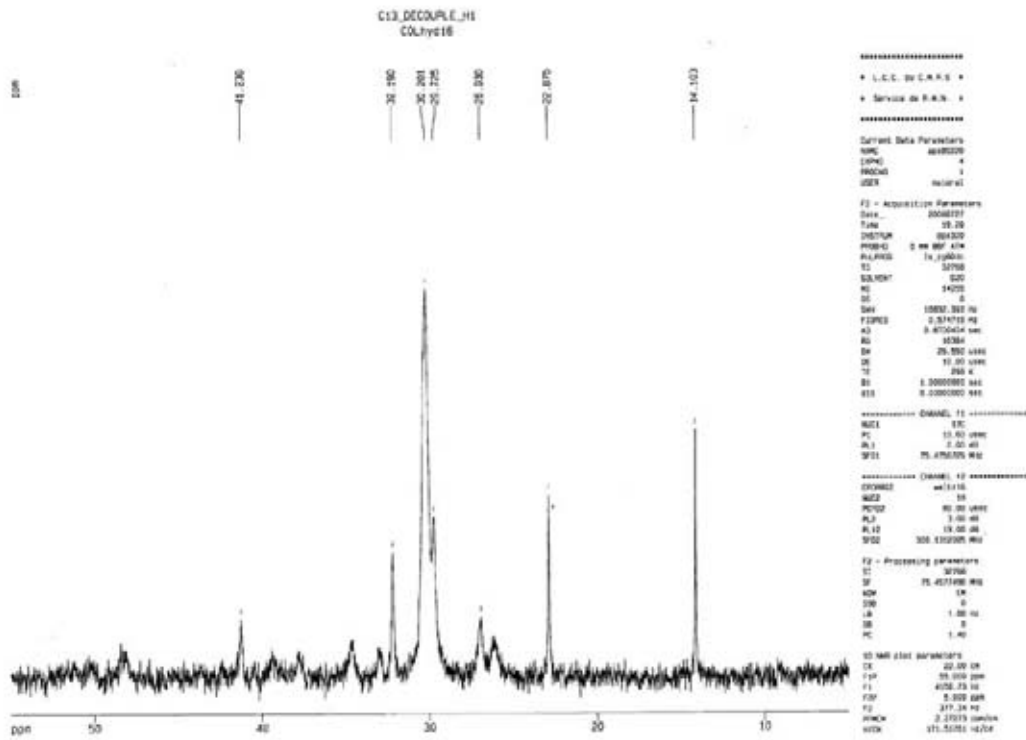
Composé 3d-G1 RMN ¹³C{¹H}



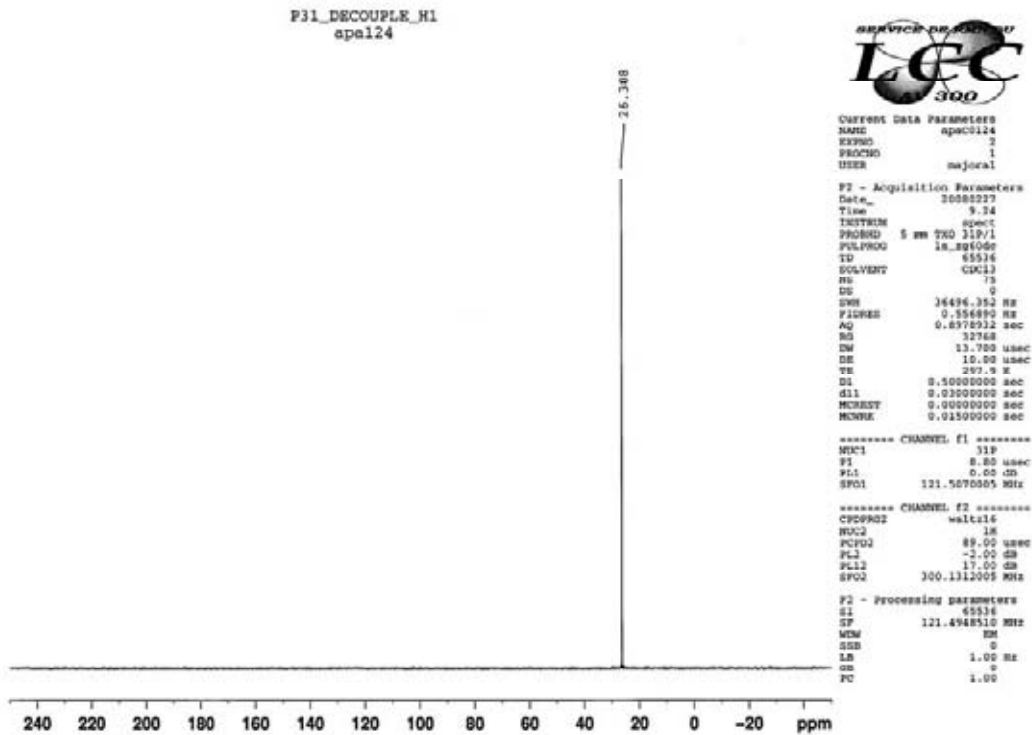
Composé 3d-G1 RMN ¹³C{¹H}



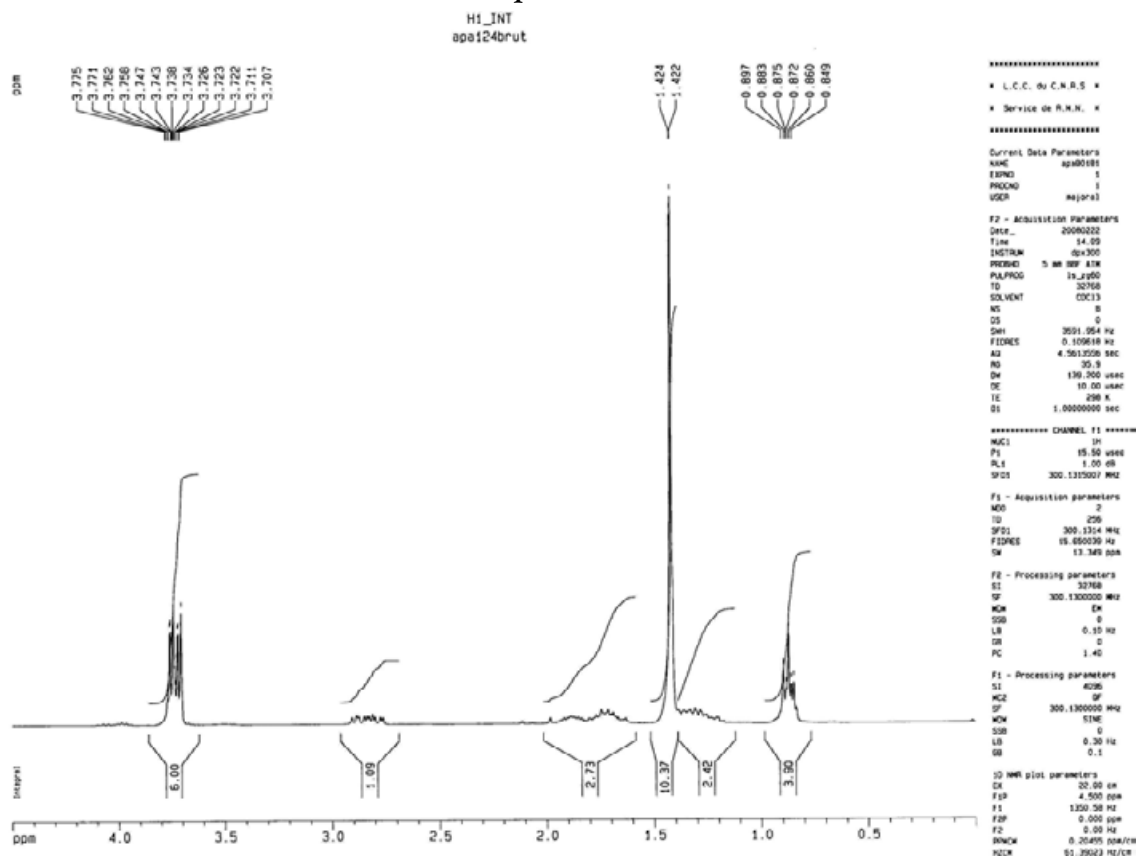
Composé 3d-G1 RMN ¹³C{¹H}



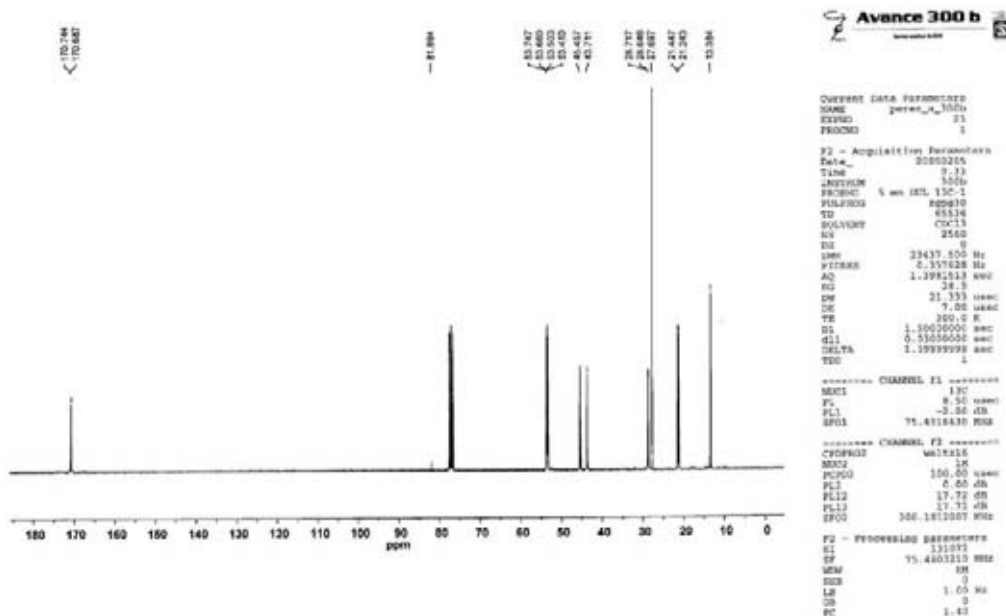
Composé 9 RMN ³¹P{¹H}



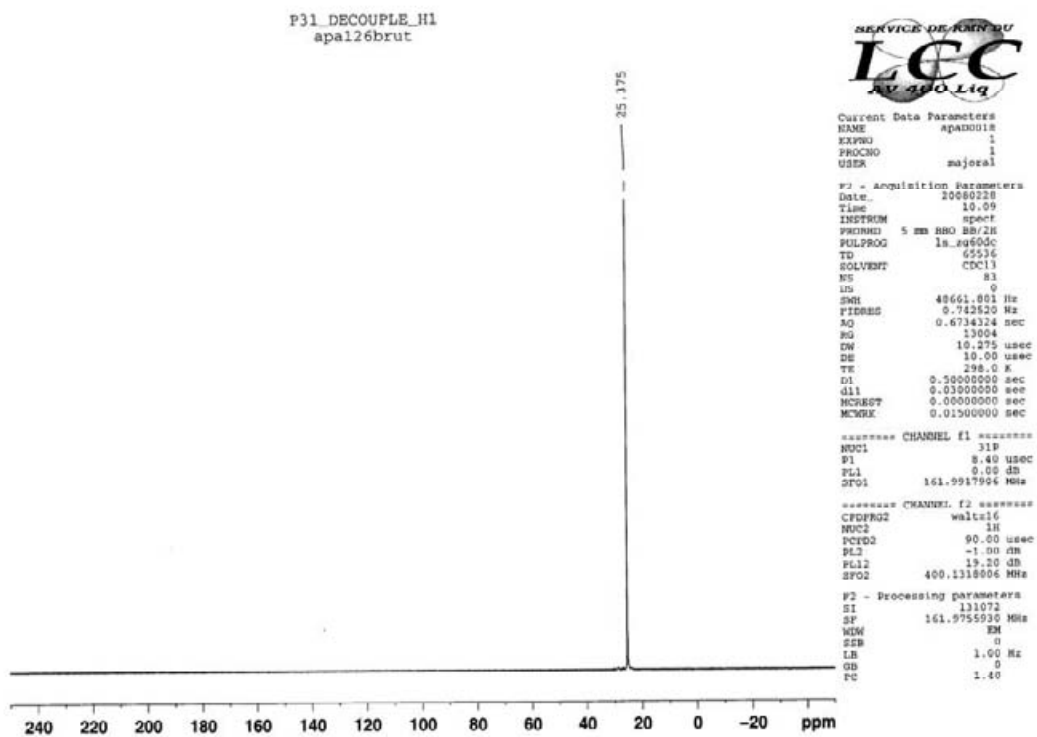
Composé 9 RMN ¹H



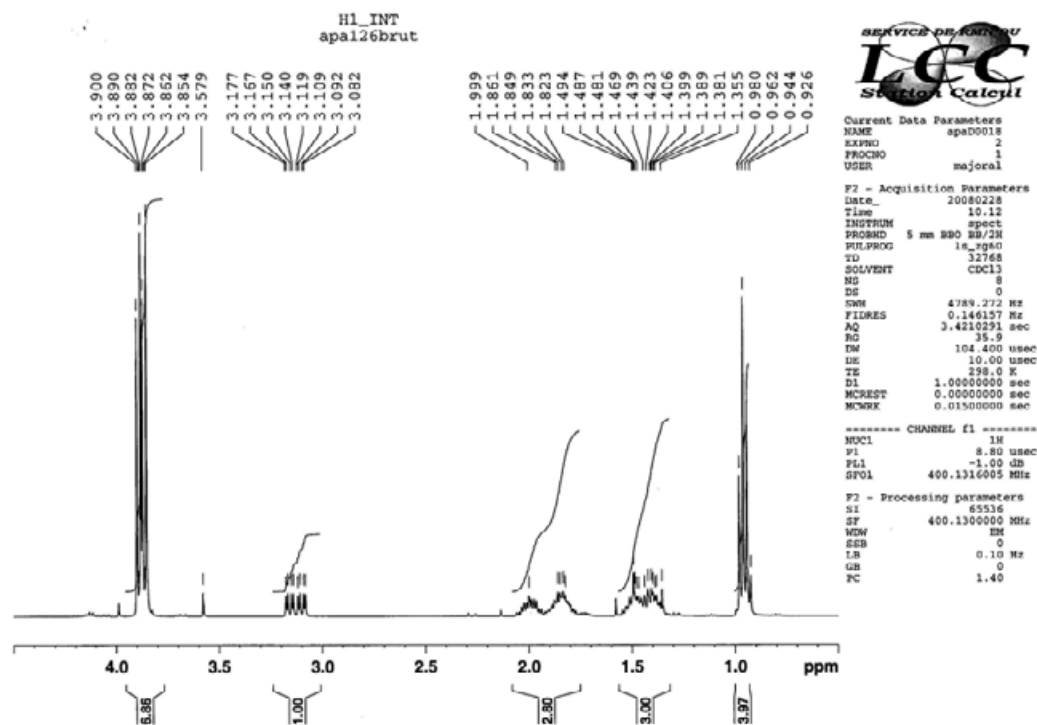
Composé 9 RMN ¹³C{¹H}

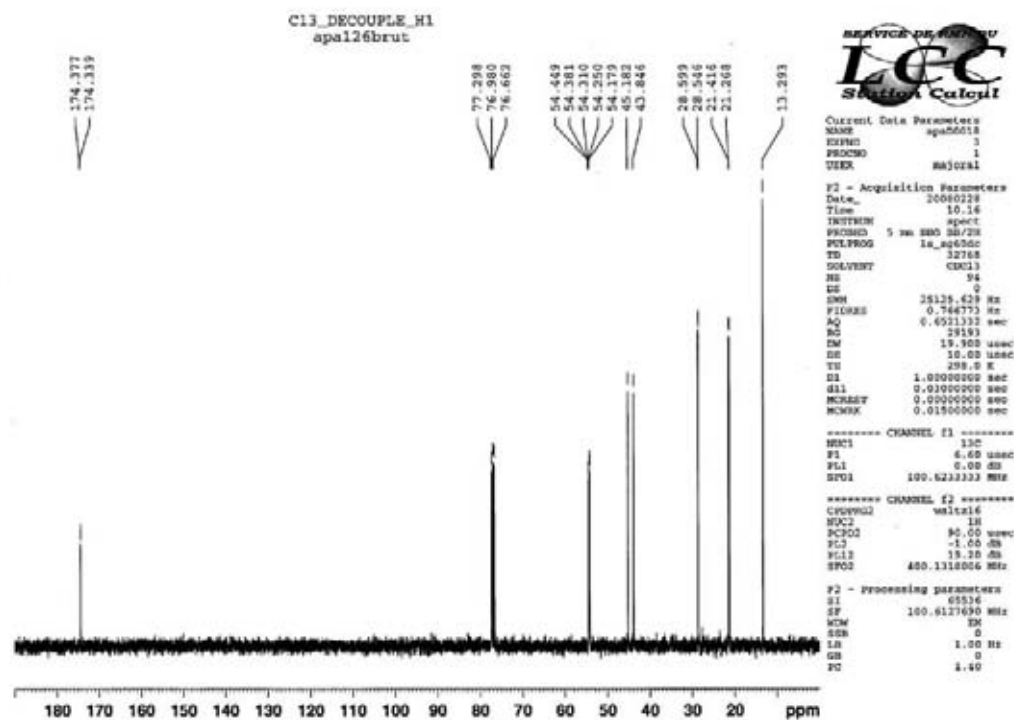
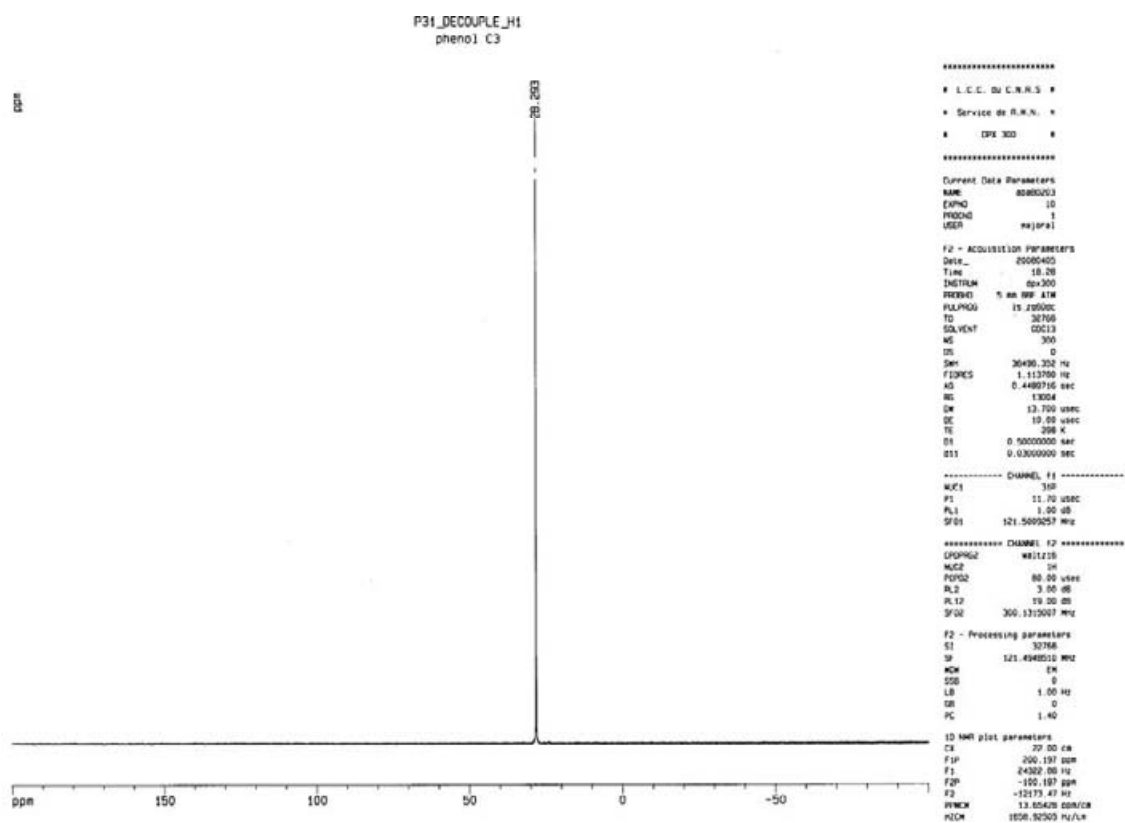


Composé 7 RMN ³¹P{¹H}

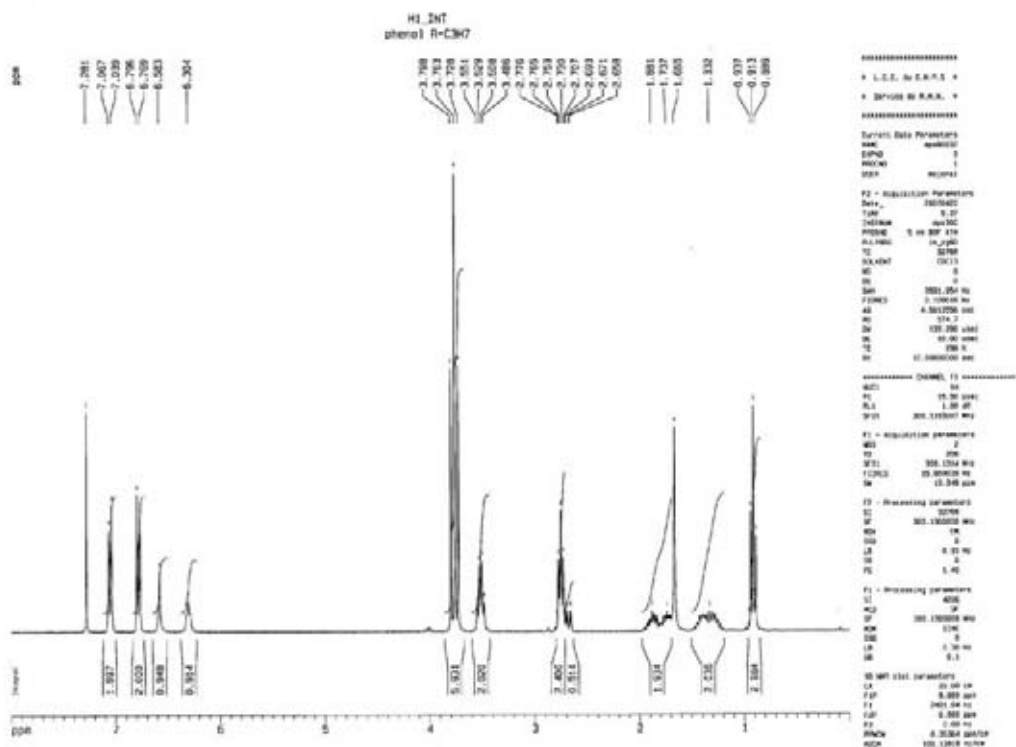


Composé 7 RMN ¹H

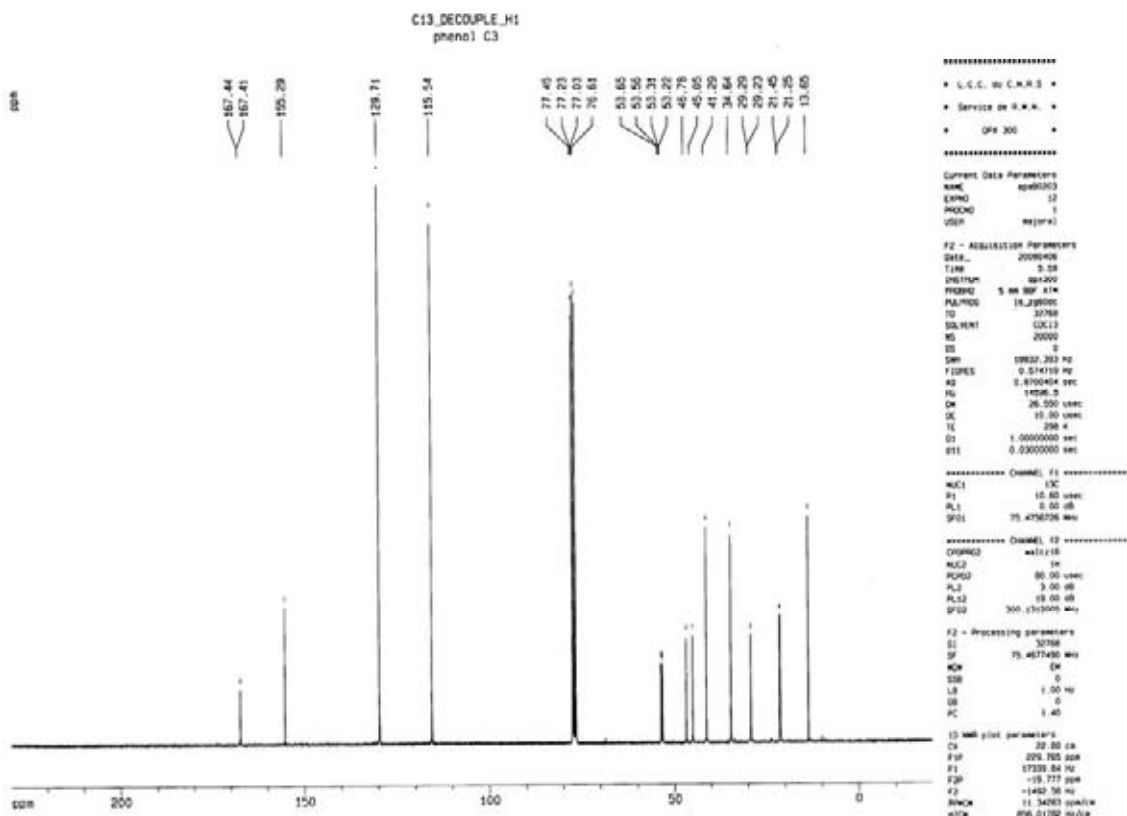


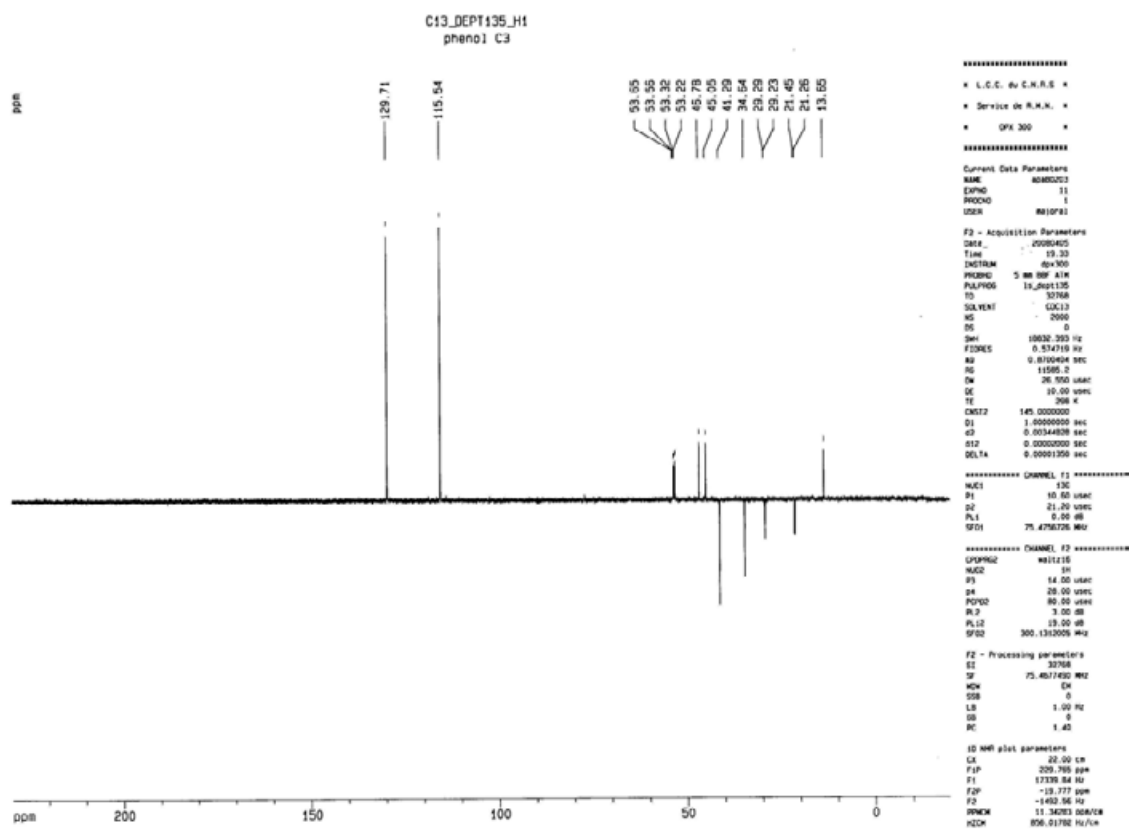
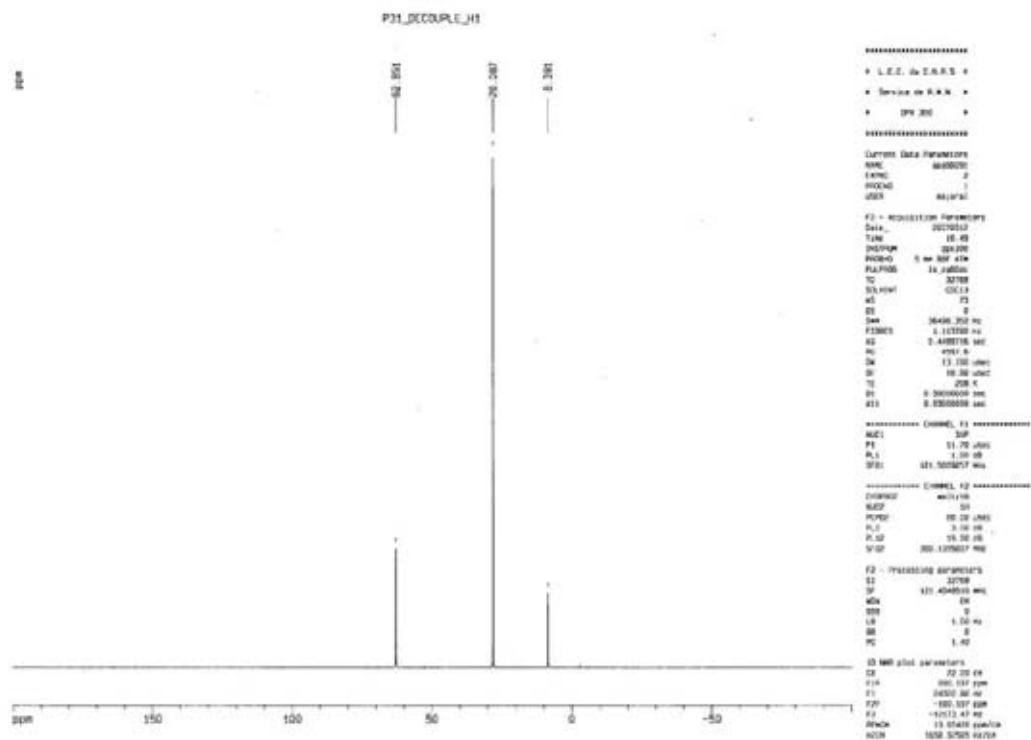
Composé 7 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Composé 4a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ 

Composé 4a RMN ¹H

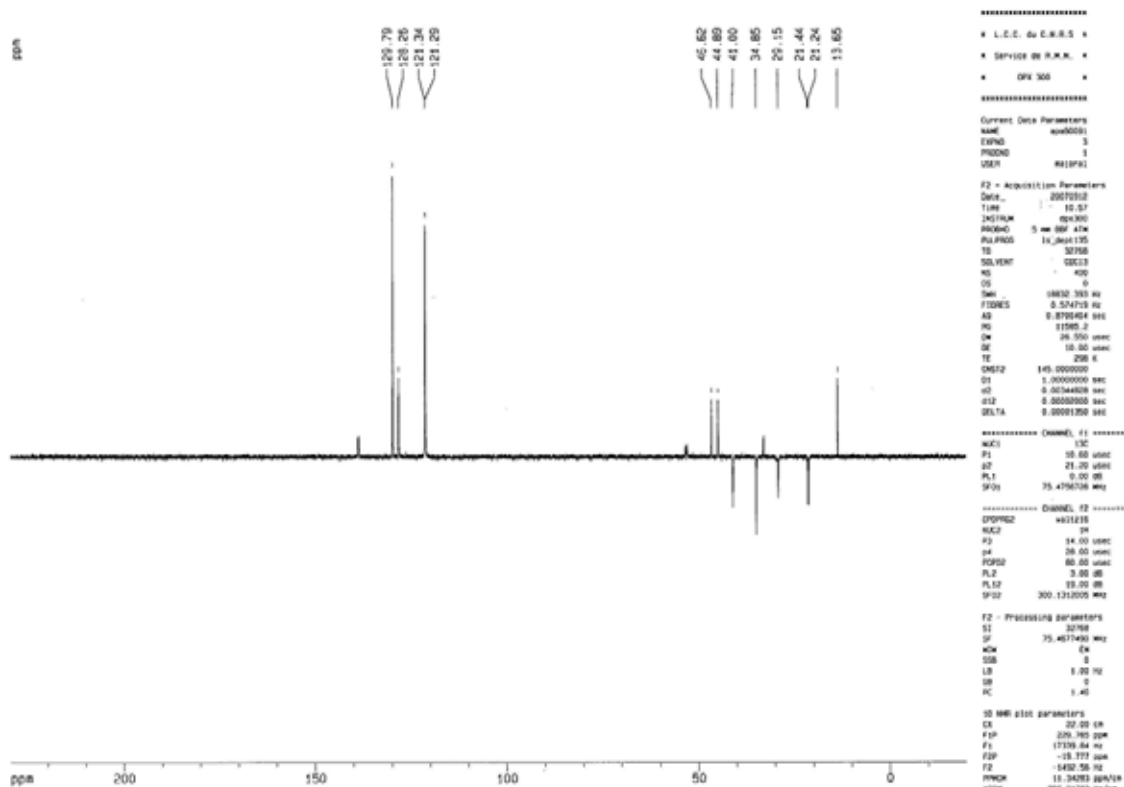


Composé 4a RMN ¹³C{¹H}

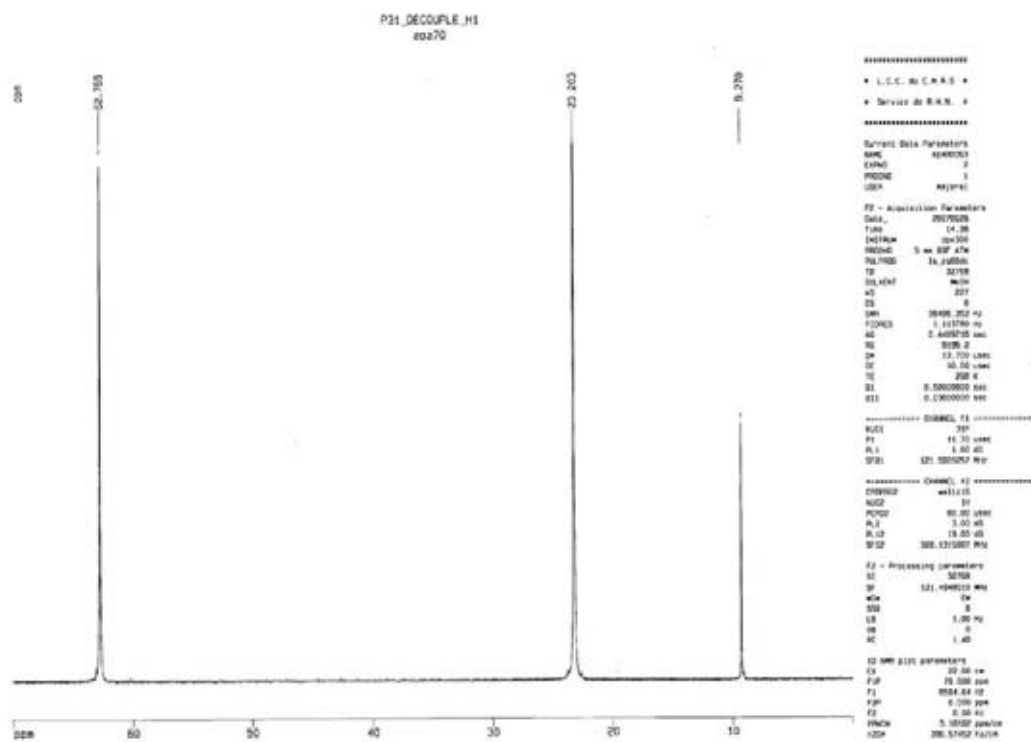


Composé 4a RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPTComposé 4a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ 

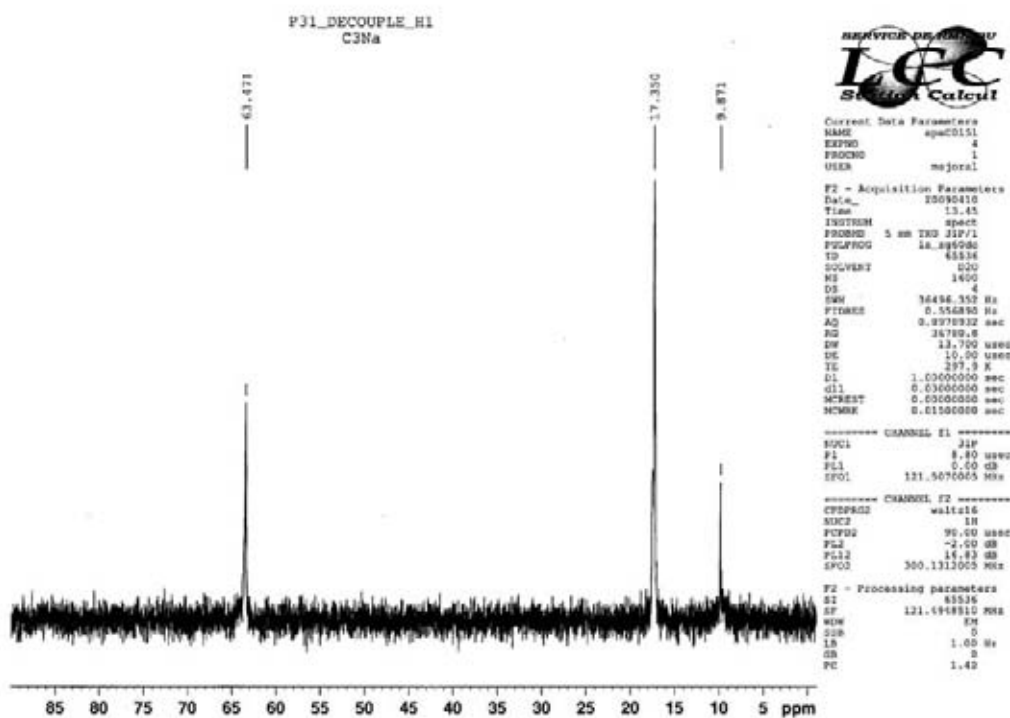
Composé 4a-G1 RMN ¹³C{¹H} DEPT



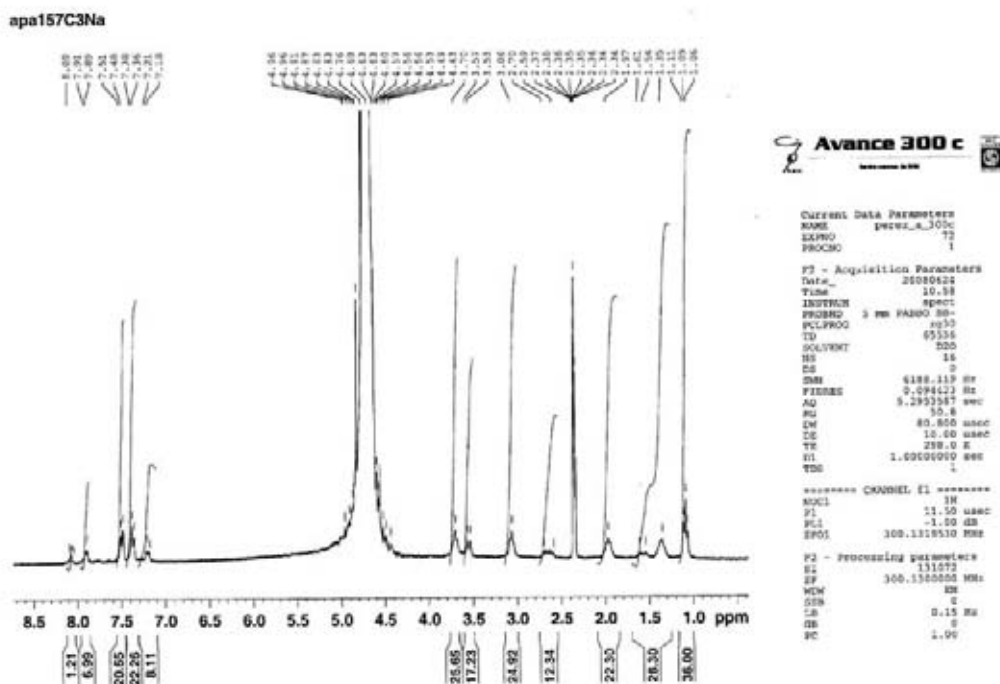
Composé 4b-G1 RMN ³¹P{¹H}



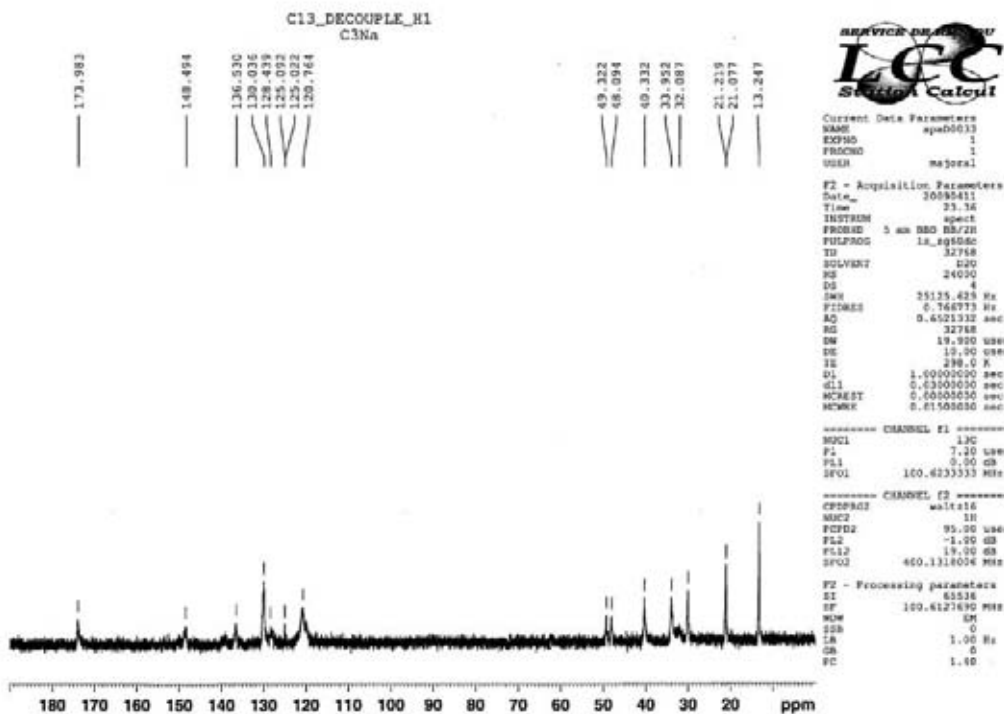
Composé 4c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



Composé 4c-G1 RMN ^1H

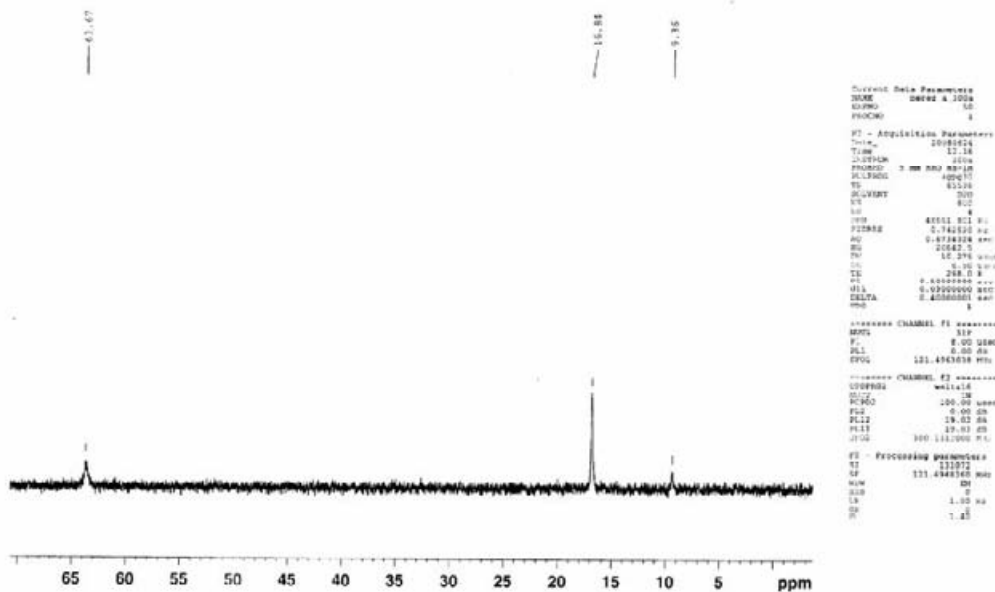


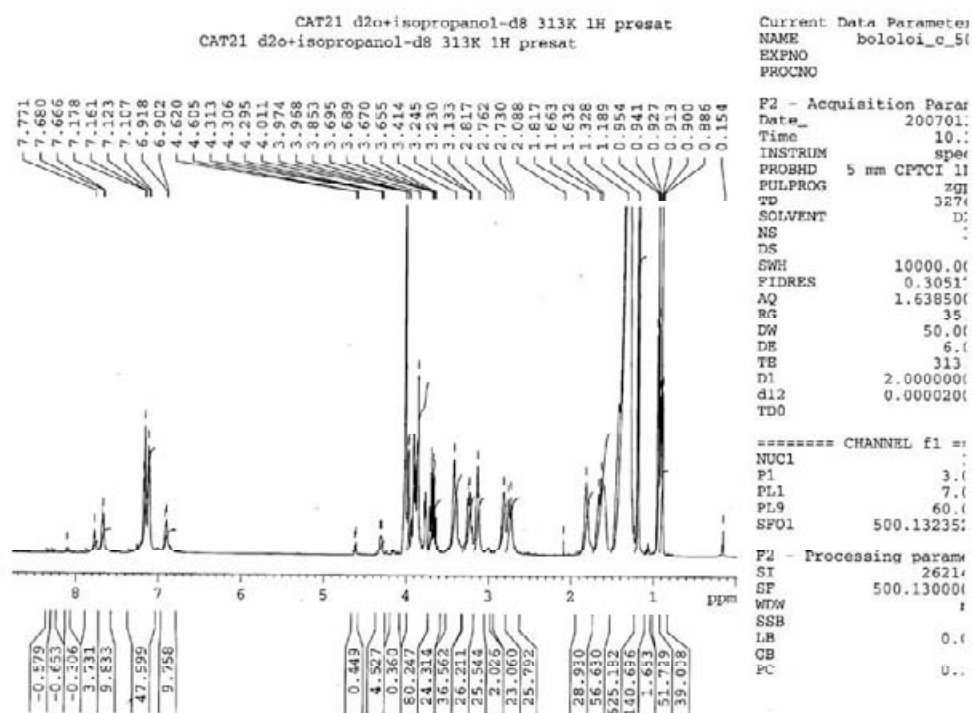
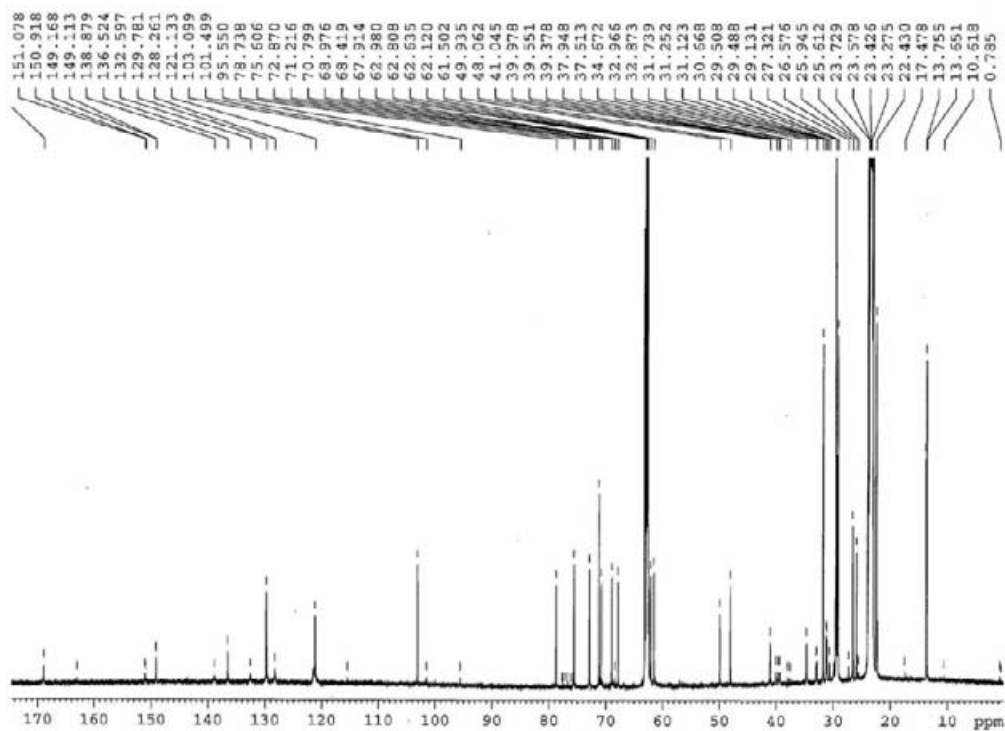
Composé 4c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



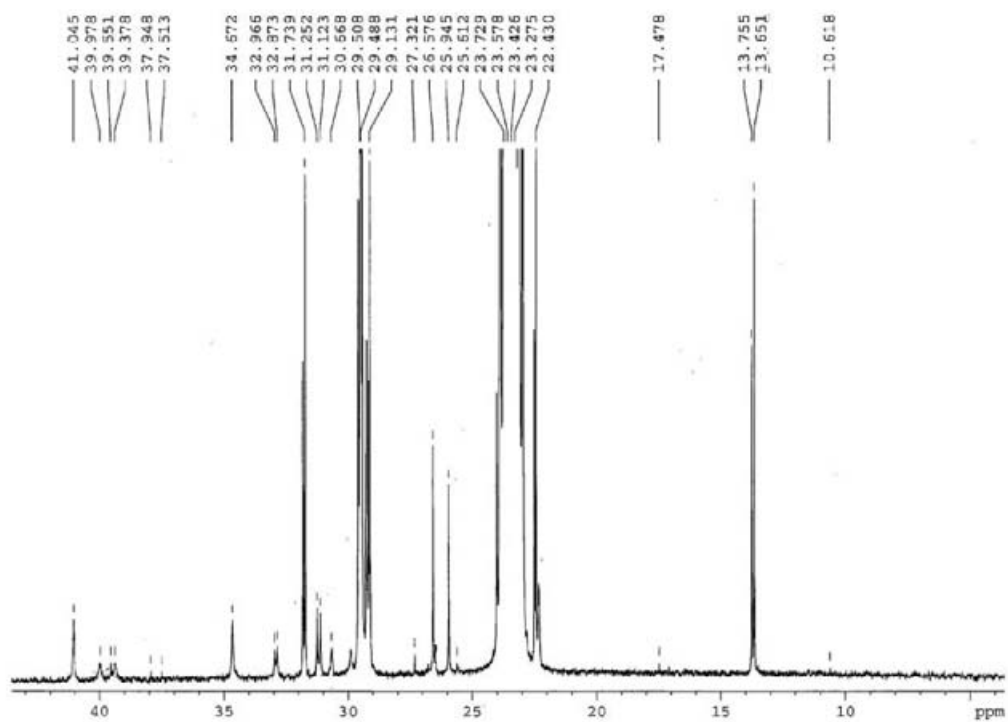
Composé 4d-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

apa158C3Lhyd16

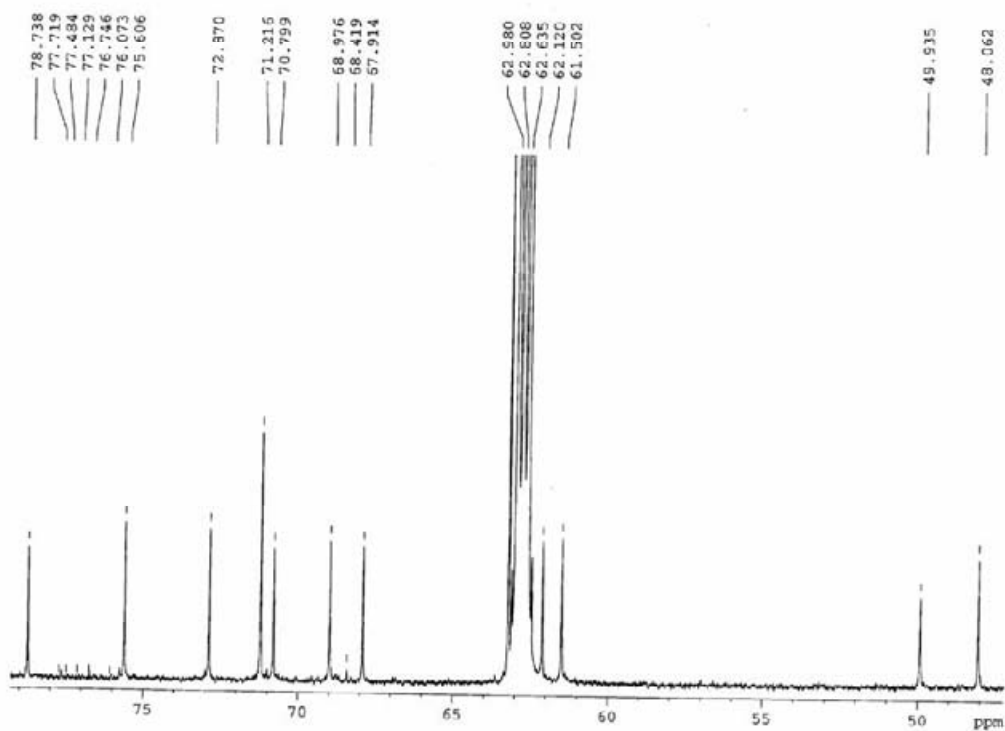


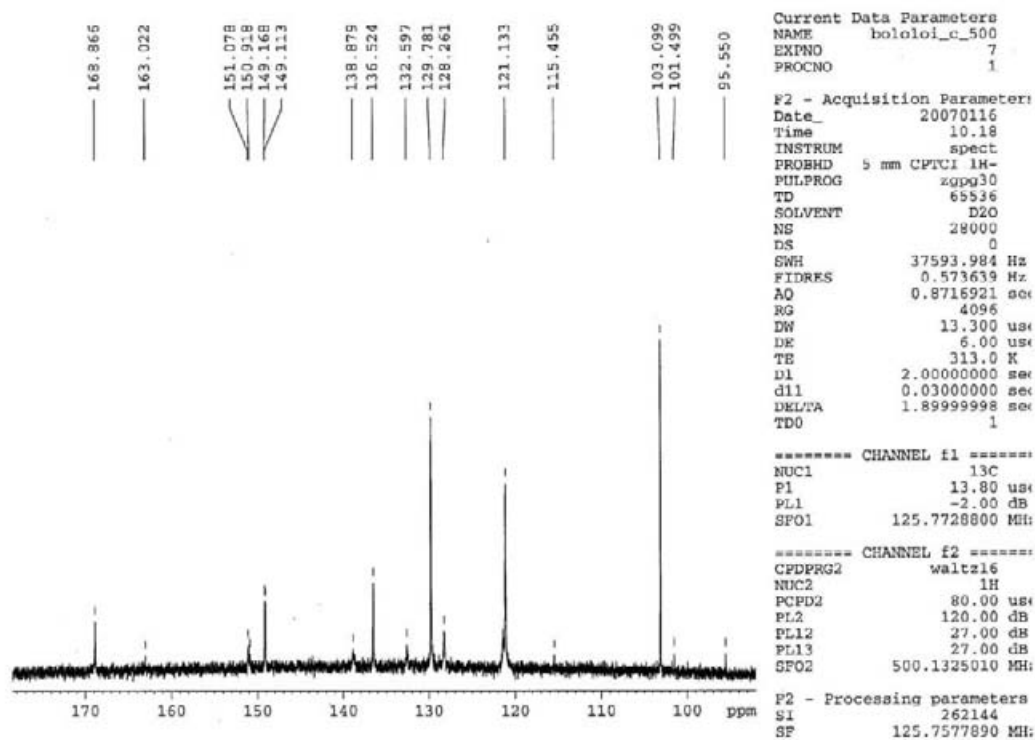
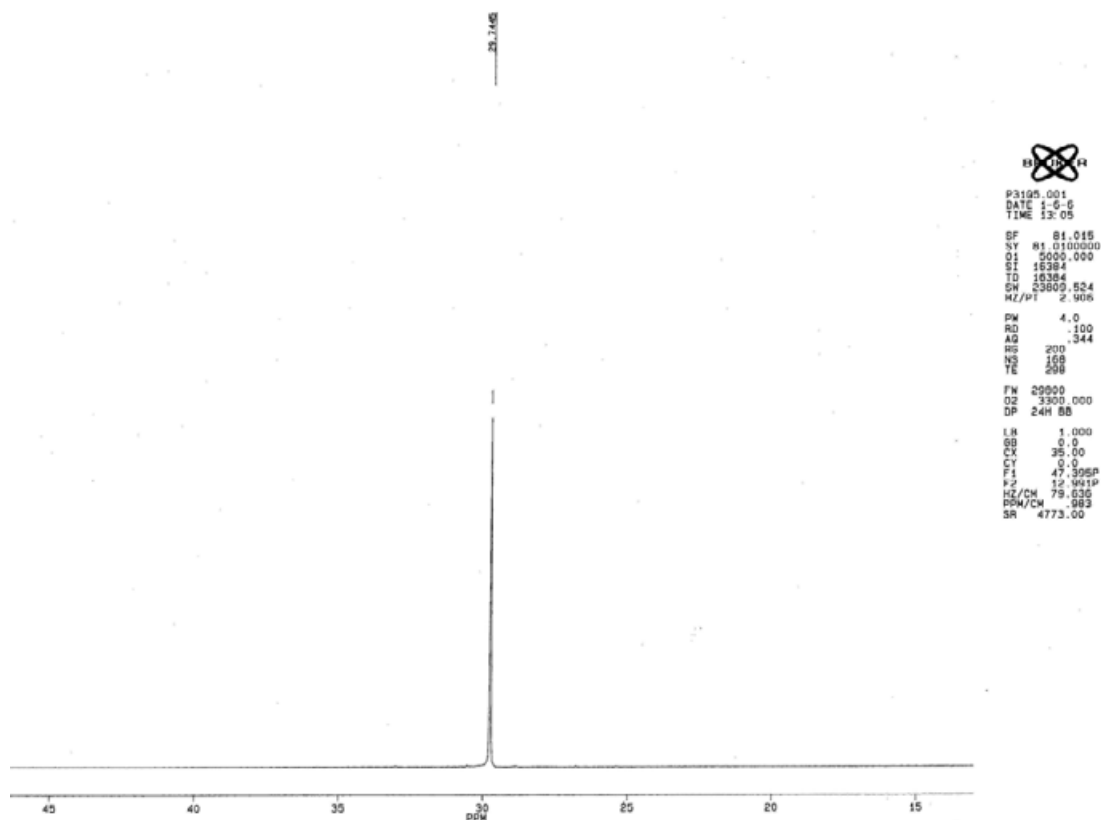
Composé 4d-G1 RMN ^1H Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

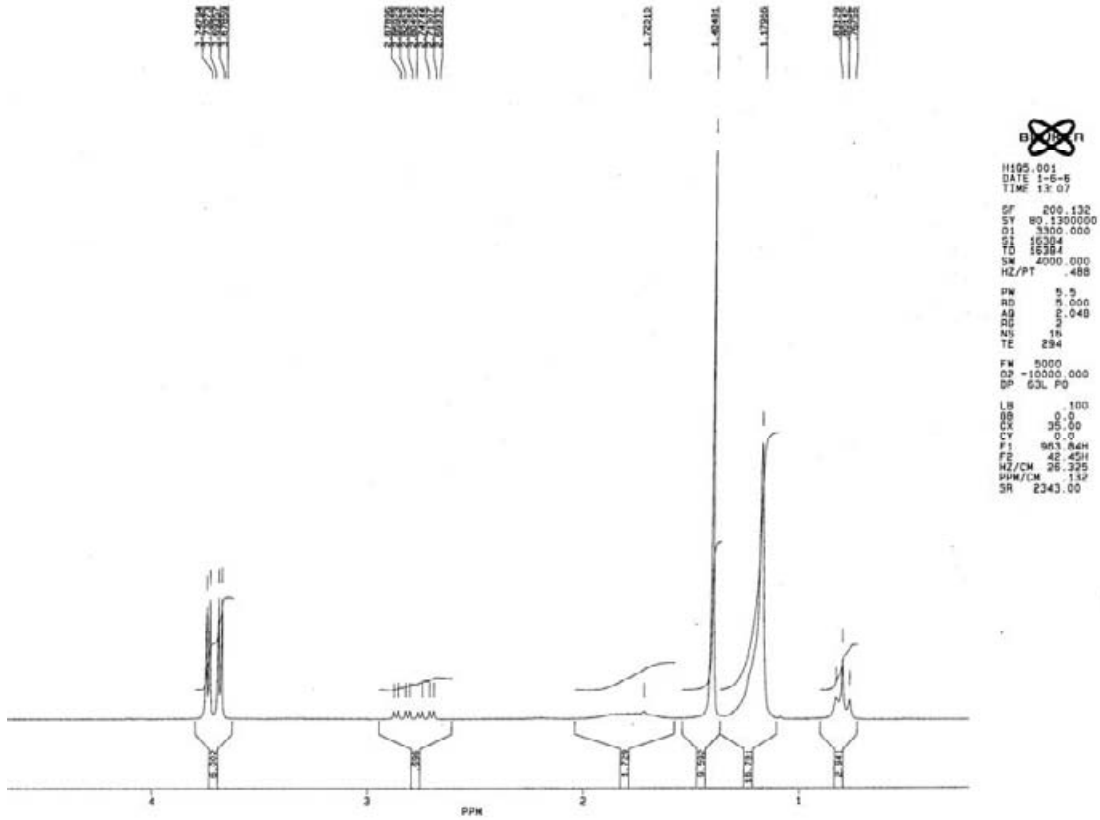


Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

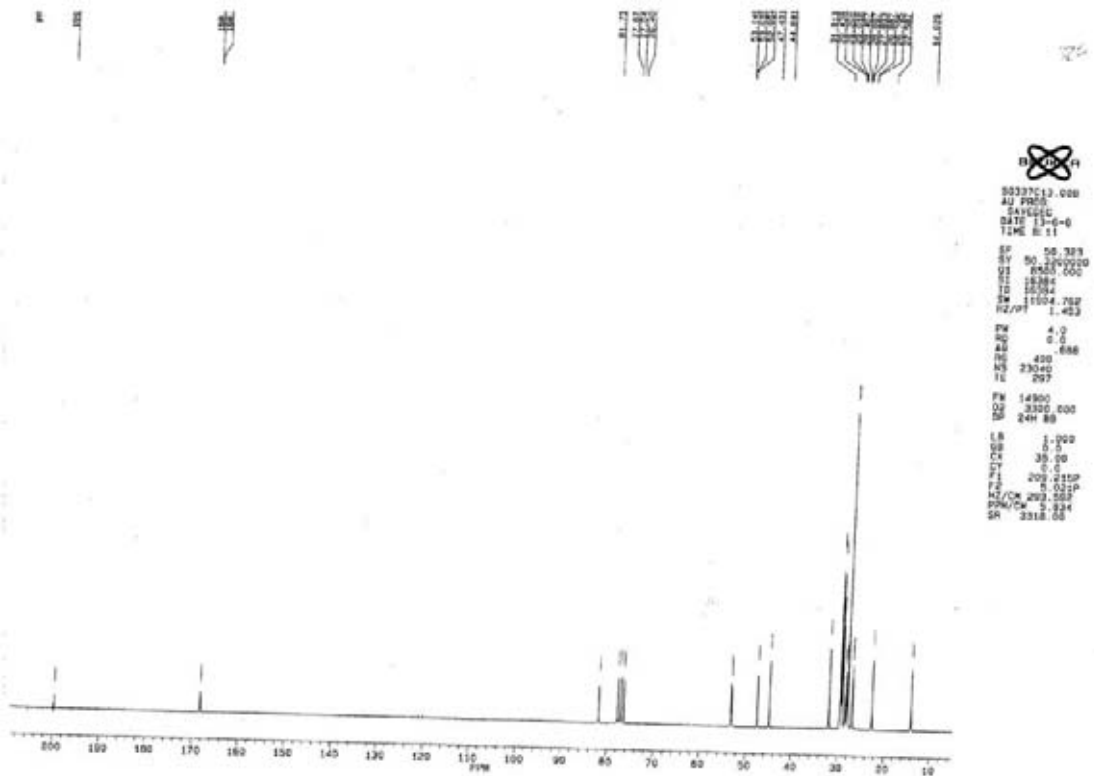


Composé 4d-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Composé 10 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ 

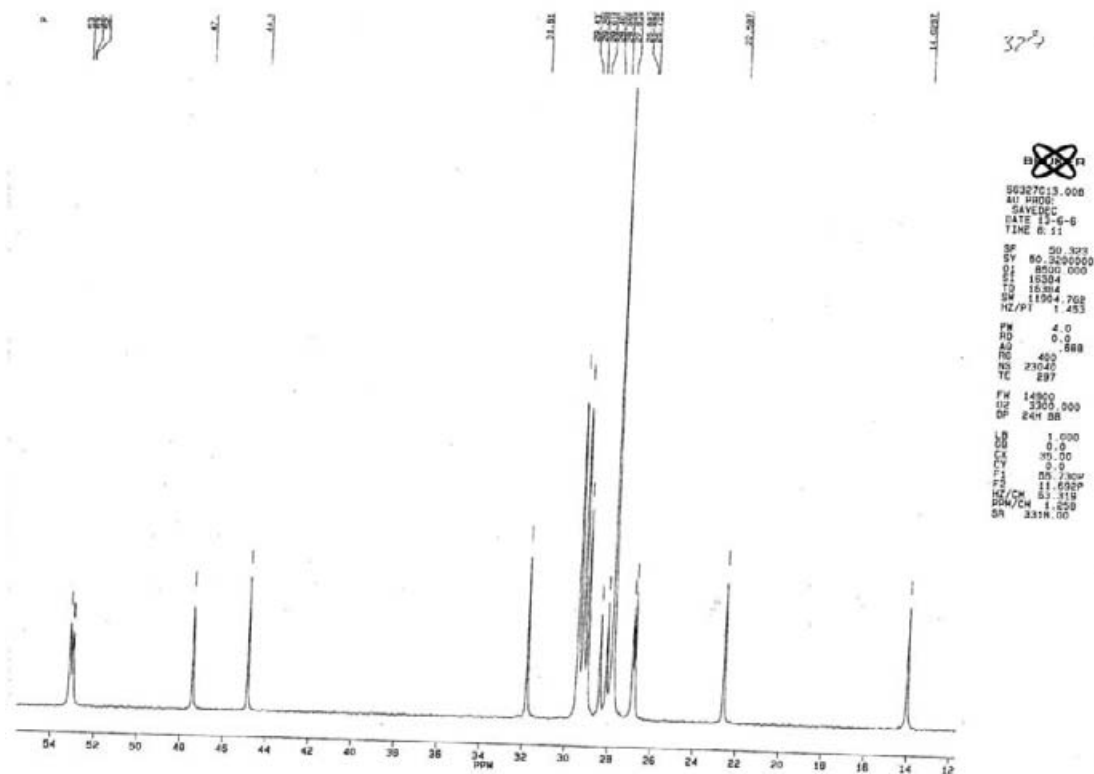
Composé 10 RMN ^1H



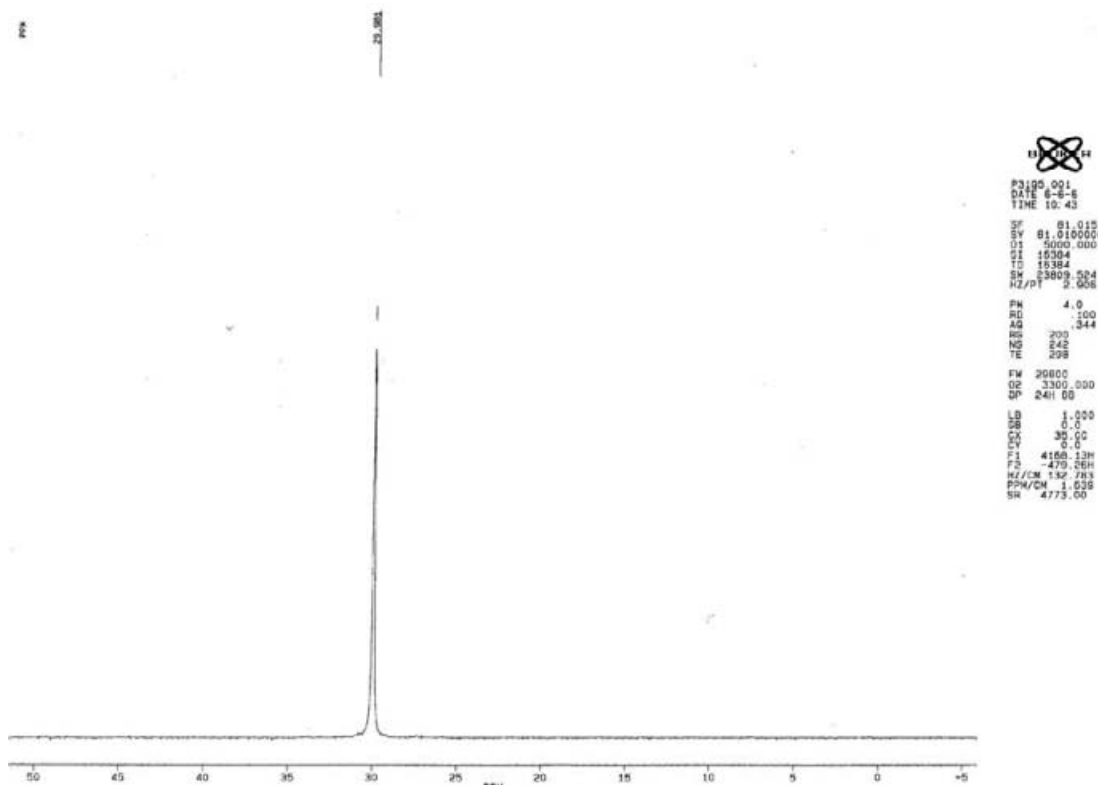
Composé 10 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



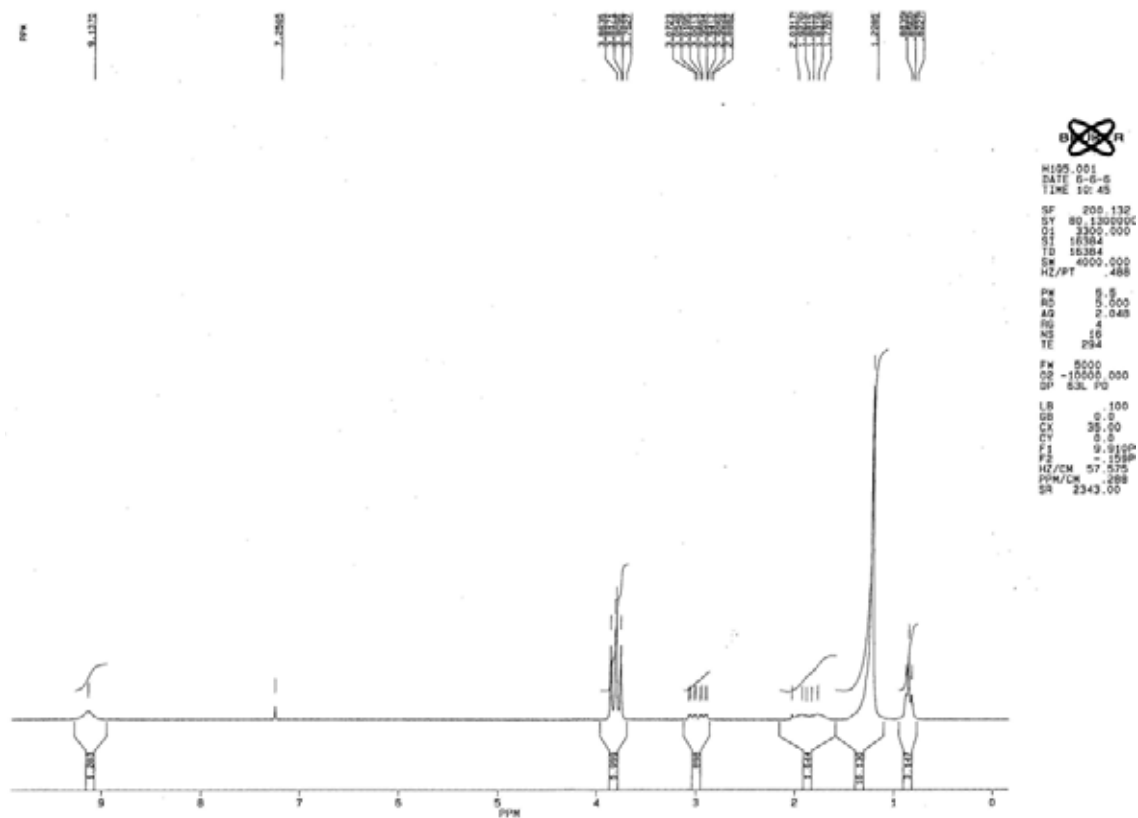
Composé 10 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



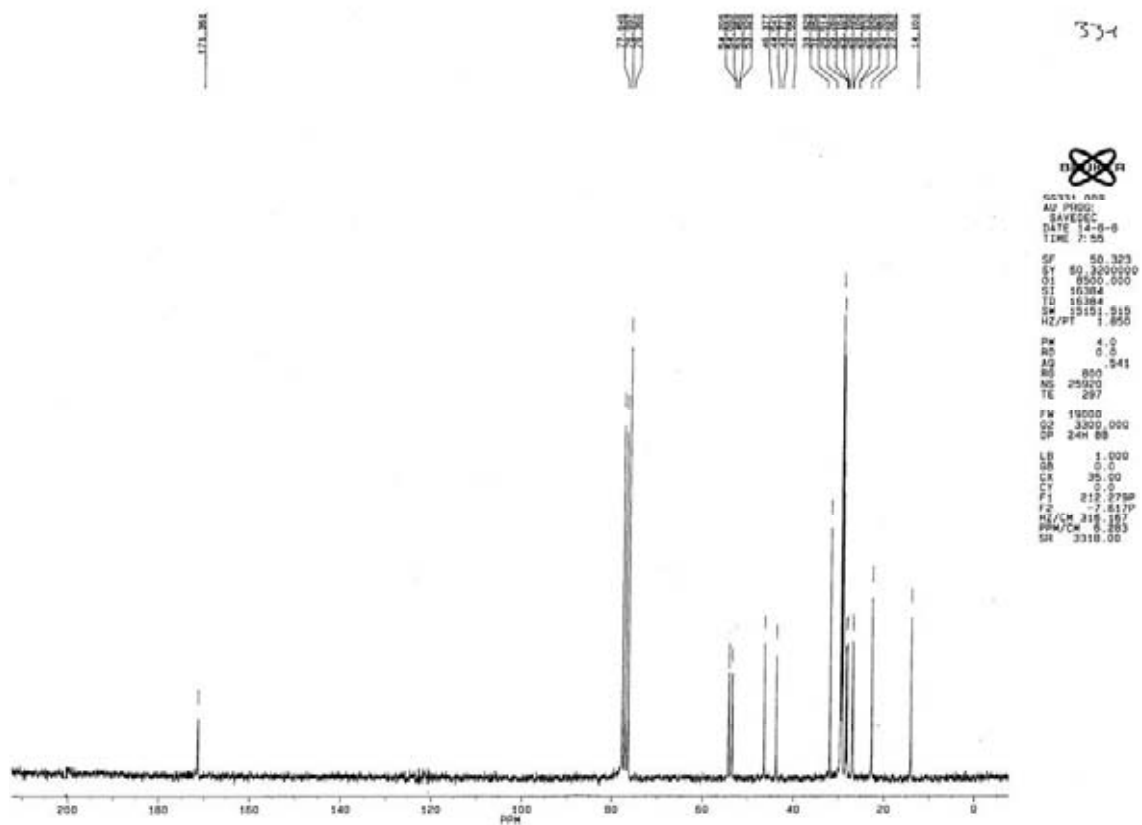
Composé 8 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

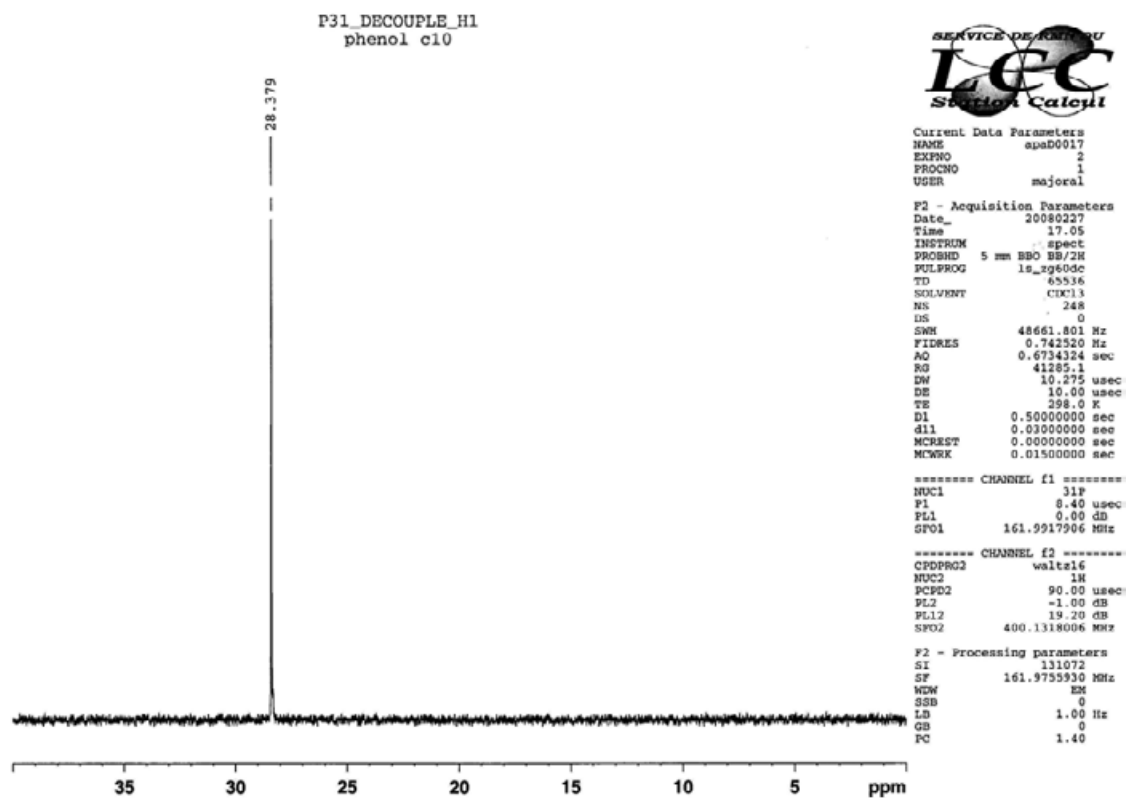
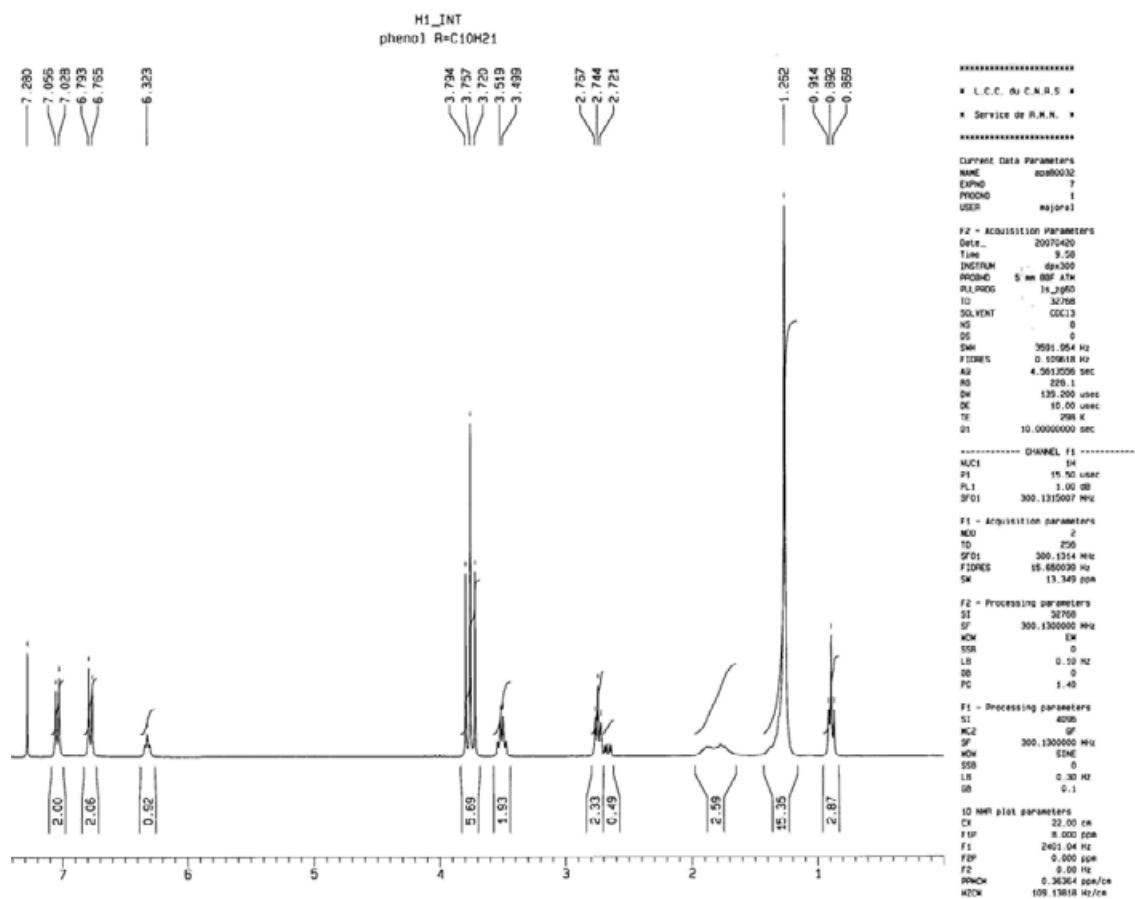


Composé 8 RMN ¹H

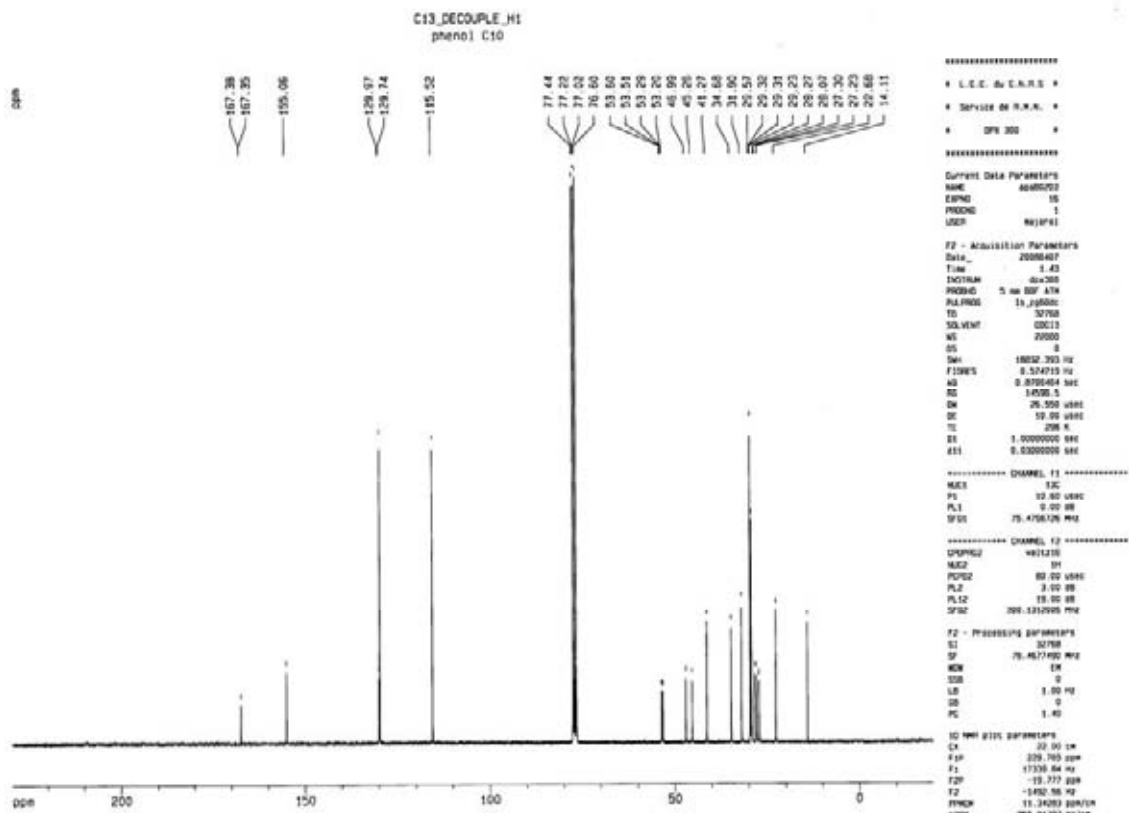


Composé 8 RMN ¹³C{¹H}

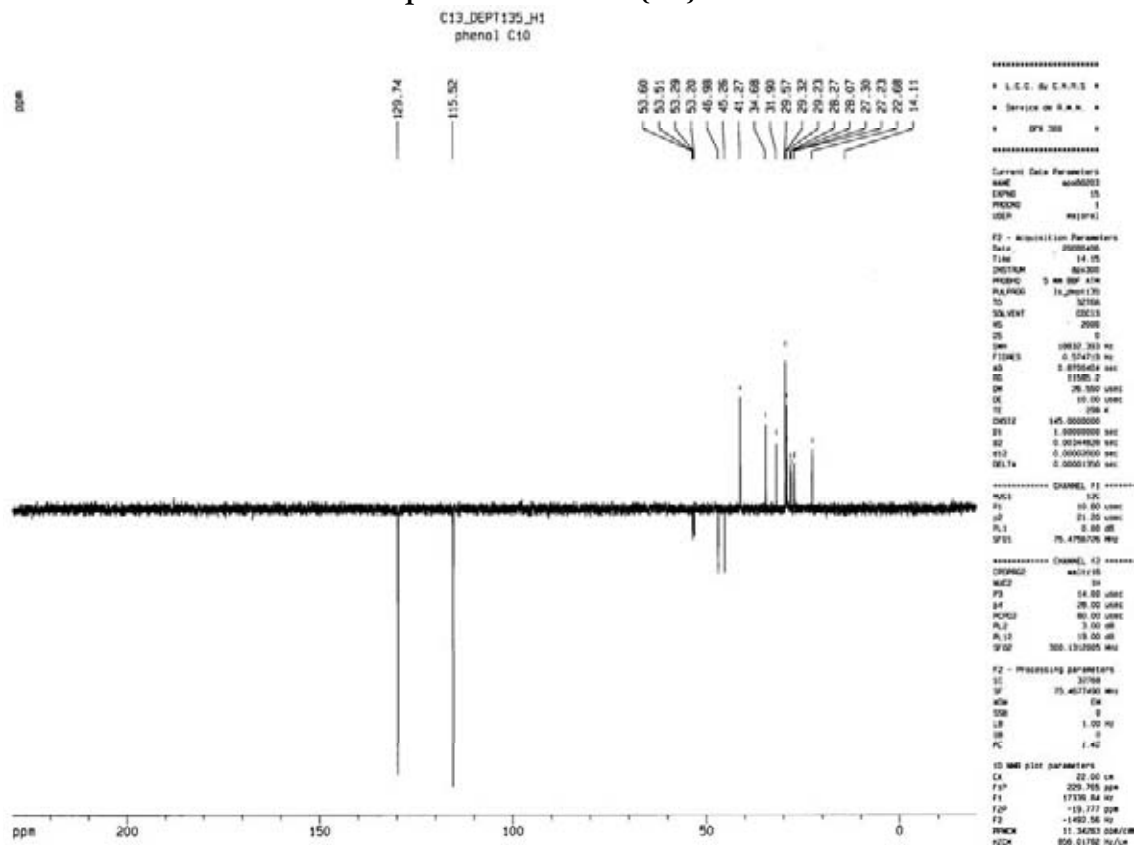


Composé 5a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Composé 5a RMN ^1H 

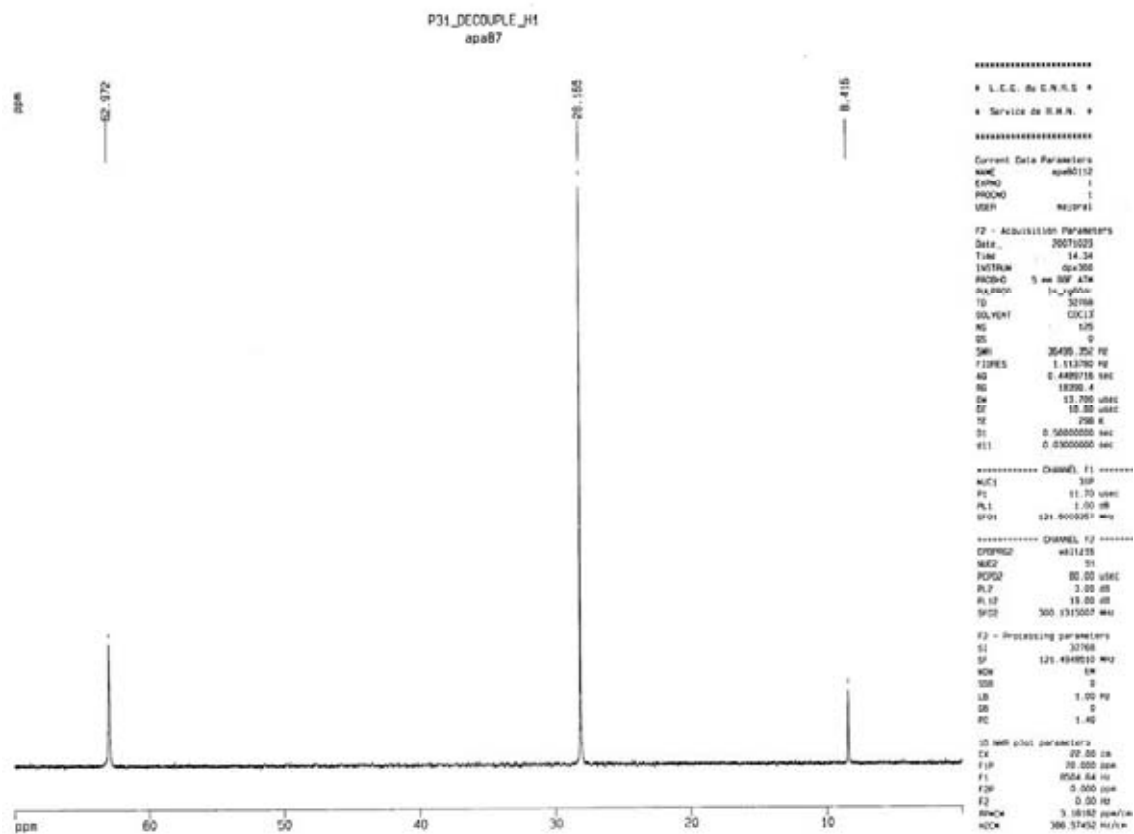
Composé 5a RMN ¹³C{¹H}



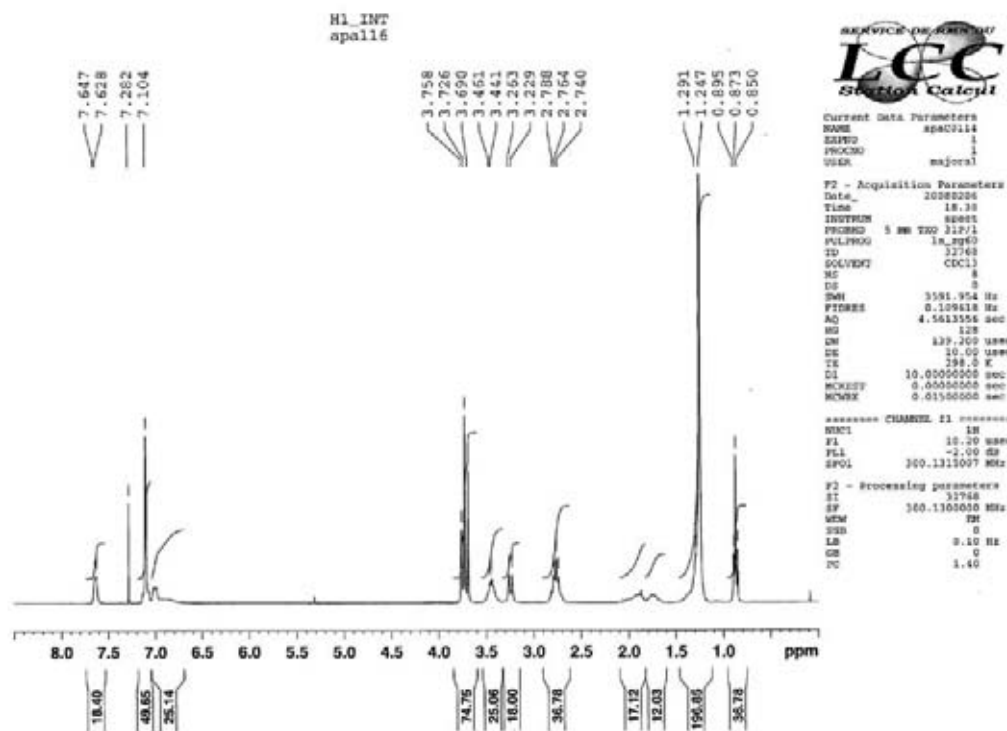
Composé 5a RMN ¹³C{¹H} DEPT

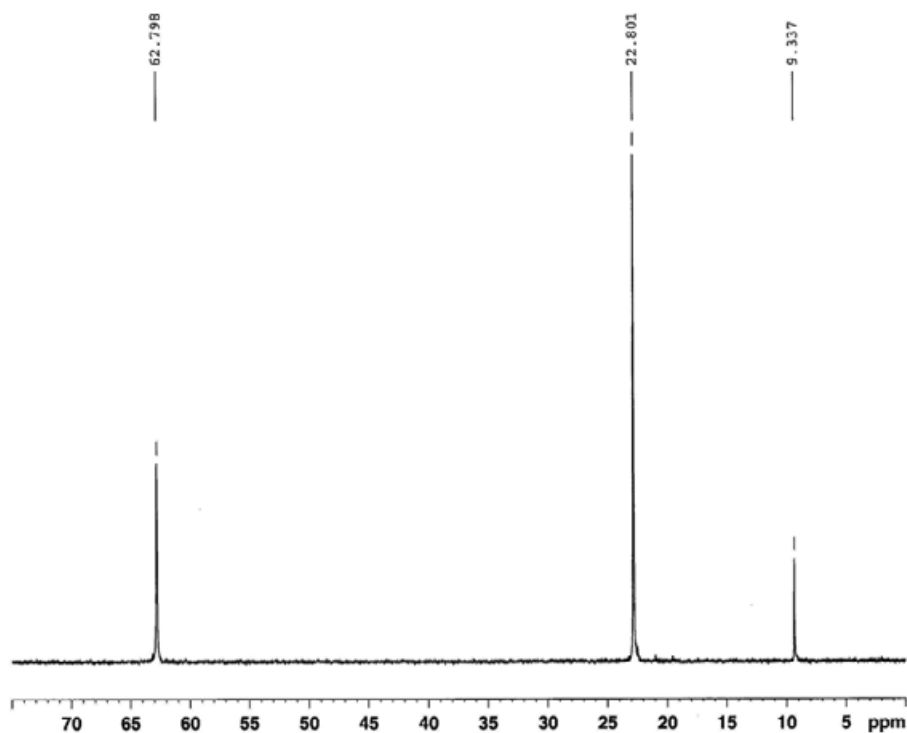


Composé 5a-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



Composé 5a-G1 RMN ^1H



Composé 5b-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ P31_DECOUPLE_H1
apa121

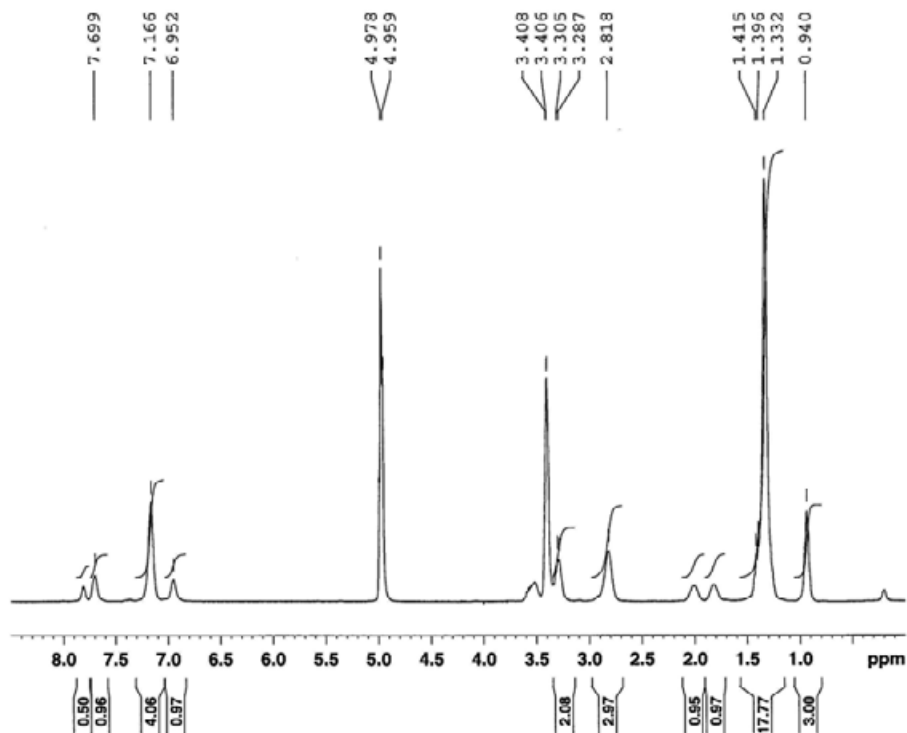
Current Data Parameters
NAME apad0014
EXPRO 3
PROCNO 1
USER majoral

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080218
Time 18.39
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB/2H
PULPROG 1s_zg60dc
TD 65536
SOLVENT meco
NS 654
DS 0
SWH 48661.801 Hz
FIDRES 0.742520 Hz
AQ 0.6734324 sec
RG 41285.1
DW 10.275 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
D1 0.50000000 sec
d11 0.03000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1 ^{31}P
P1 8.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 161.9917906 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPOPRG2 waltz16
NUC2 ^1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 -1.00 dB
PL12 19.20 dB
SFO2 400.1318006 MHz

F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 161.9755930 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Composé 5b-G1 RMN ^1H H1_INT
apa121

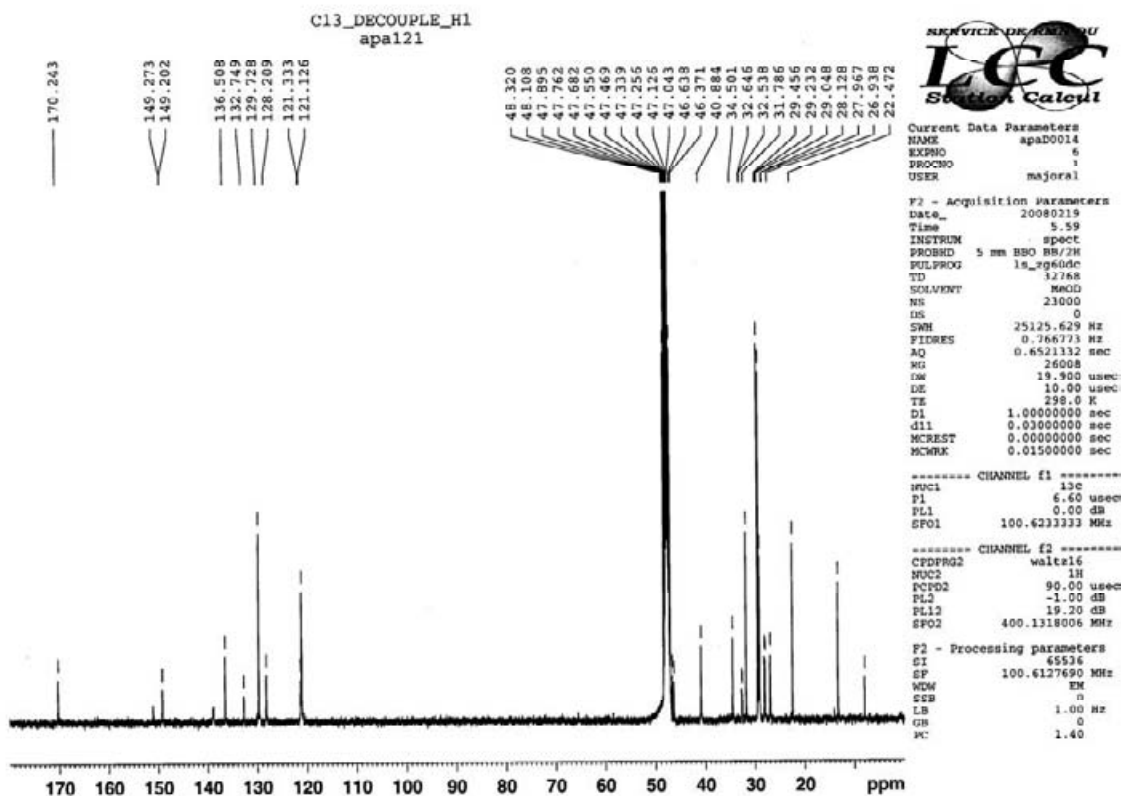
Current Data Parameters
NAME apad0014
EXPRO 4
PROCNO 1
USER majoral

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080218
Time 18.56
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB/2H
PULPROG 1s_zg60
TD 32768
SOLVENT meco
NS 8
DS 0
SWH 4789.272 Hz
FIDRES 0.146157 Hz
AQ 3.4210291 sec
RG 161.3
DW 104.400 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
D1 10.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

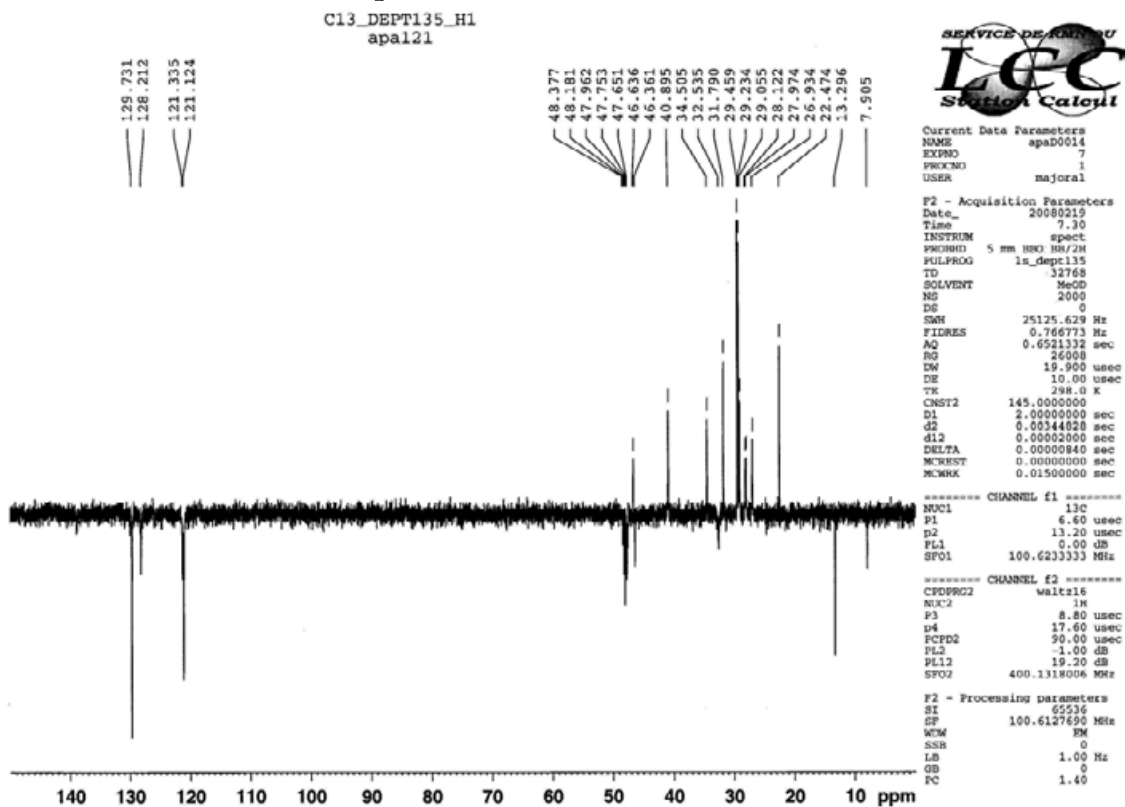
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 ^1H
P1 8.80 usec
PL1 -1.00 dB
SFO1 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.40

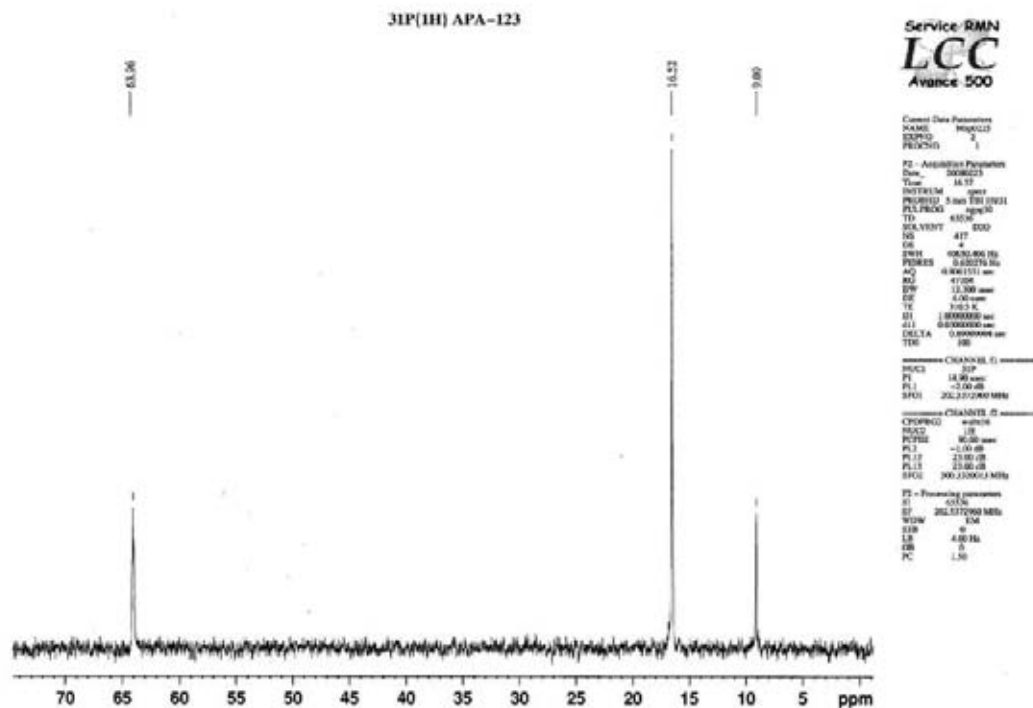
Composé 5b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



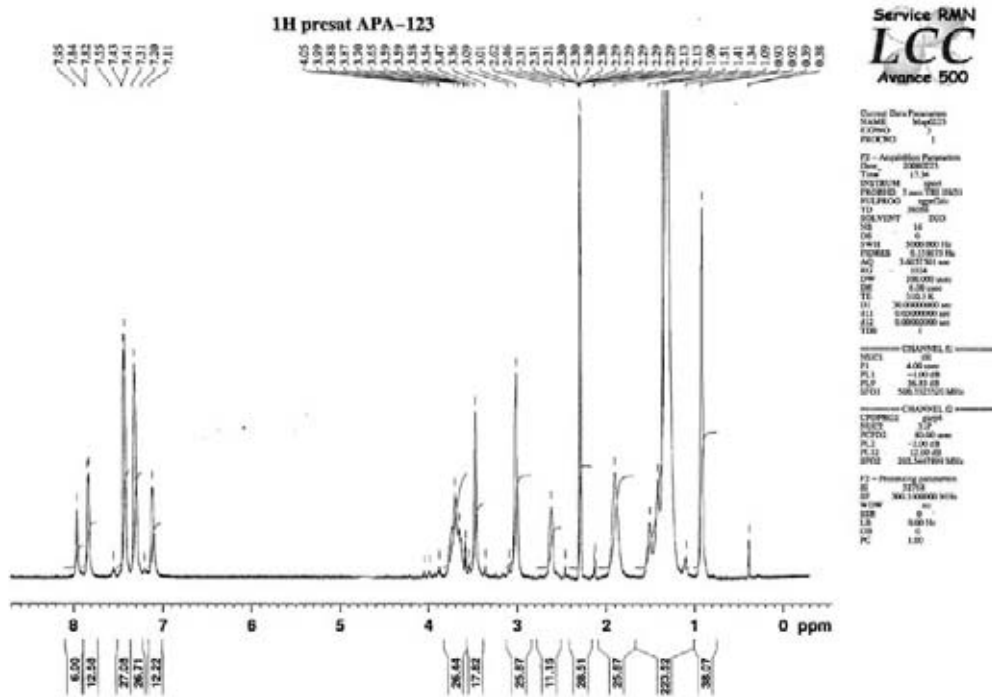
Composé 5b-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT



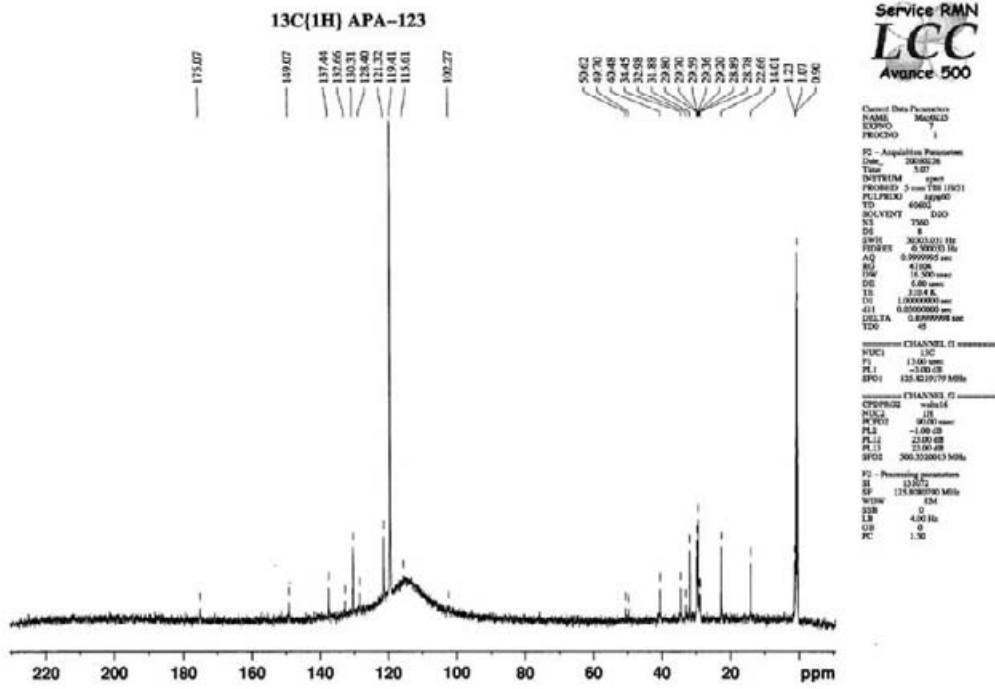
Composé 5c-G1 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



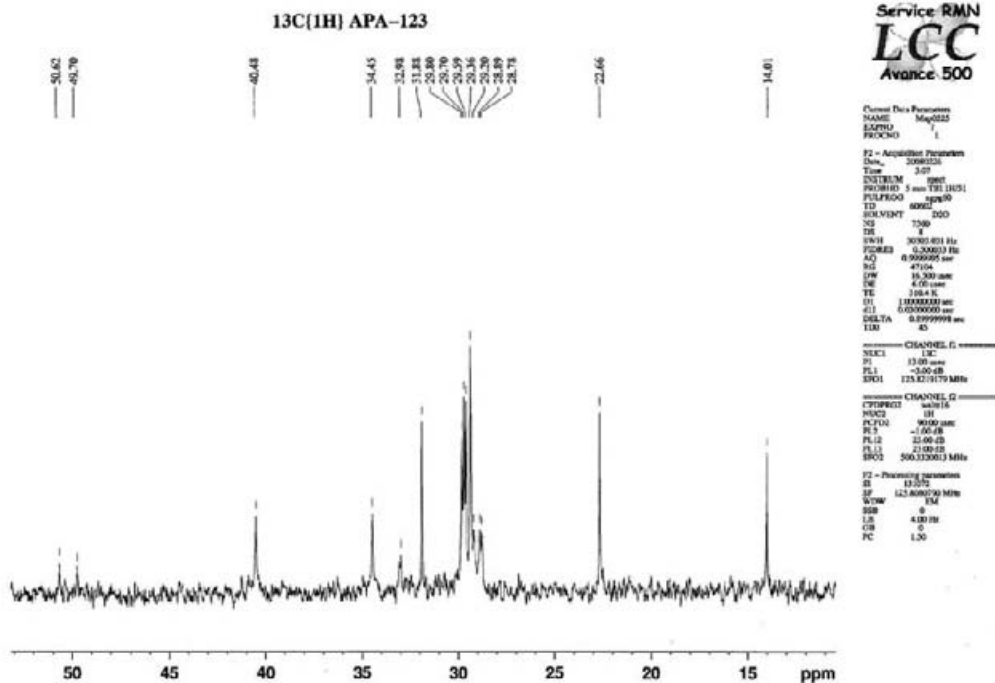
Composé 5c-G1 RMN ^1H

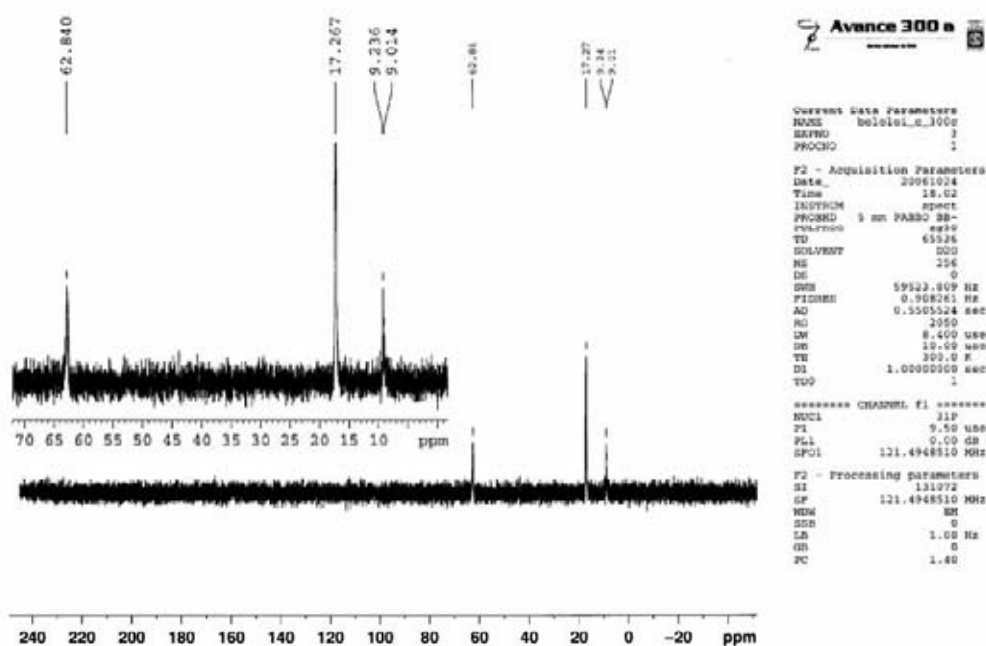
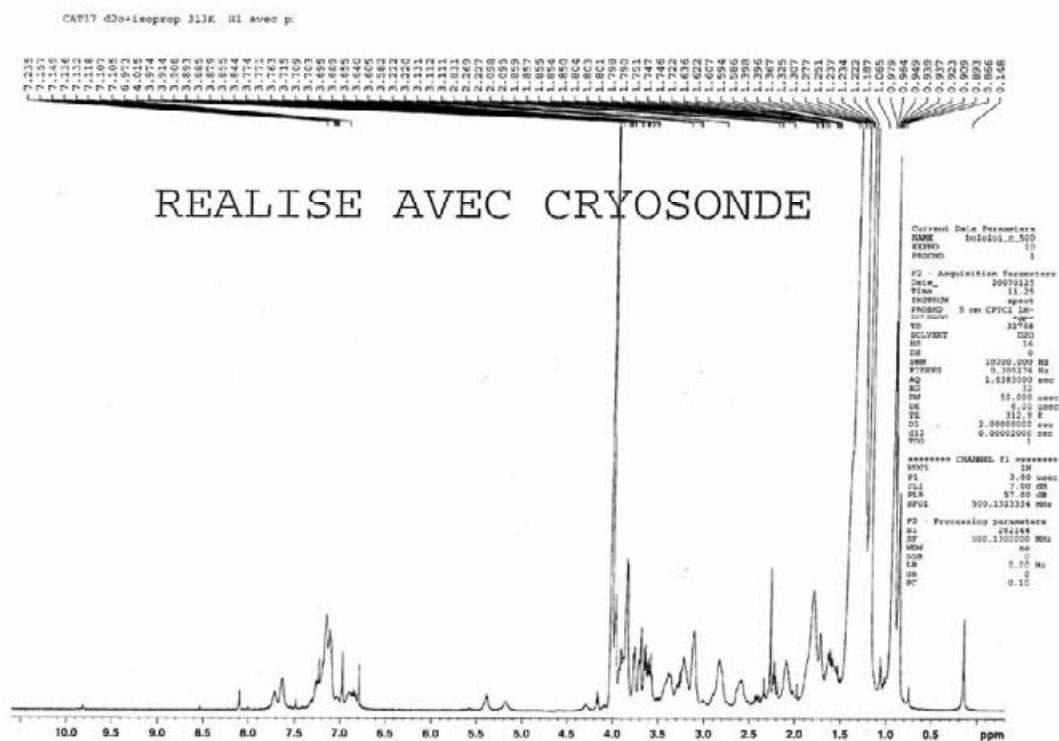


Composé 5c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

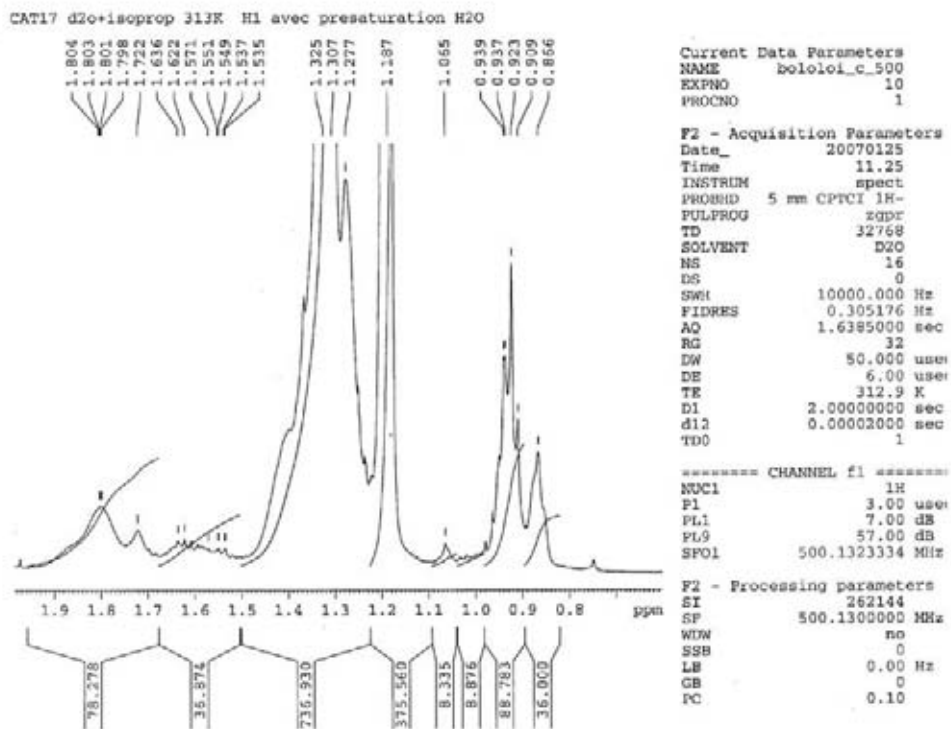


Composé 5c-G1 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

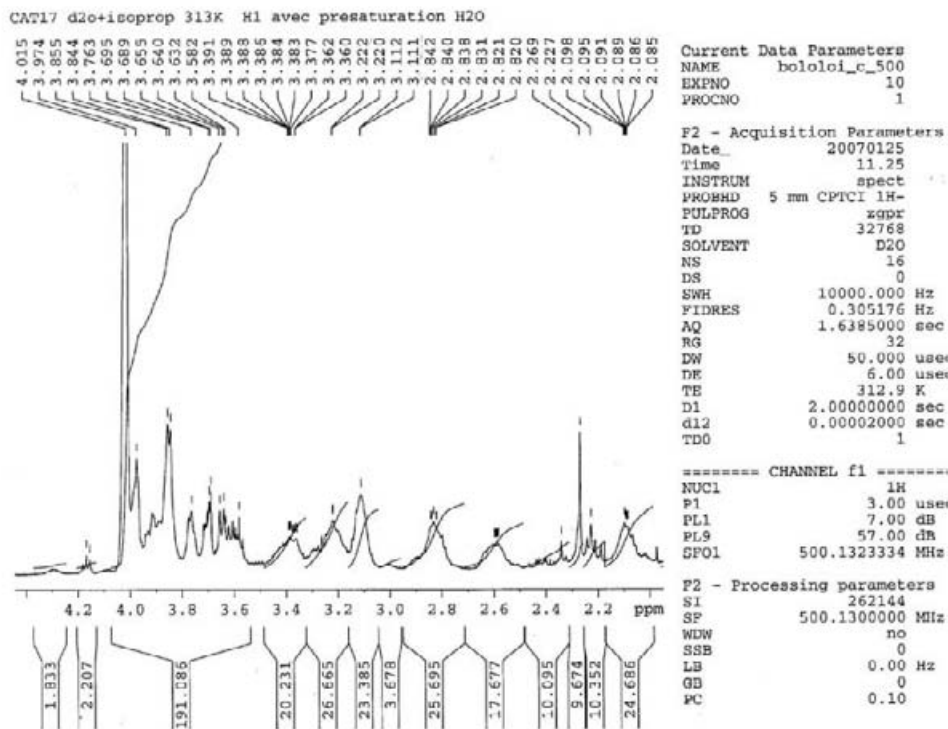


Composé 5d-G1 RMN ³¹P{¹H}Composé 5d-G1 RMN ¹H

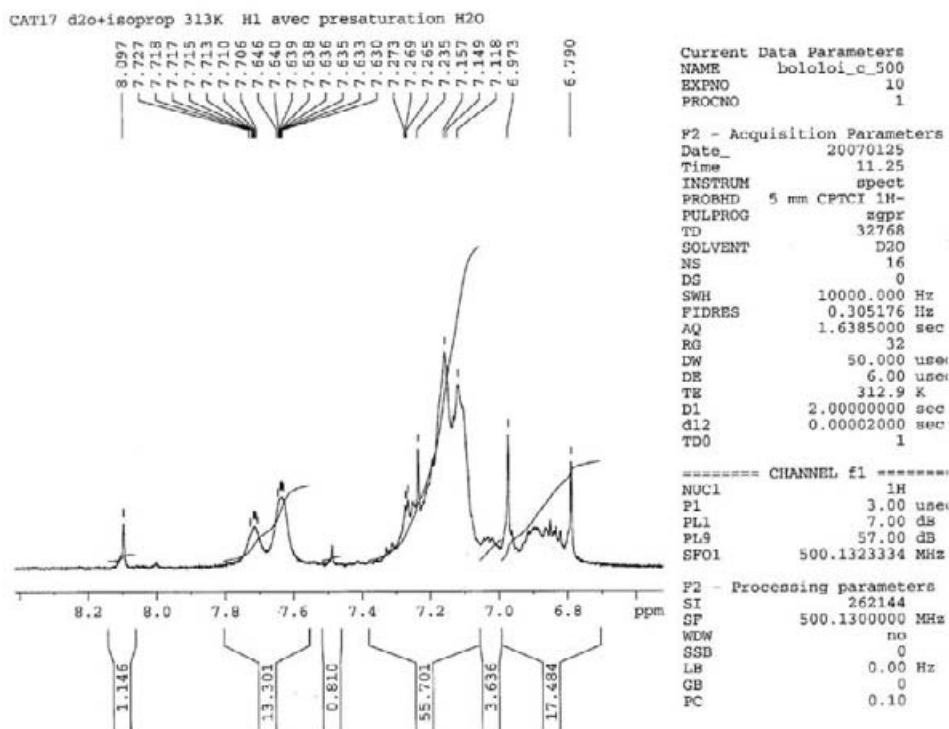
Composé 5d-G1 RMN ¹H



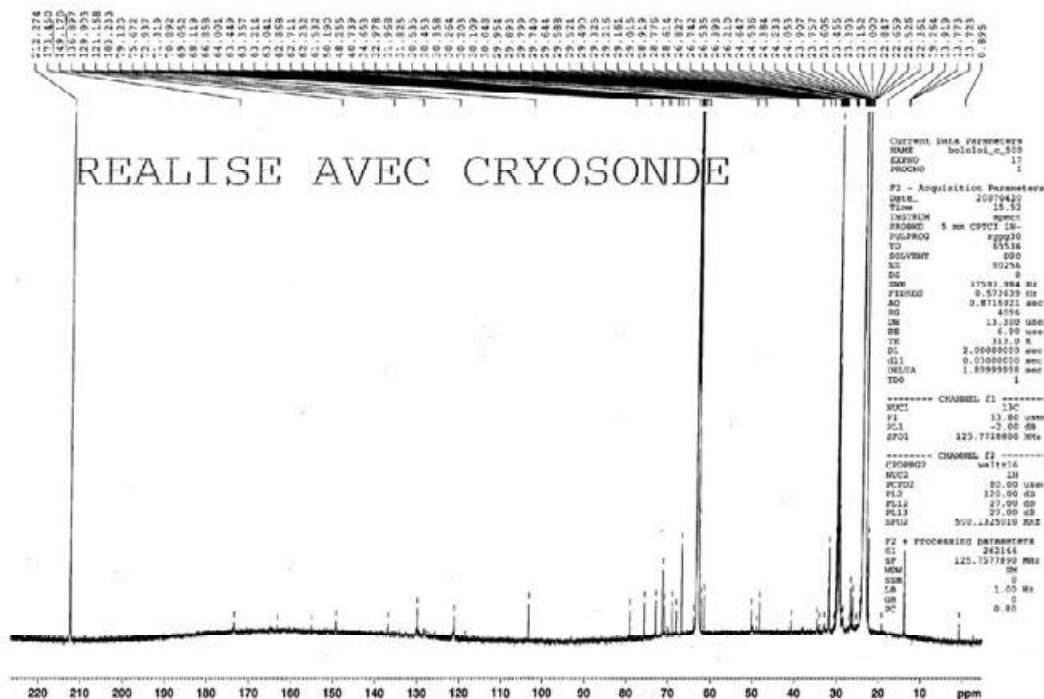
Composé 5d-G1 RMN ¹H



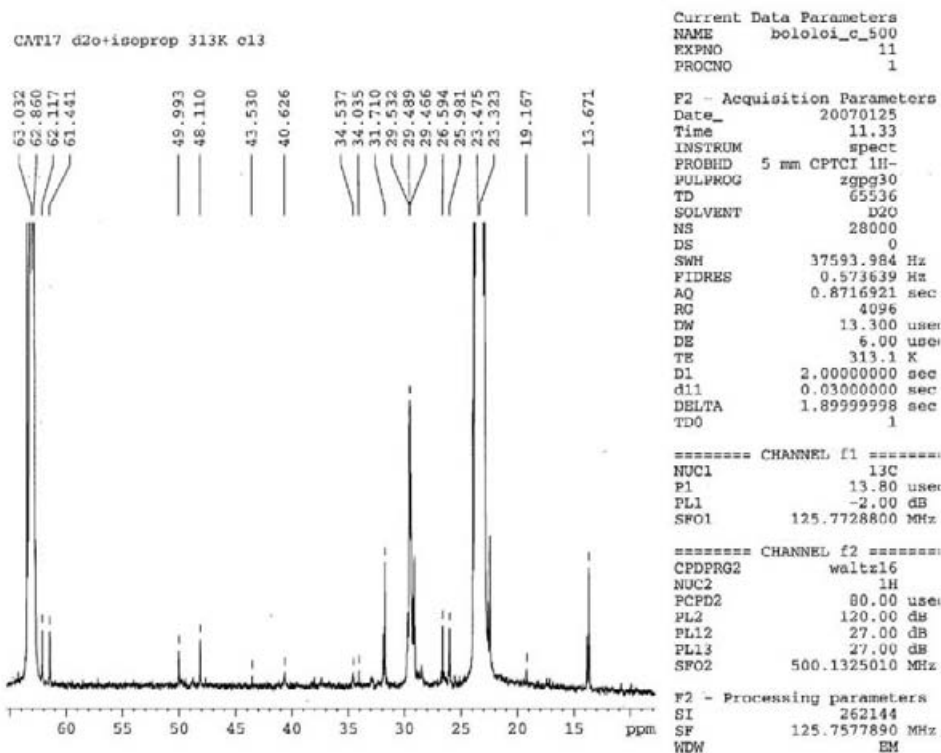
Composé 5d-G1 RMN ¹H



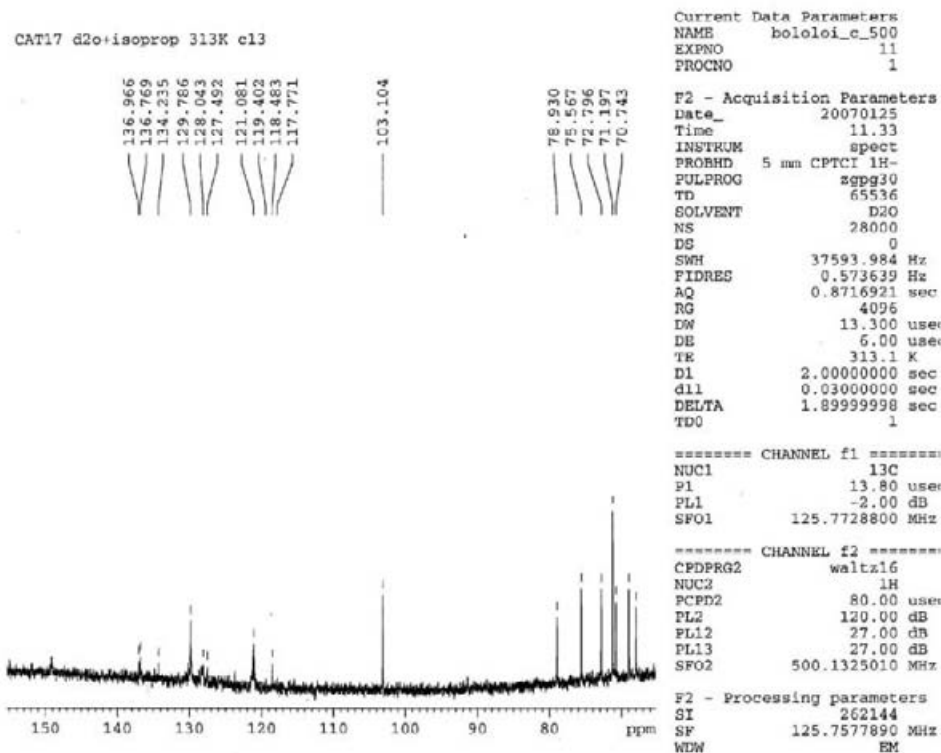
Composé 5d-G1 RMN ¹³C{¹H}

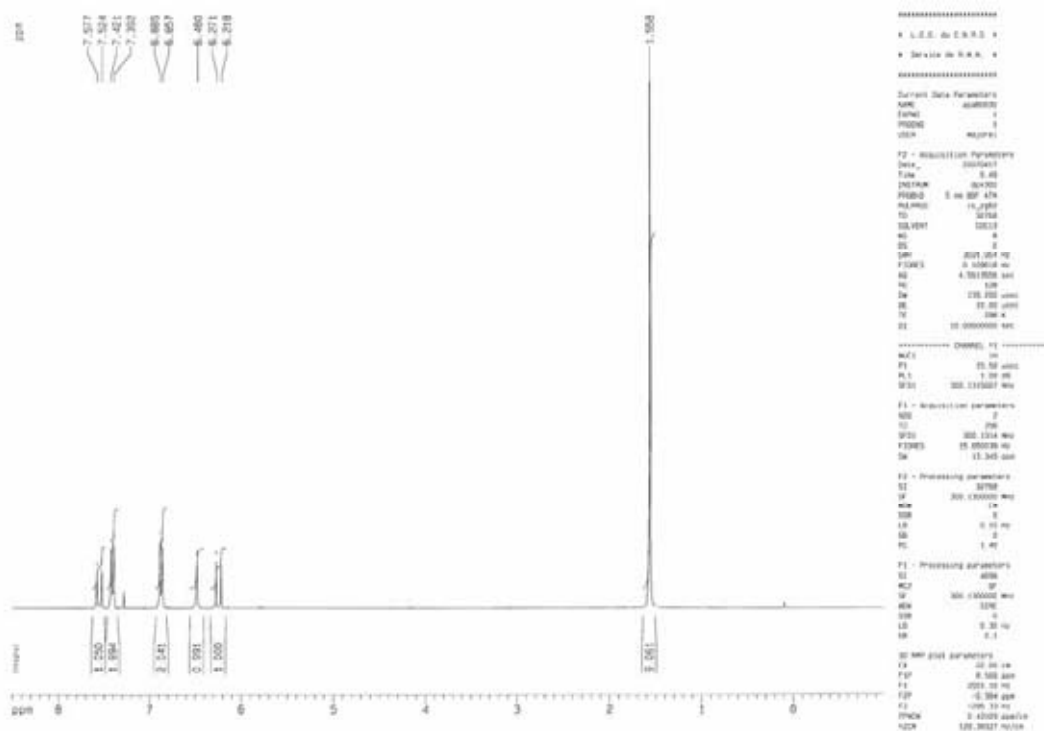
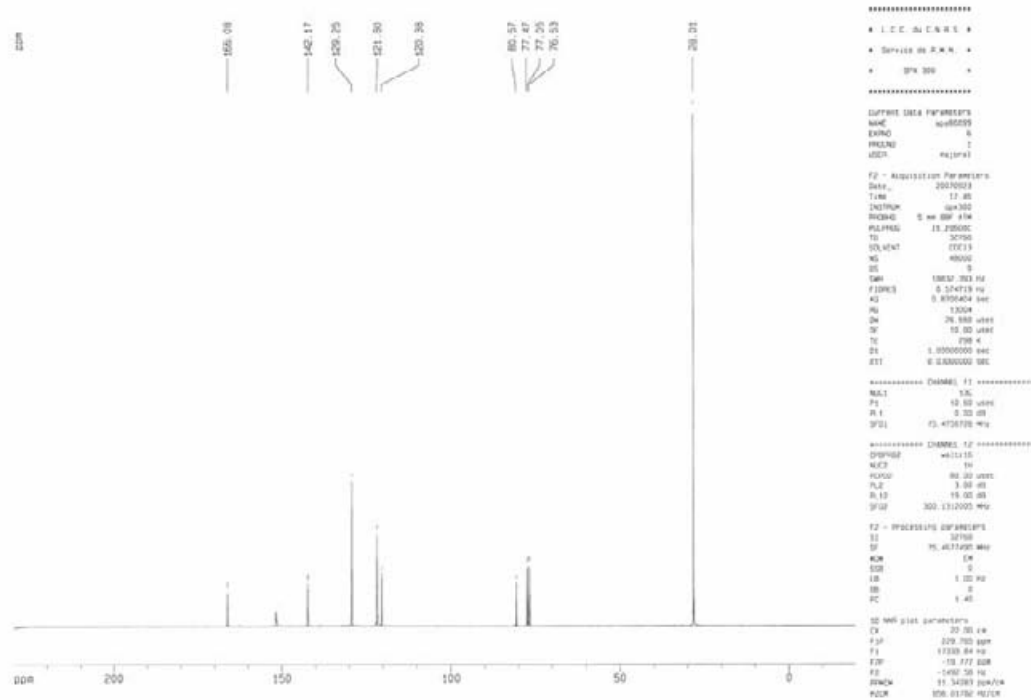


Composé 5d-G1 RMN ¹³C{¹H}

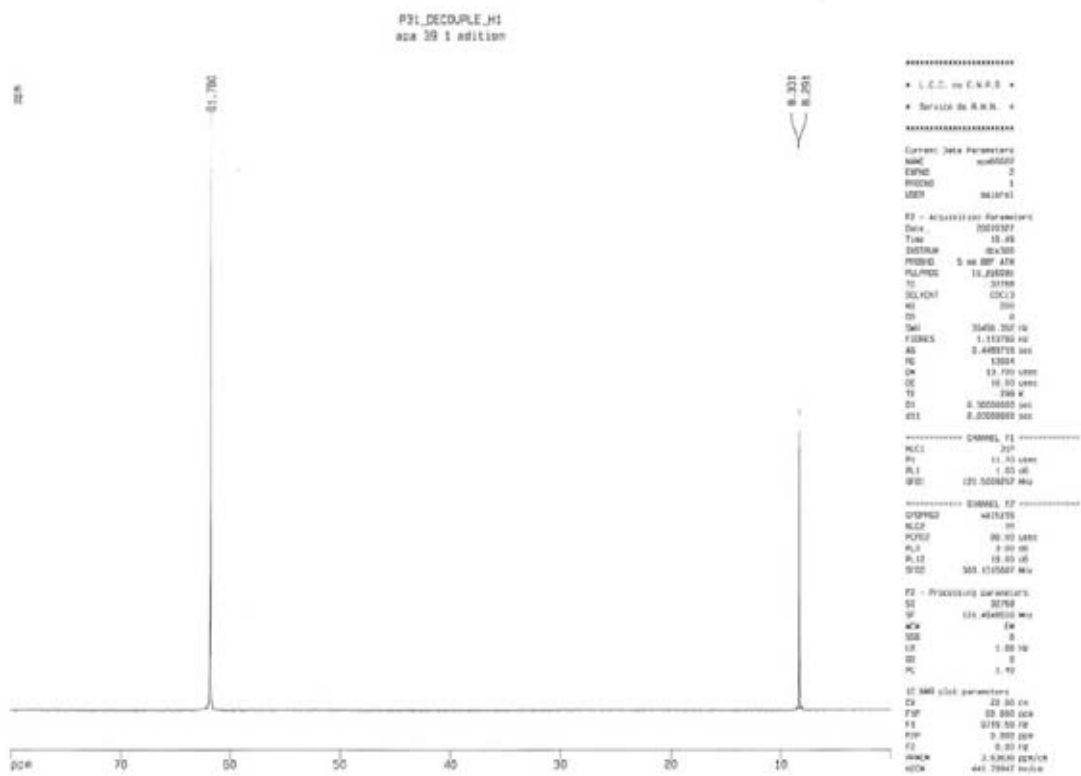


Composé 5d-G1 RMN ¹³C{¹H}

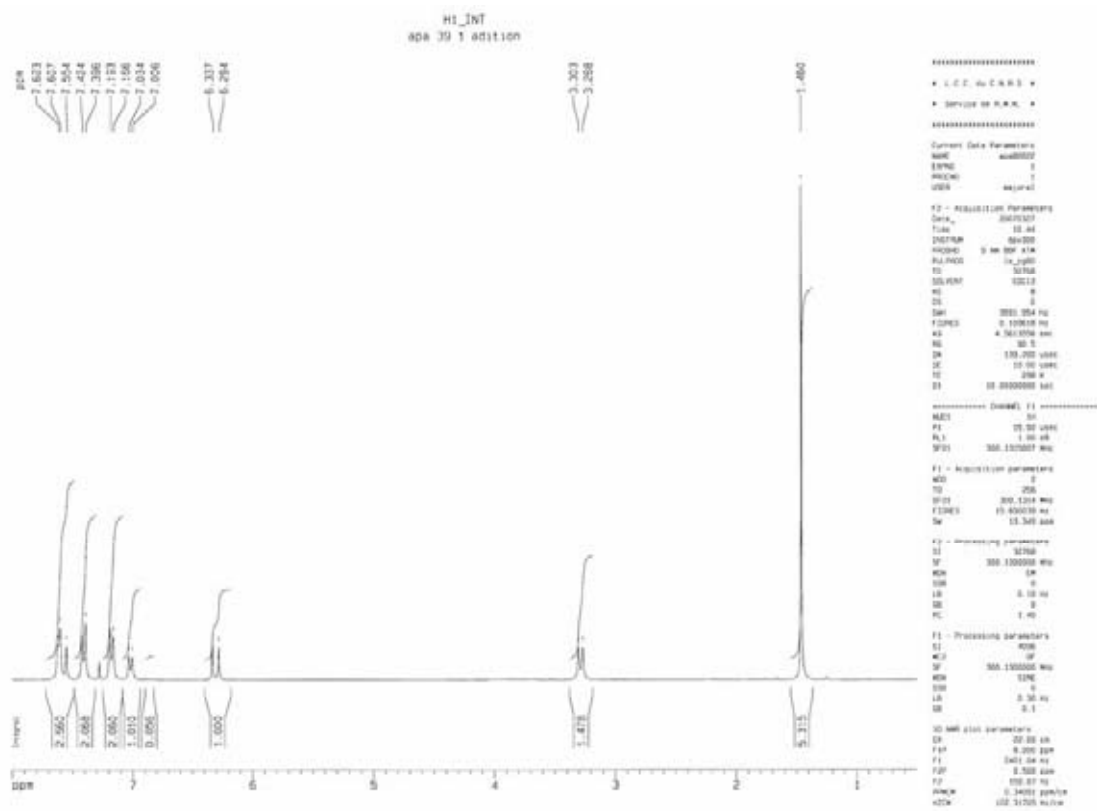


Composé 13 RMN ^1H Composé 13 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

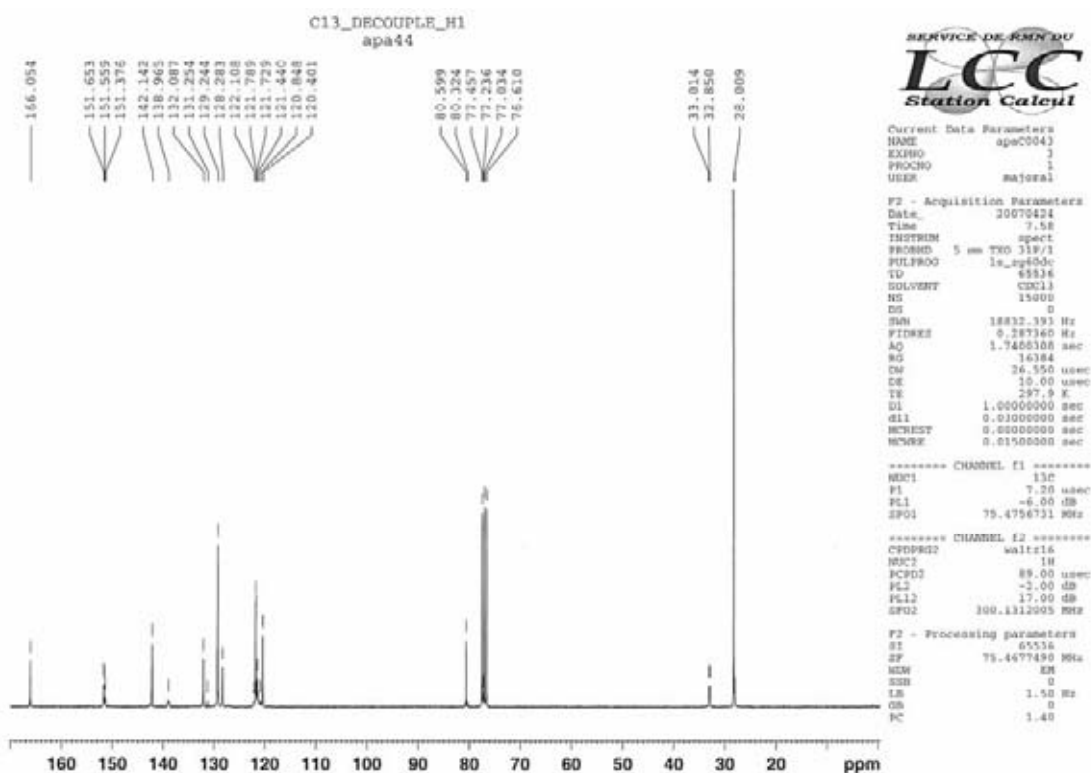
Composé 17 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



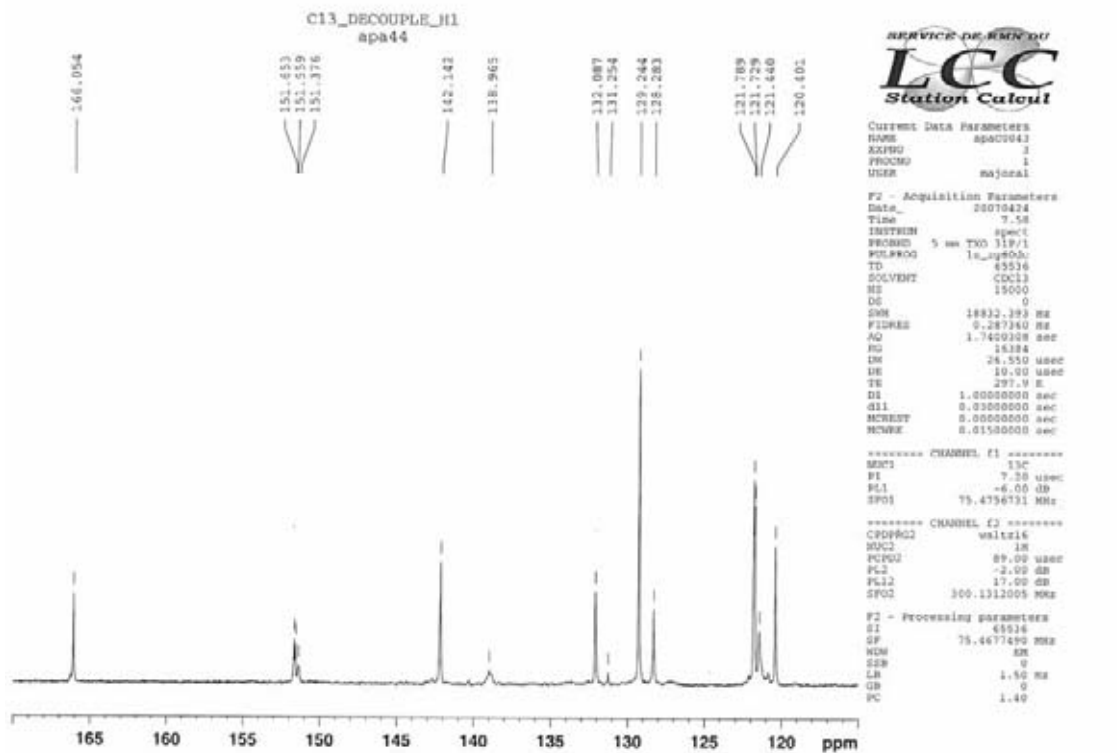
Composé 17 RMN ^1H



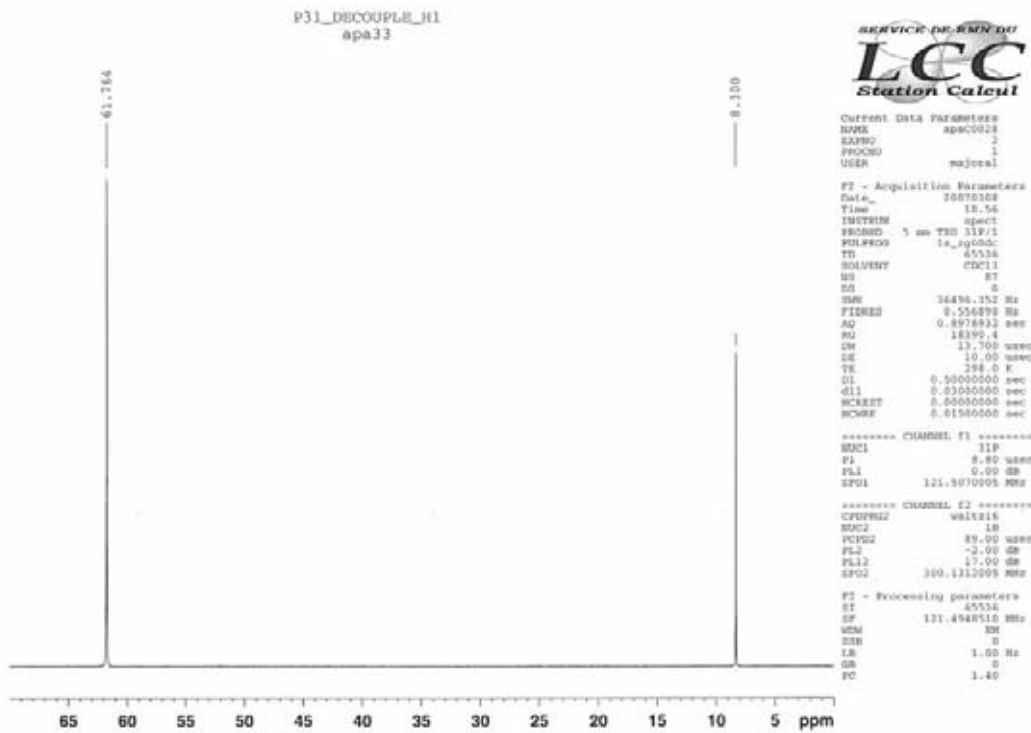
Composé 17 RMN ¹³C{¹H}



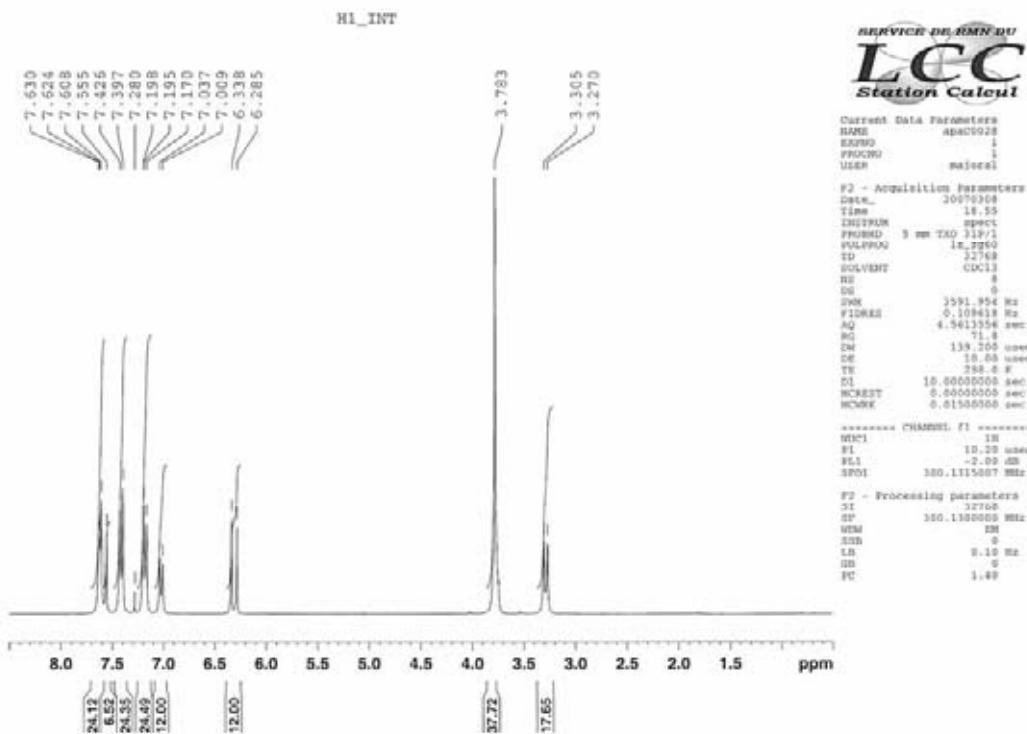
Composé 17 RMN ¹³C{¹H}



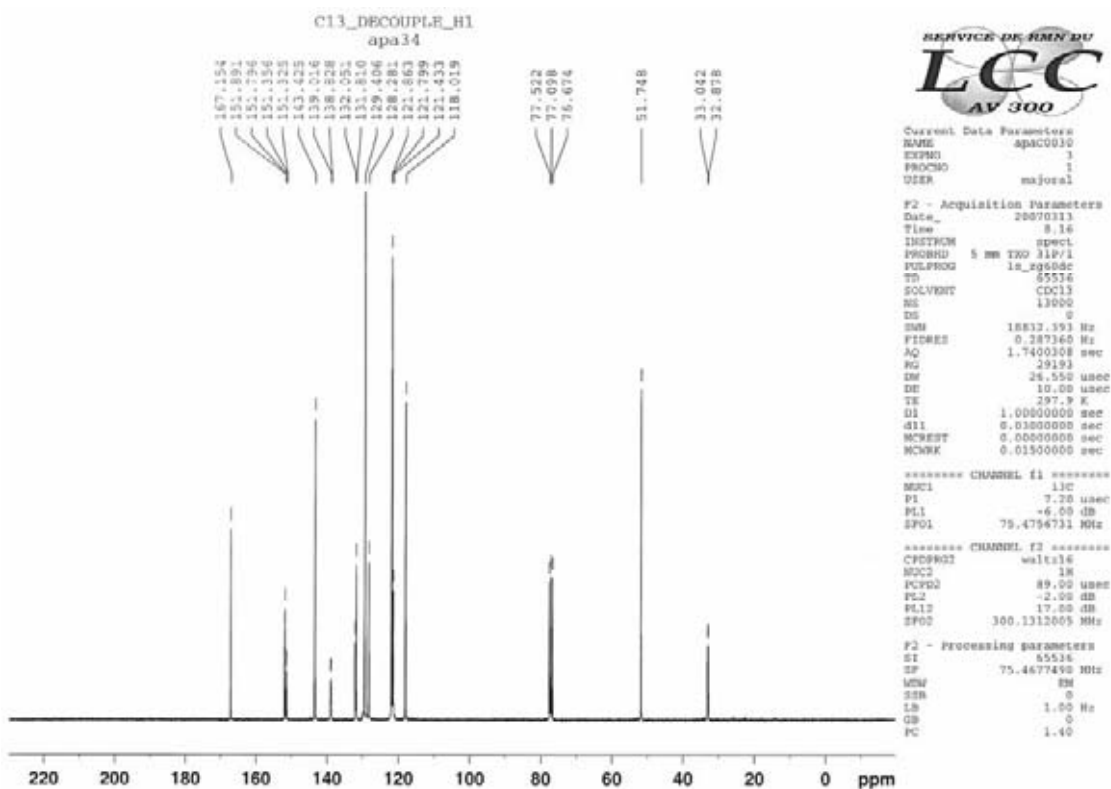
Composé 15 RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



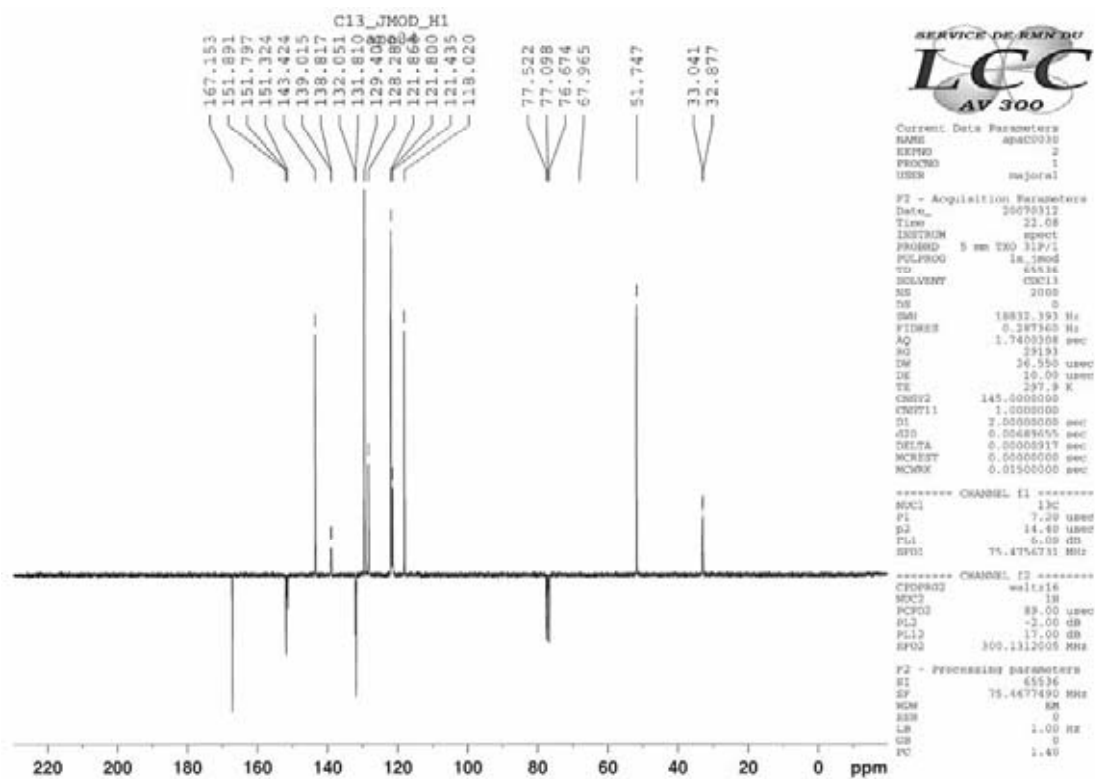
Composé 15 RMN ^1H



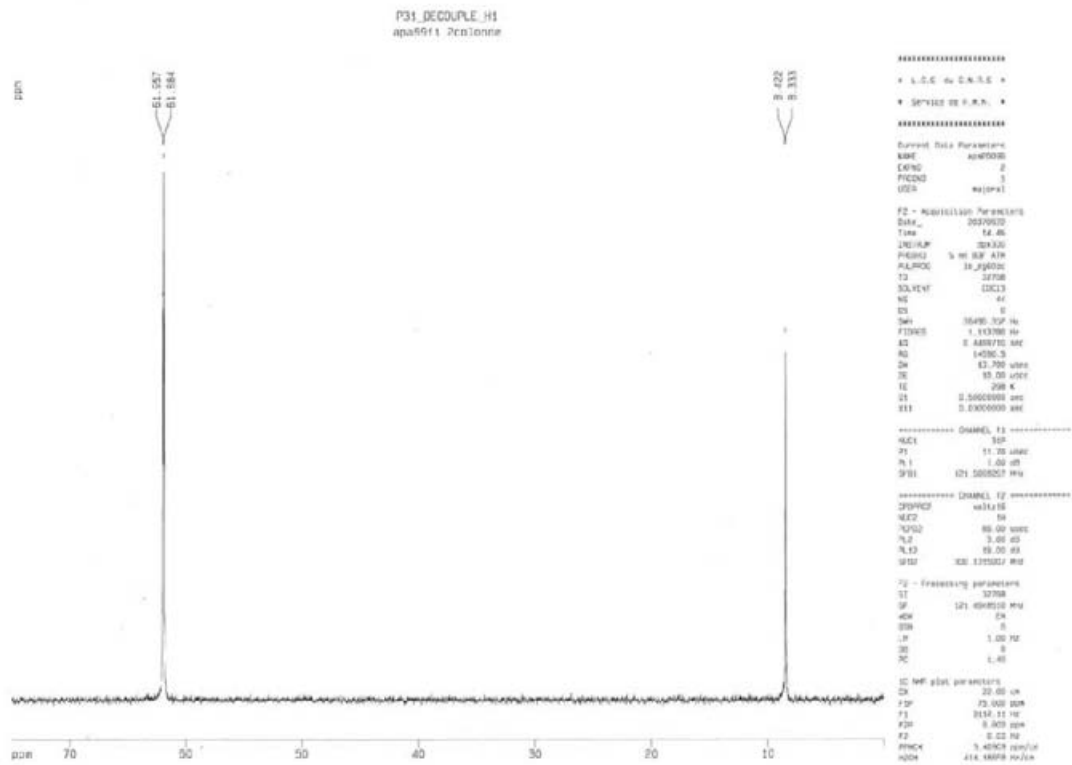
Composé 15 RMN ¹³C{¹H}



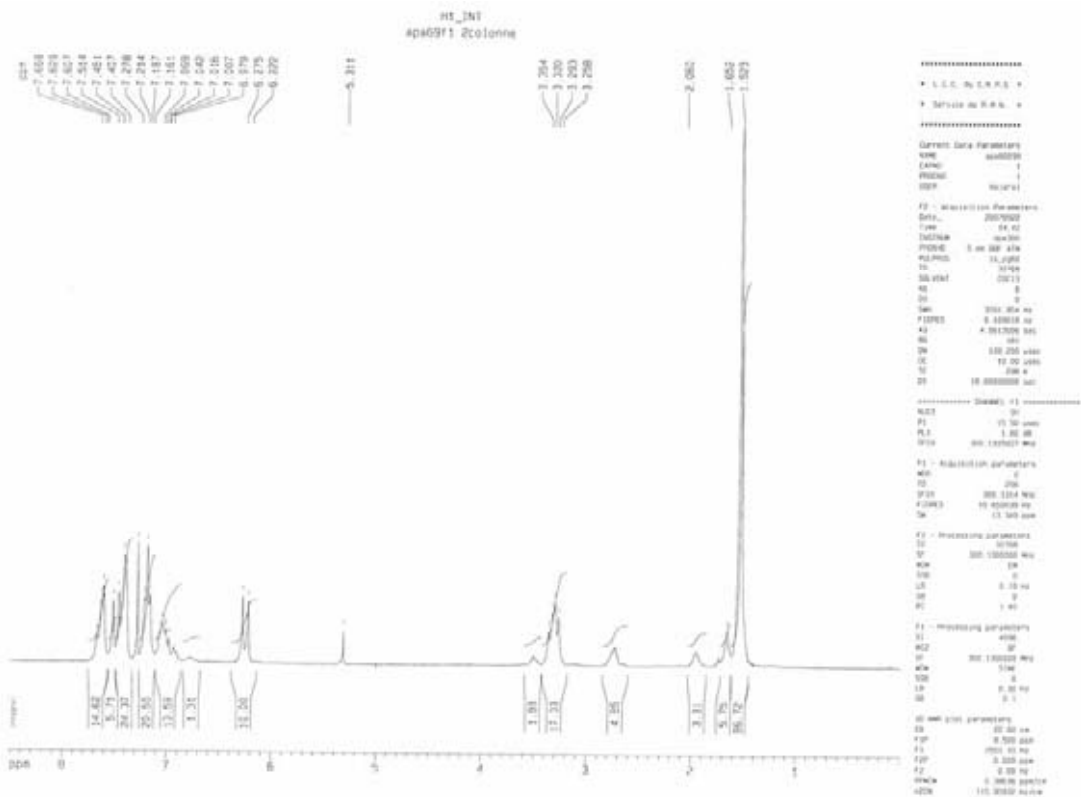
Composé 15 RMN ¹³C{¹H} JMOD



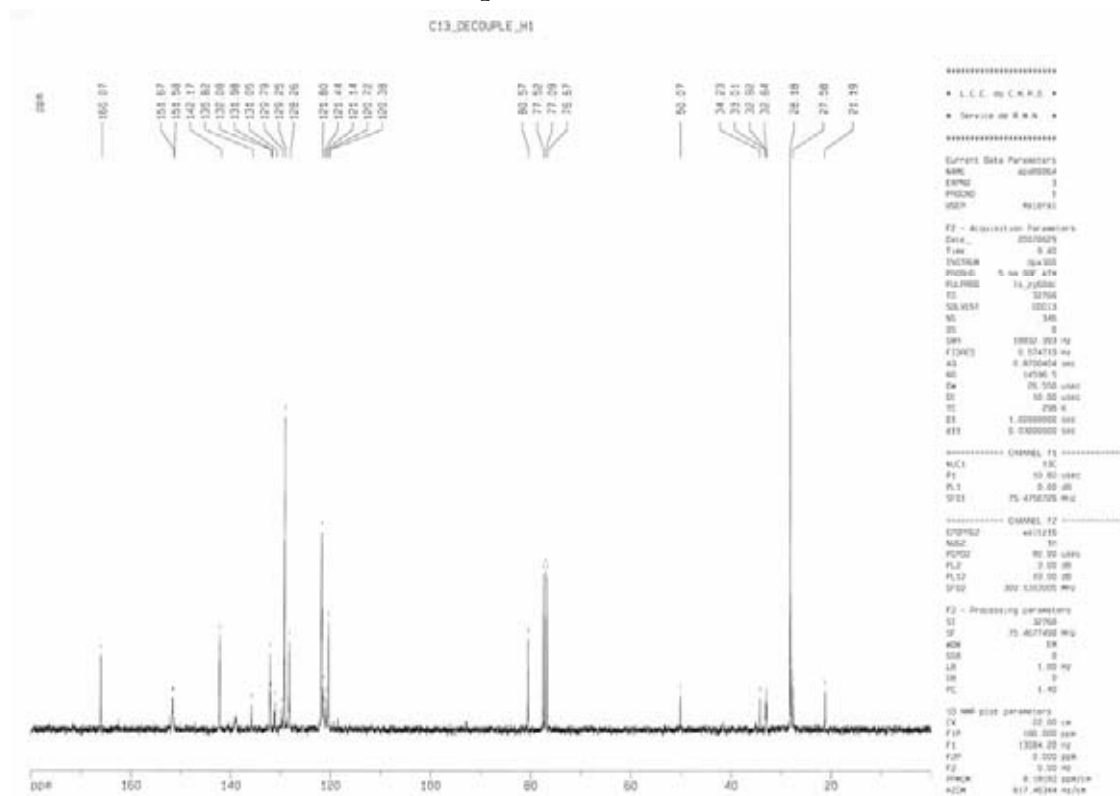
Composé 14 RMN ³¹P{¹H}



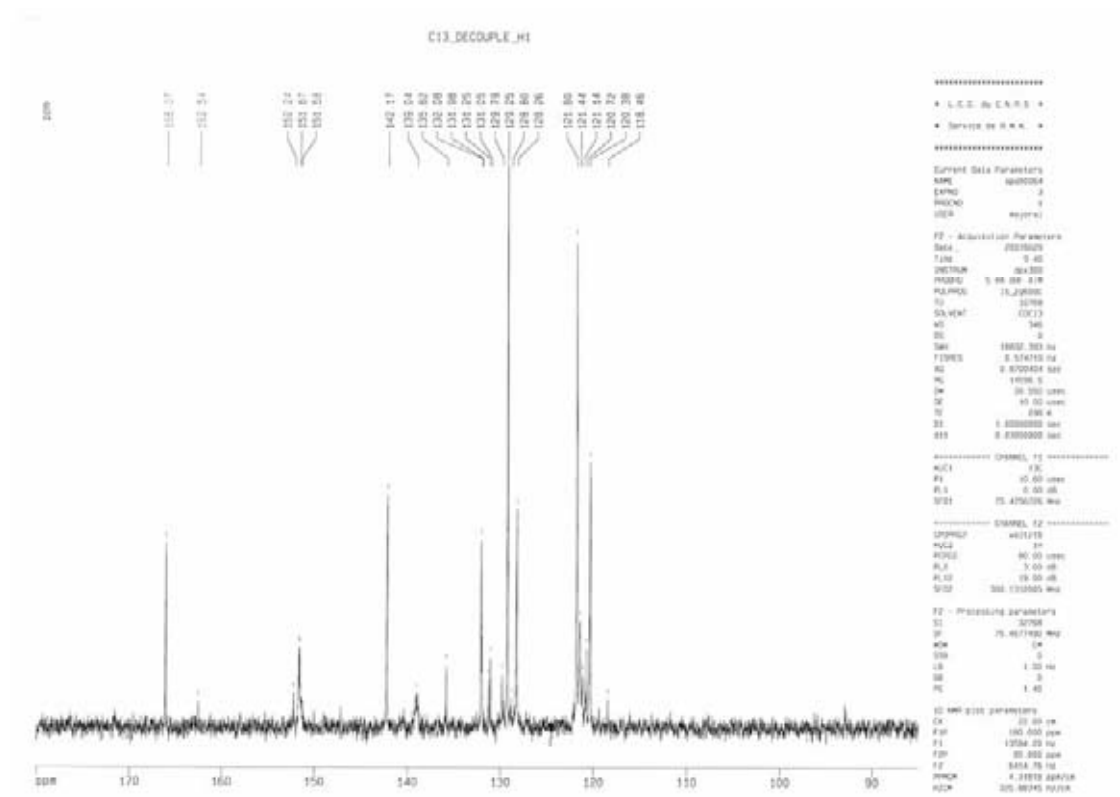
Composé 14 RMN ¹H



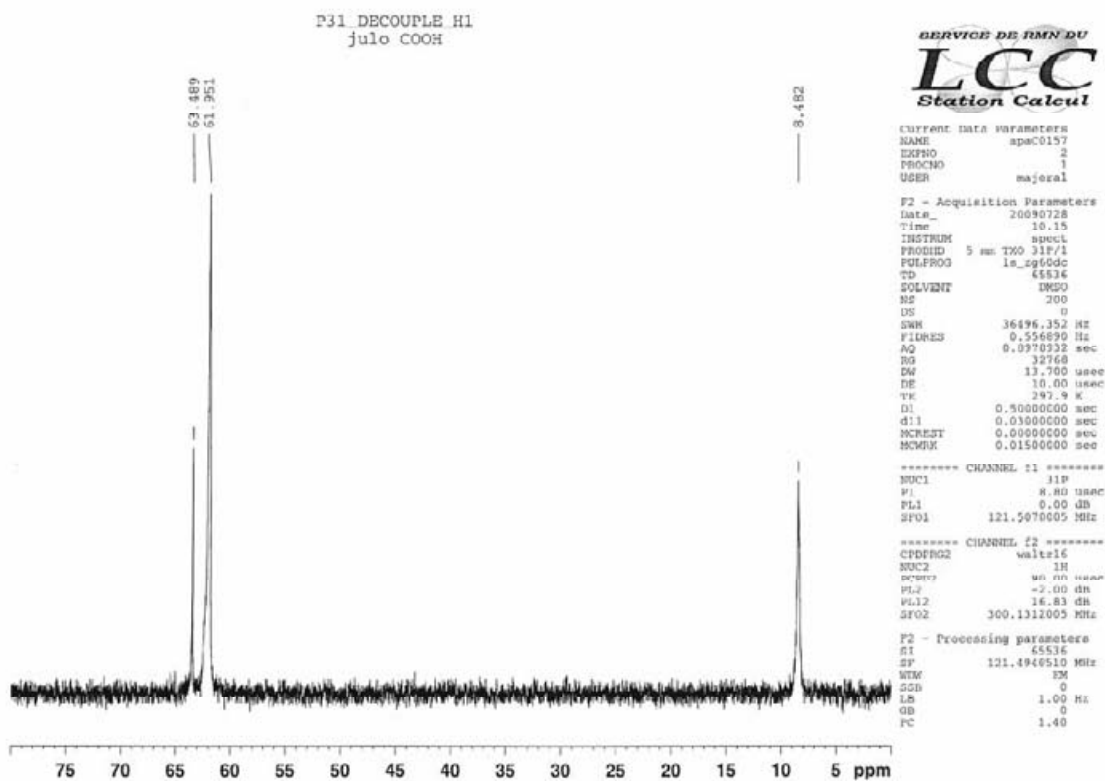
Composé 14 RMN ¹³C{¹H}



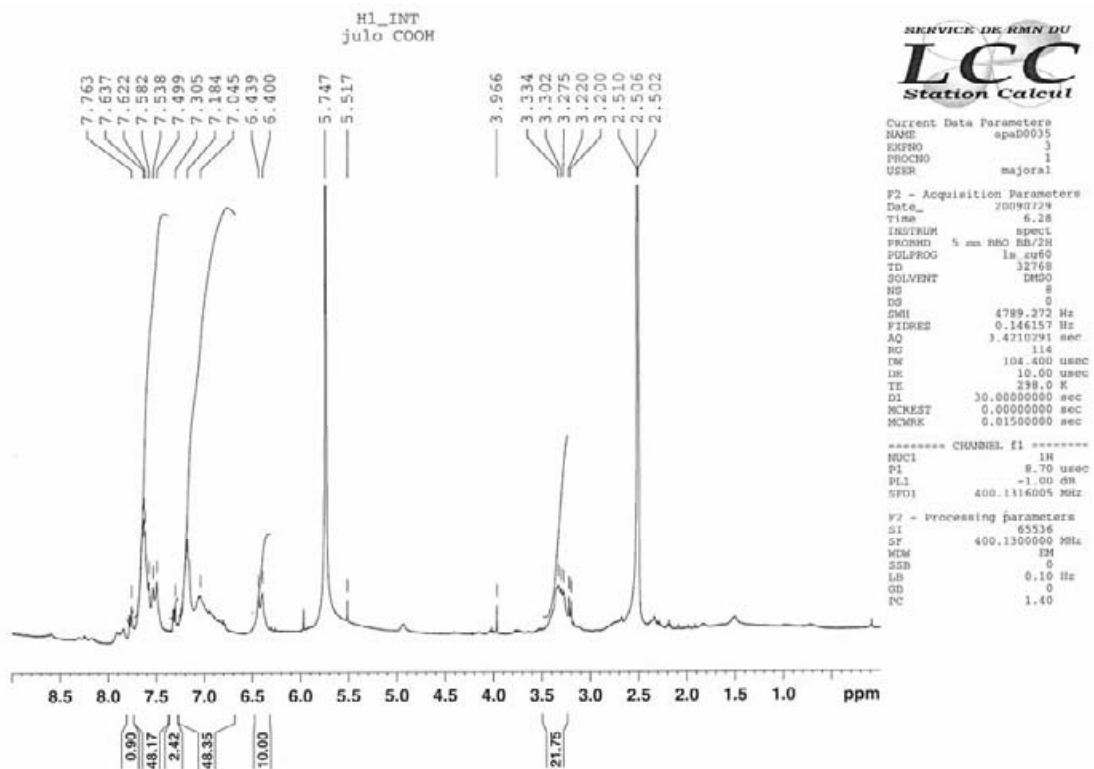
Composé 14 RMN ¹³C{¹H}

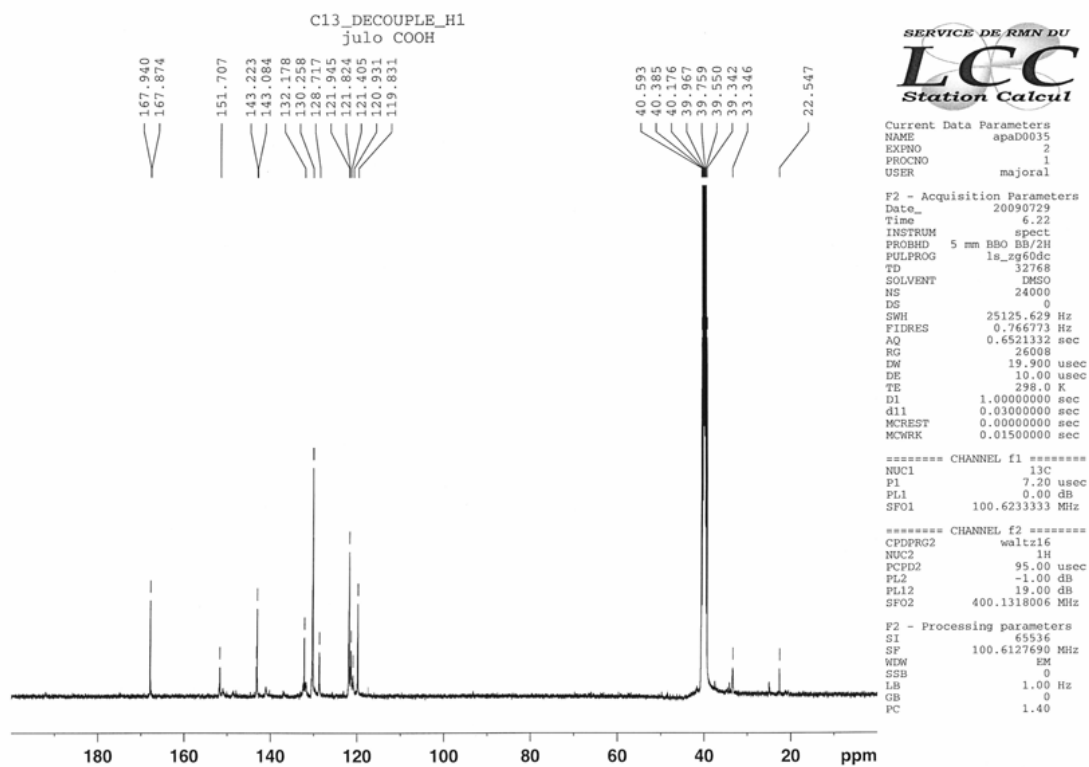
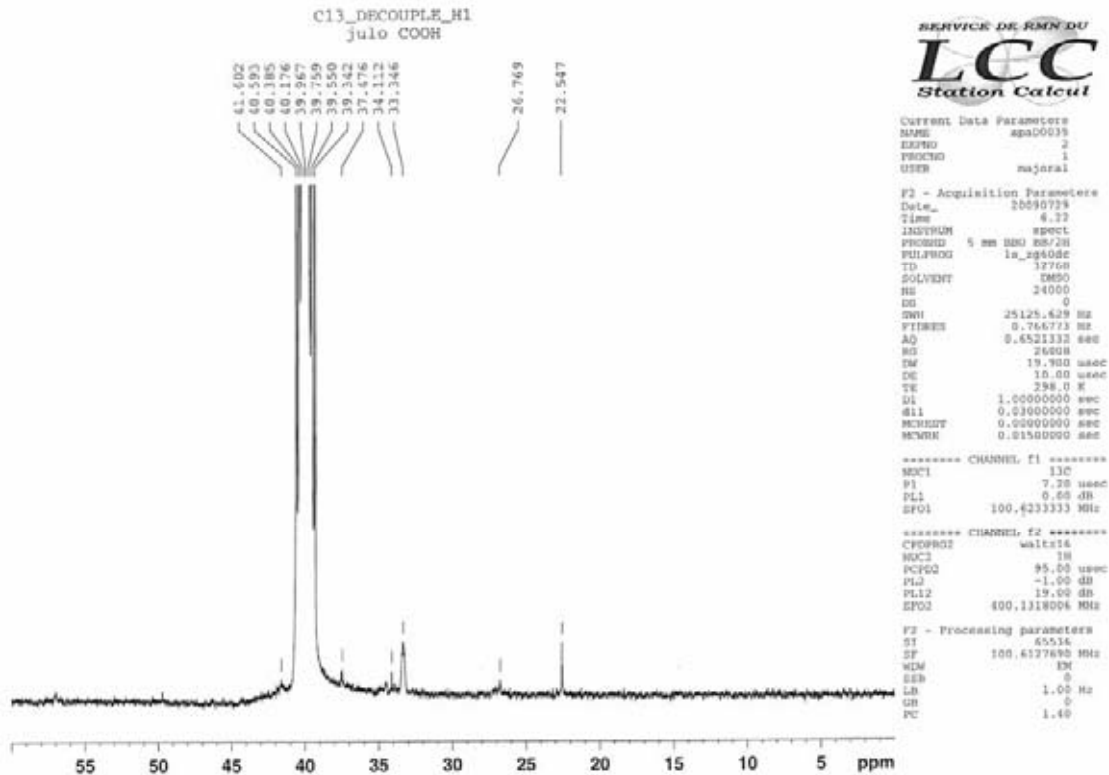


Composé 11-Df RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

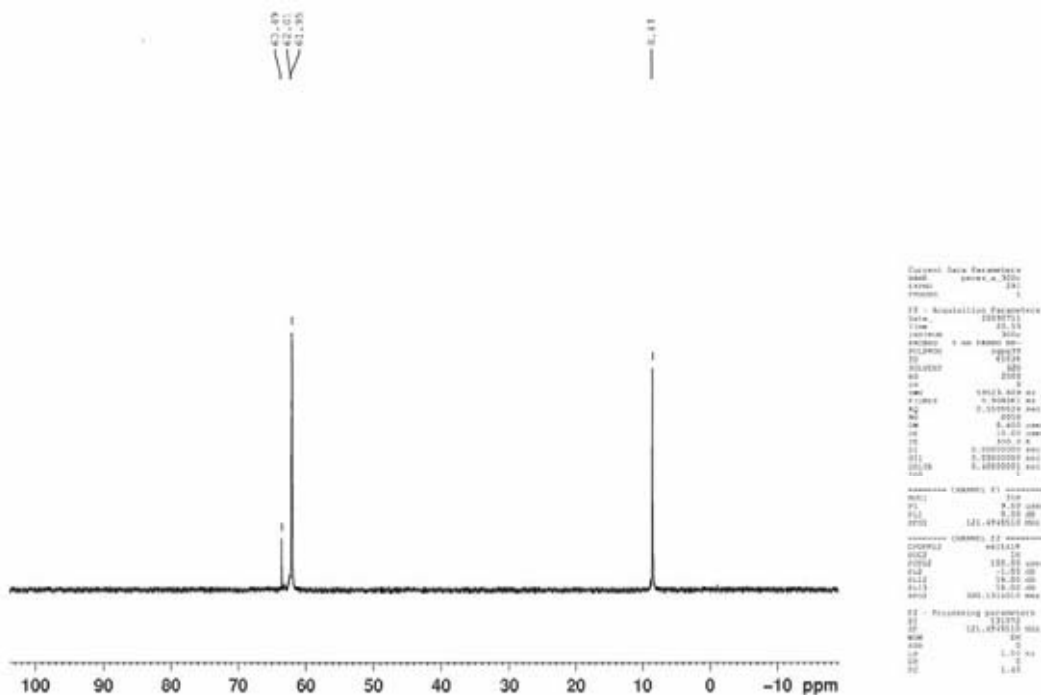


Composé 11-Df RMN ^1H

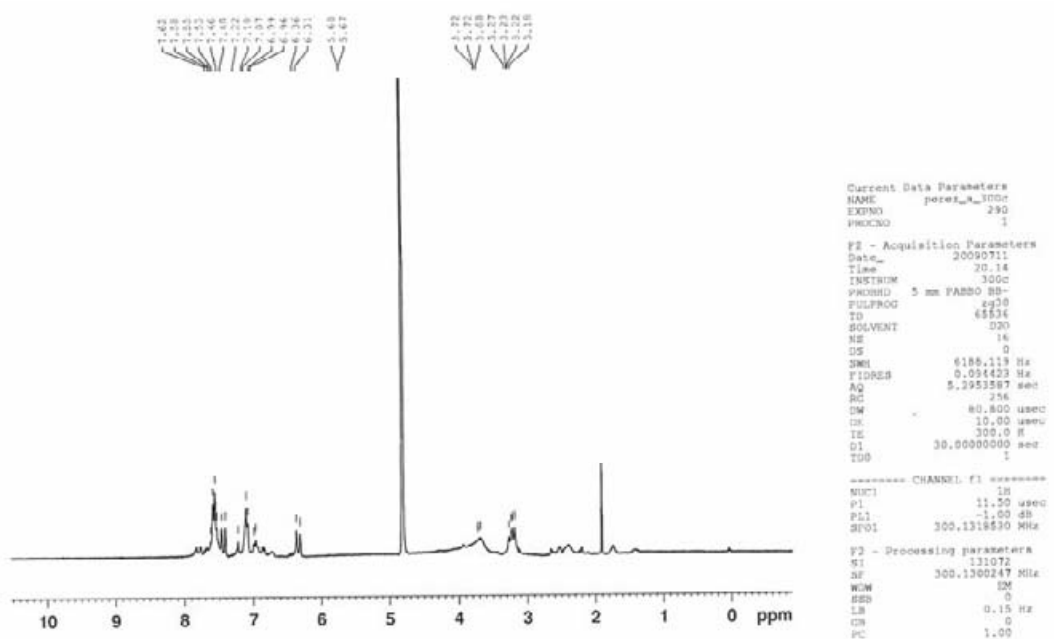


Composé 11-Df RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Composé 11-Df RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

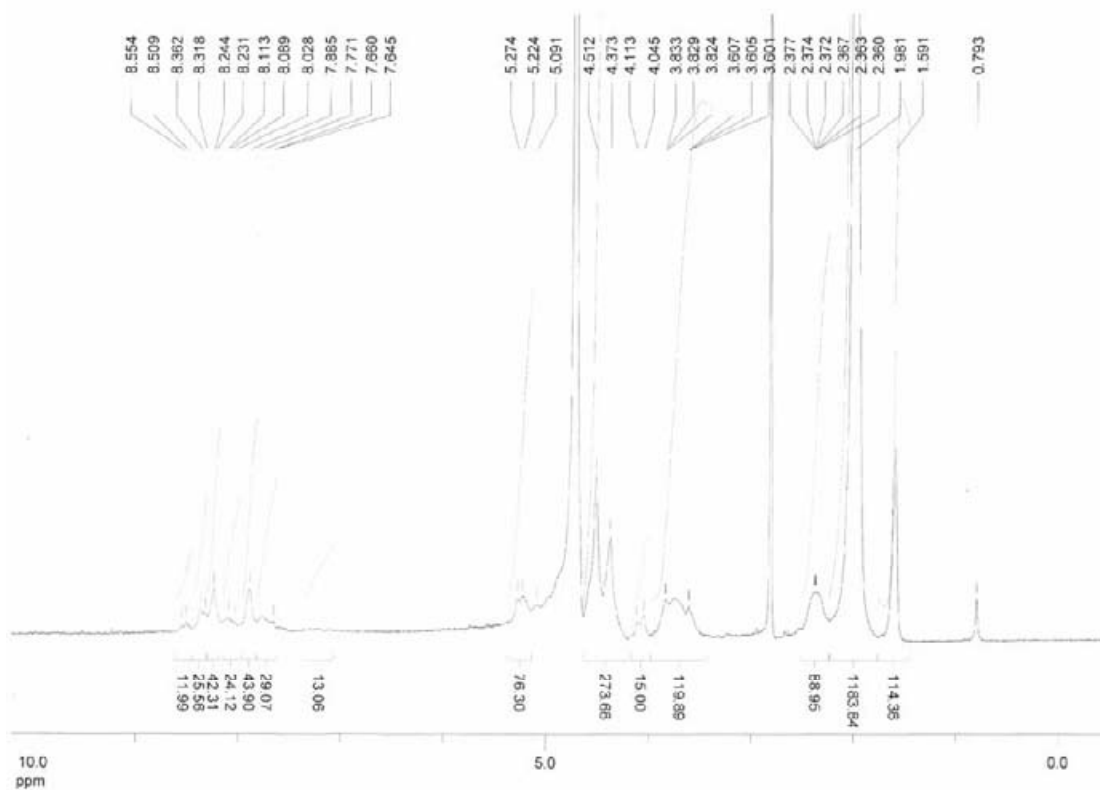
Composé 25-Df(Na)₁₀ RMN ³¹P{¹H}



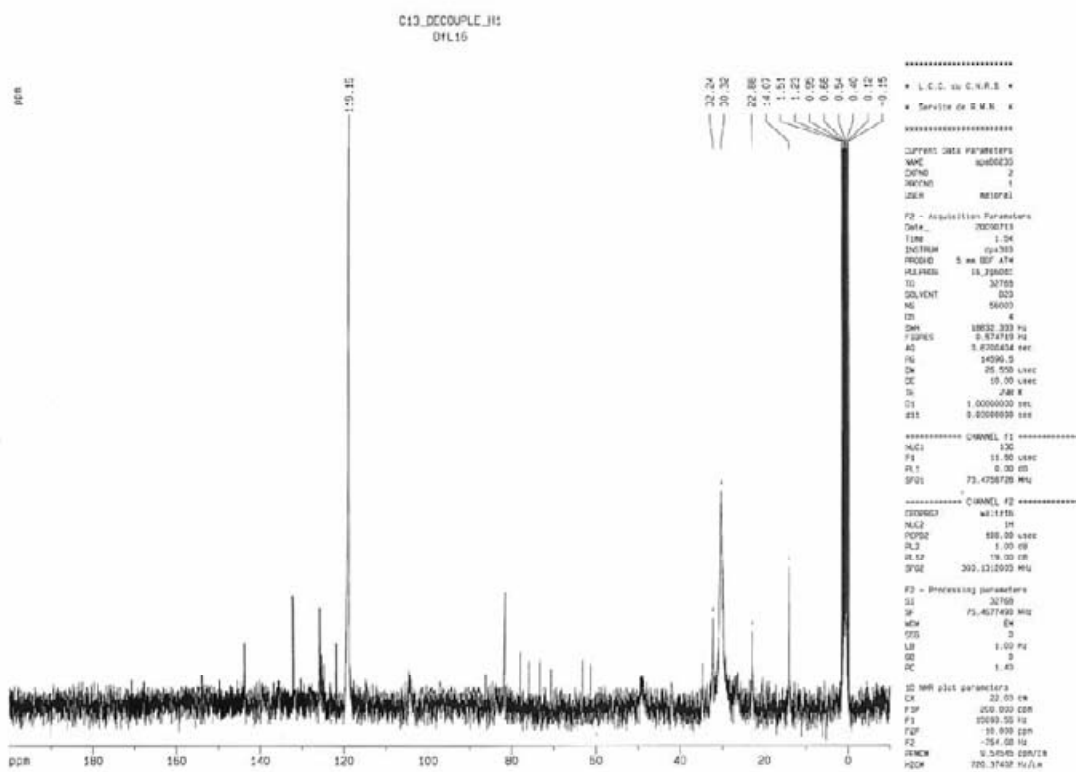
Composé 25-Df(Na)₁₀ RMN ¹H

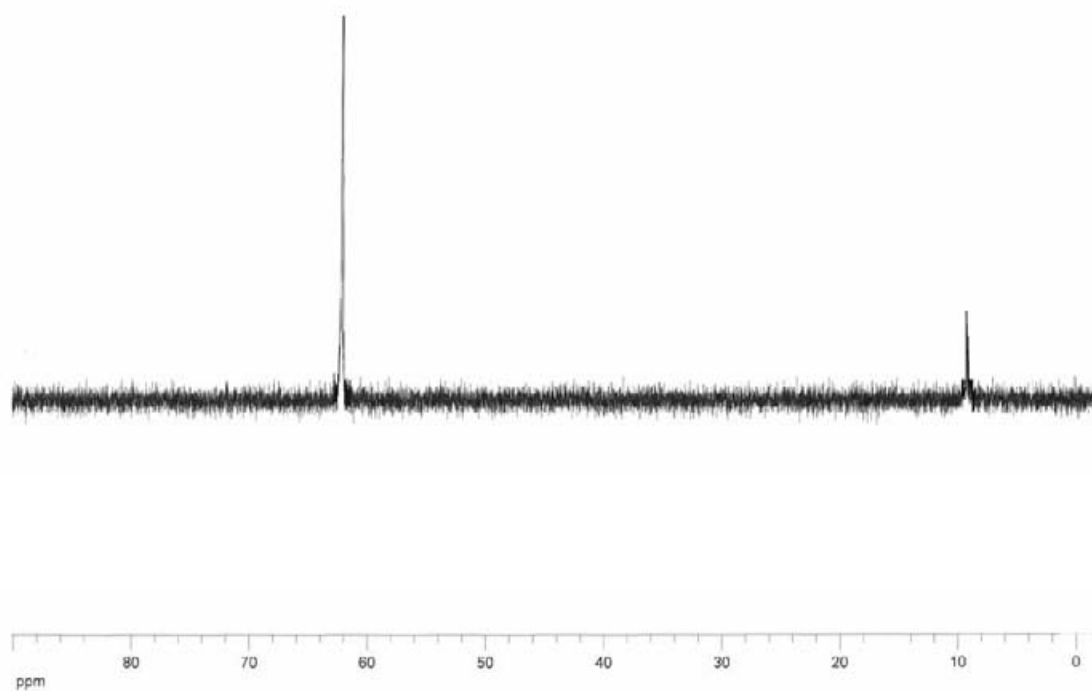
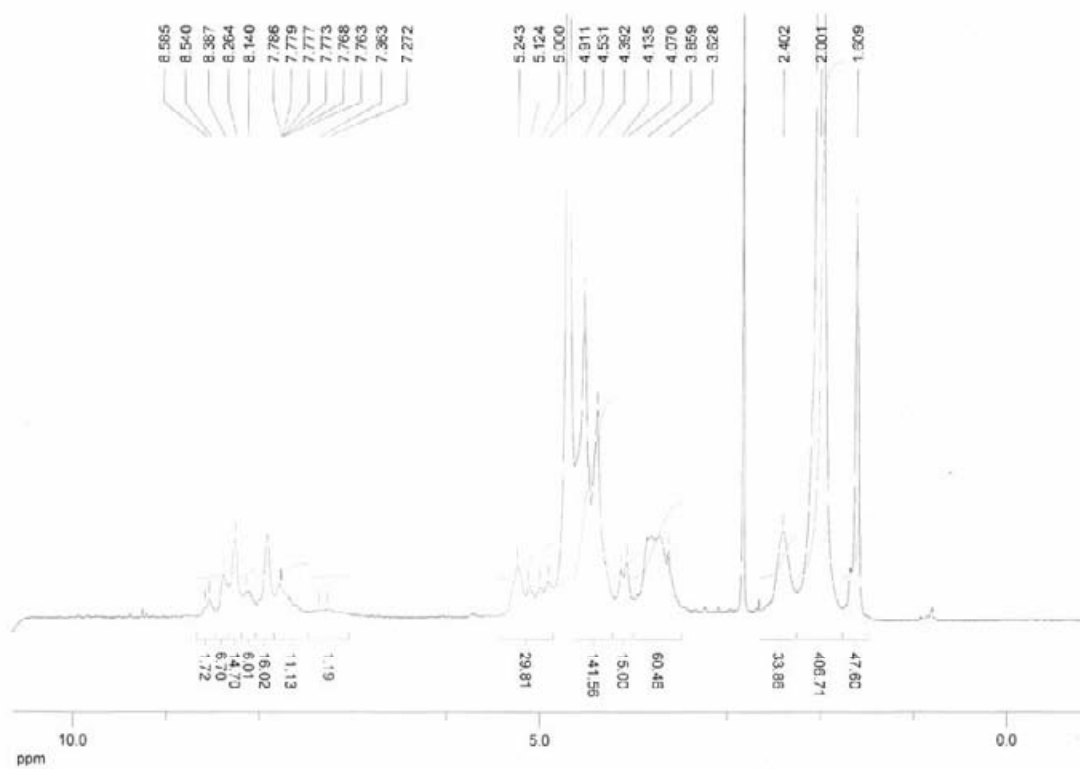


Composé 26-Df(L16)₁₀ RMN ¹H

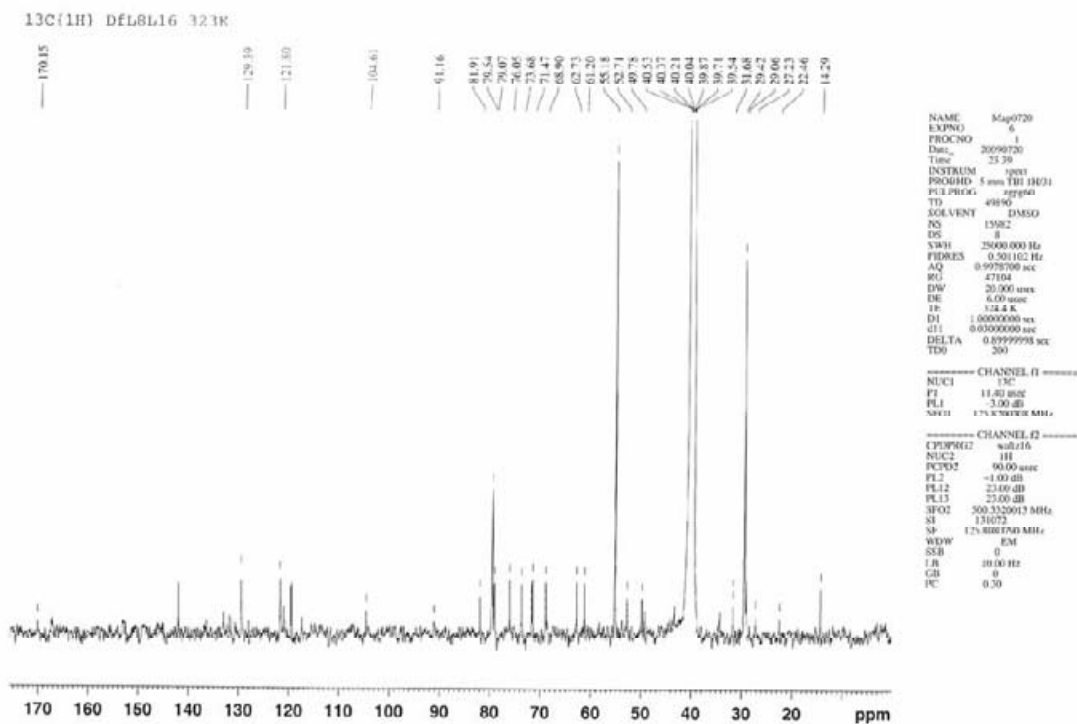


Composé 26-Df(L16)₁₀ RMN ¹³C{¹H}

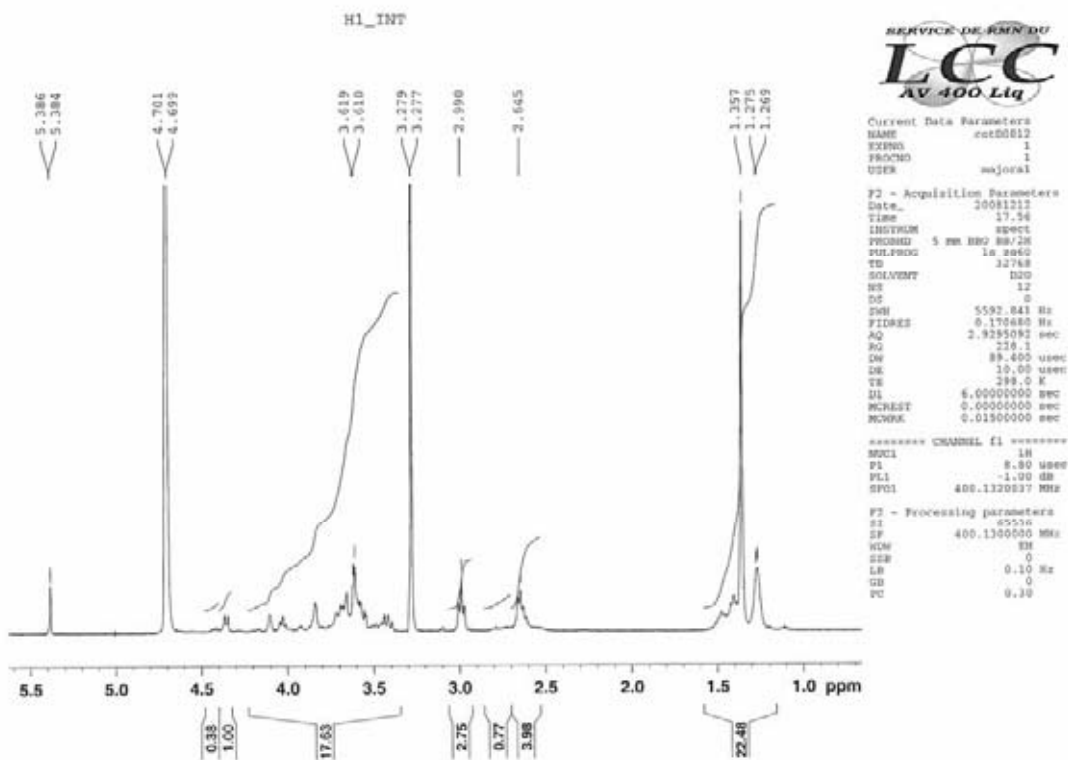


Composé 27-Df(L8)(L16), RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Composé 27-Df(L8)(L16), RMN ^1H 

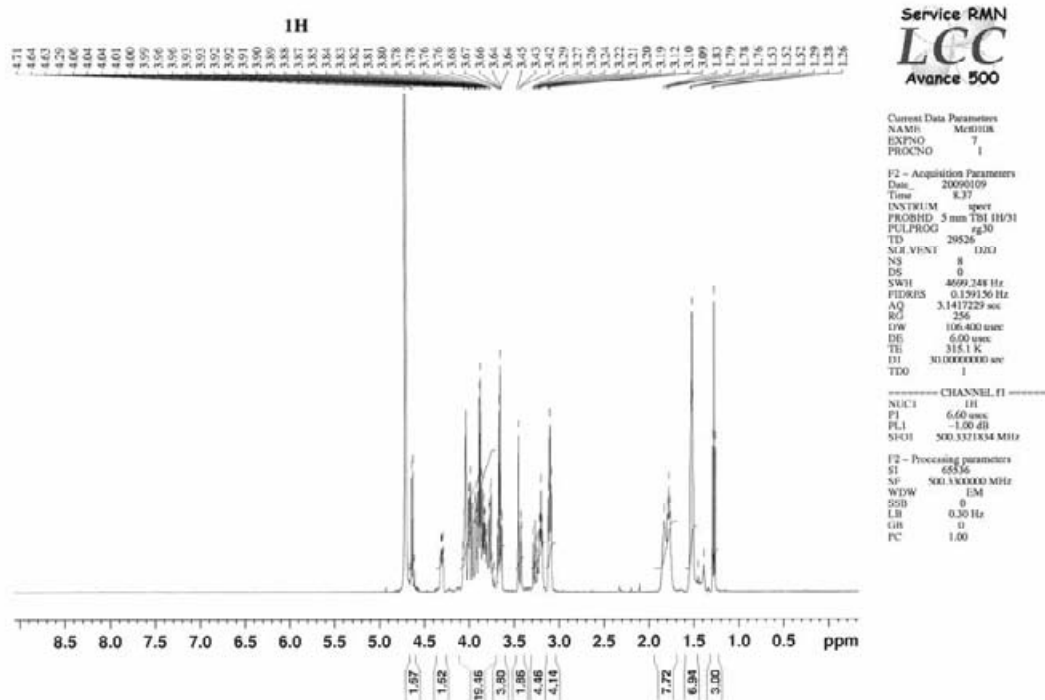
Composé 27-Df(L8)(L16), RMN ¹³C{¹H}



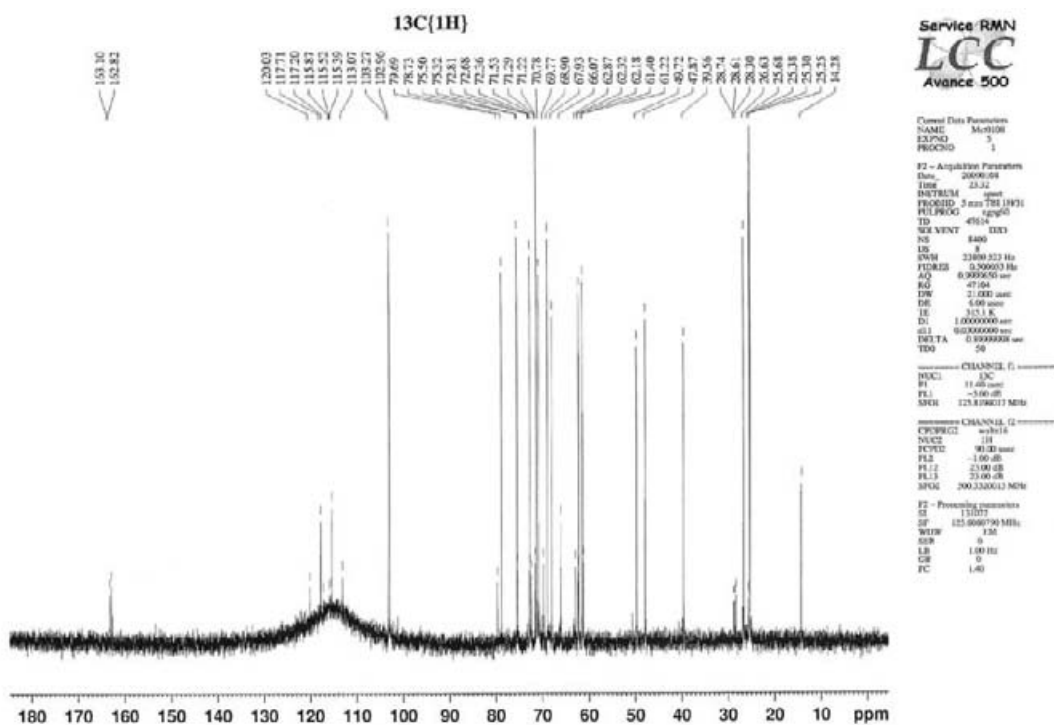
Composé 22 RMN ¹H



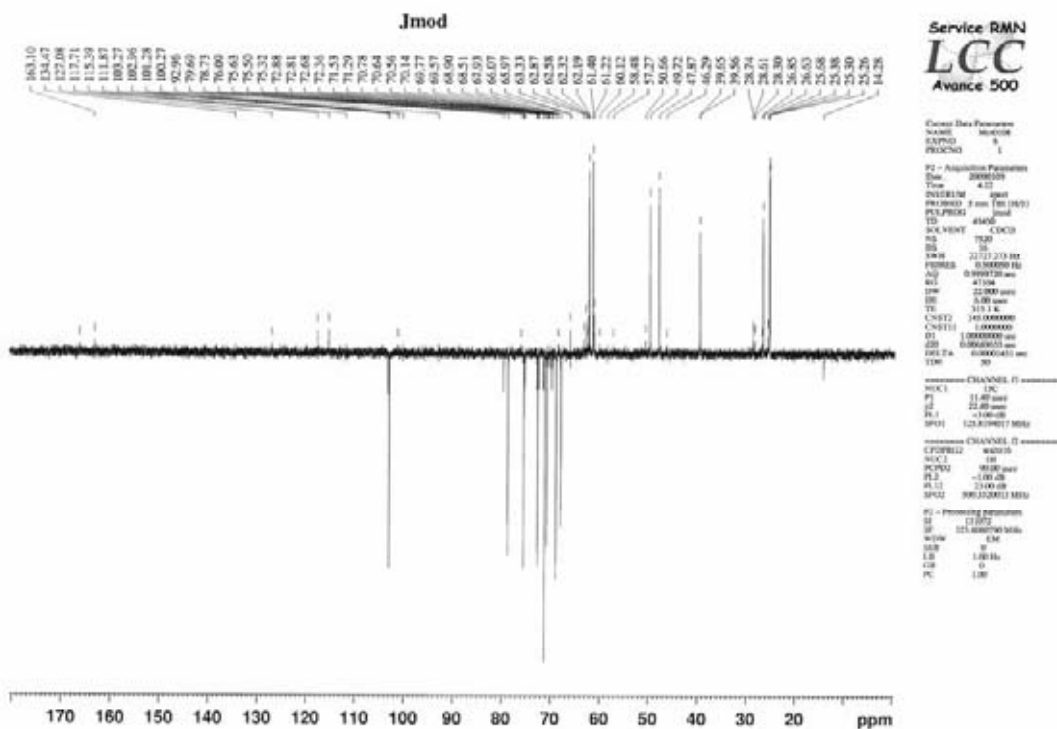
Composé 23 RMN ¹H



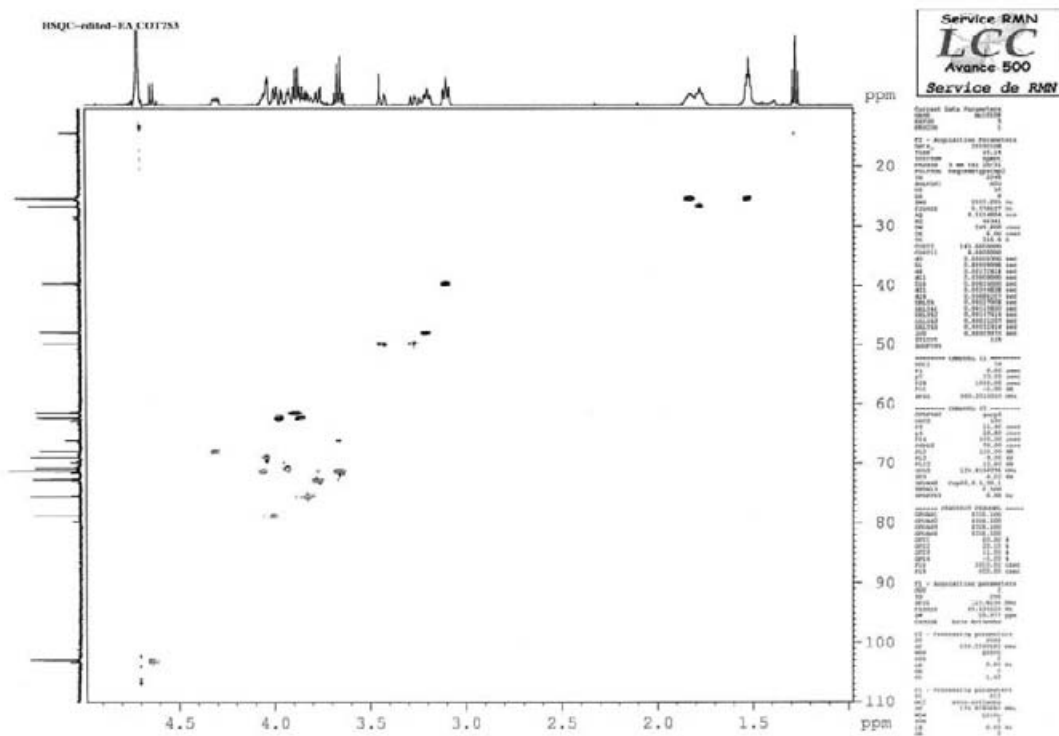
Composé 23 RMN ¹³C{¹H}



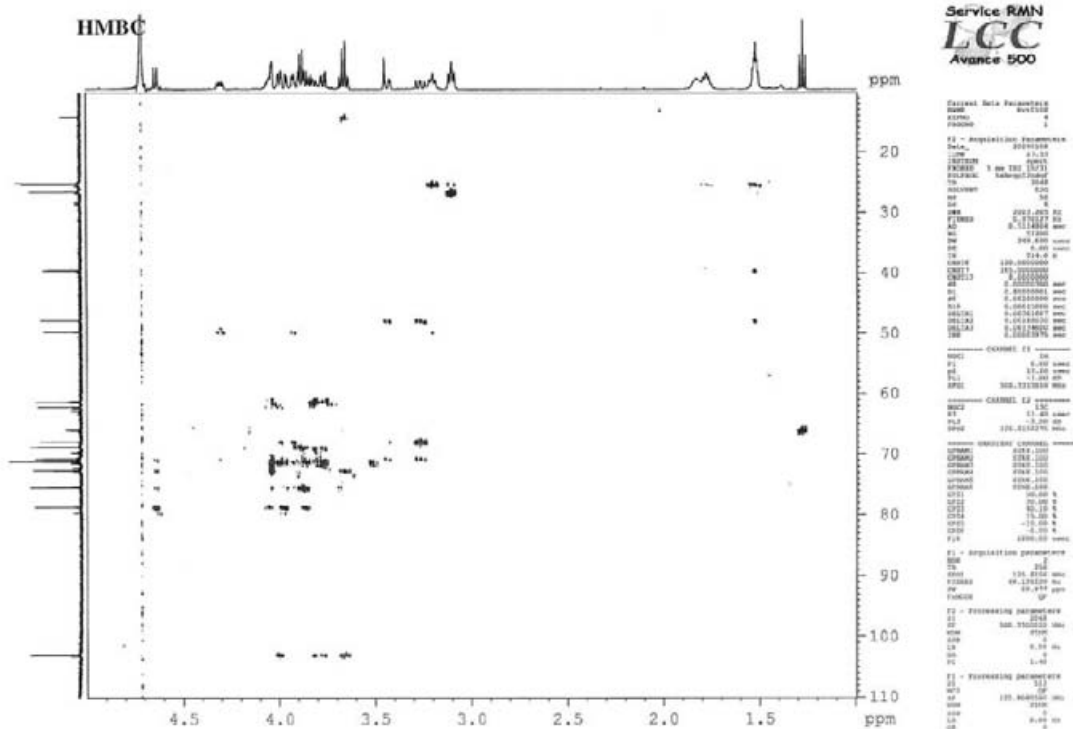
Composé 23 RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD



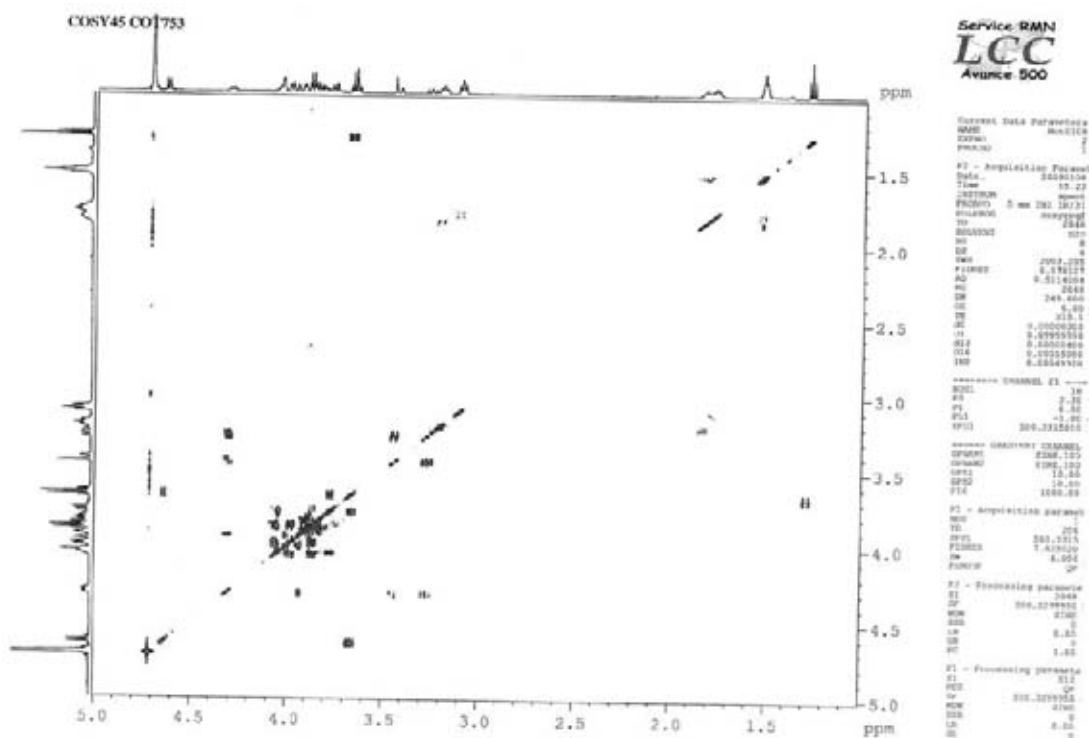
Composé 23 RMN $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSQC



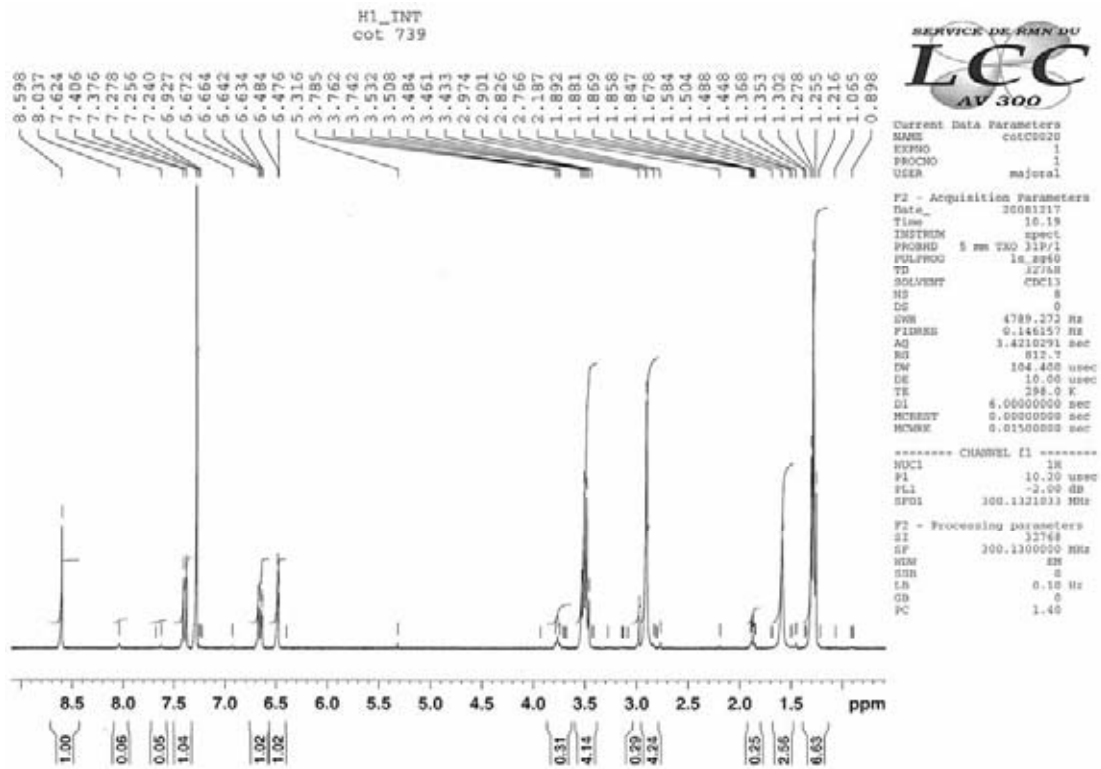
Composé 23 RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC



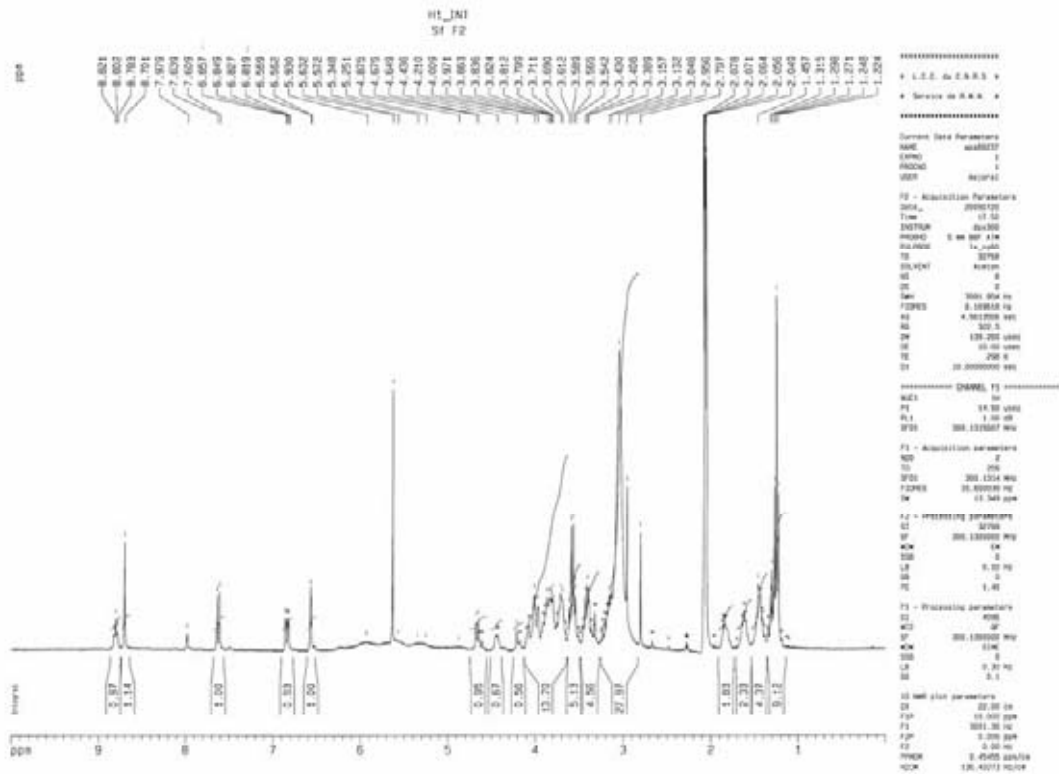
Composé 23 RMN ^1H - ^1H COSY



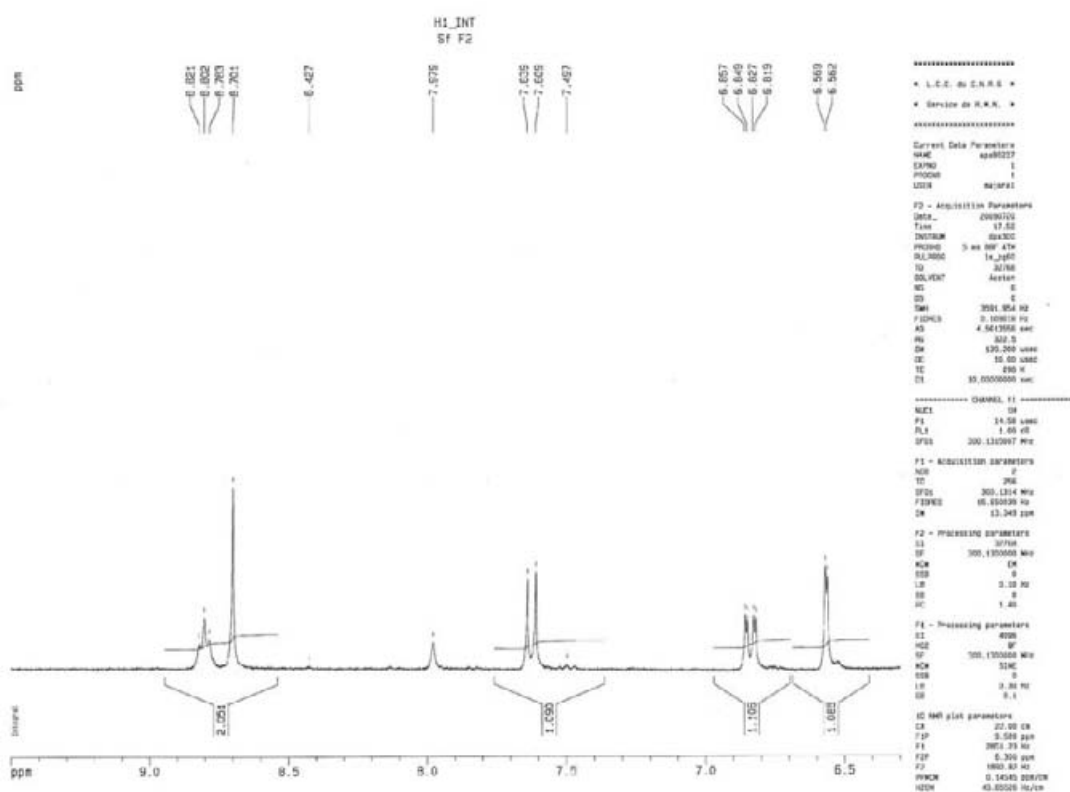
Composé 24 RMN ¹H



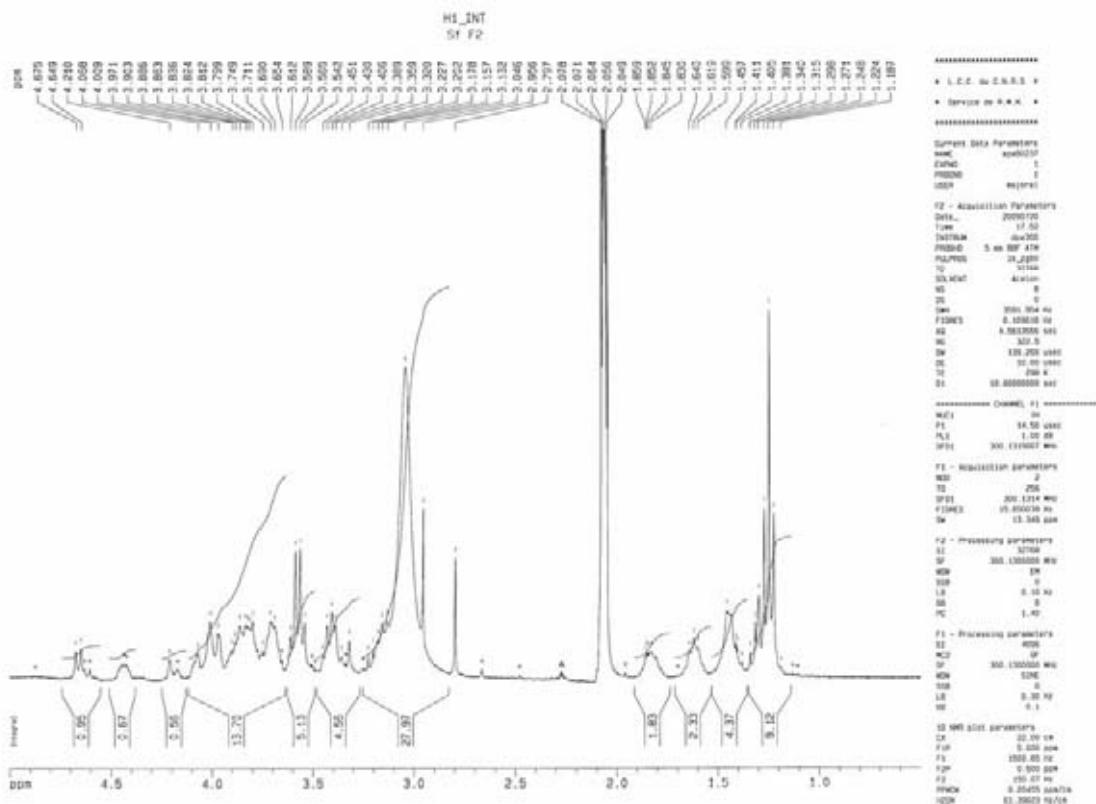
Composé 18-Lf RMN ¹H



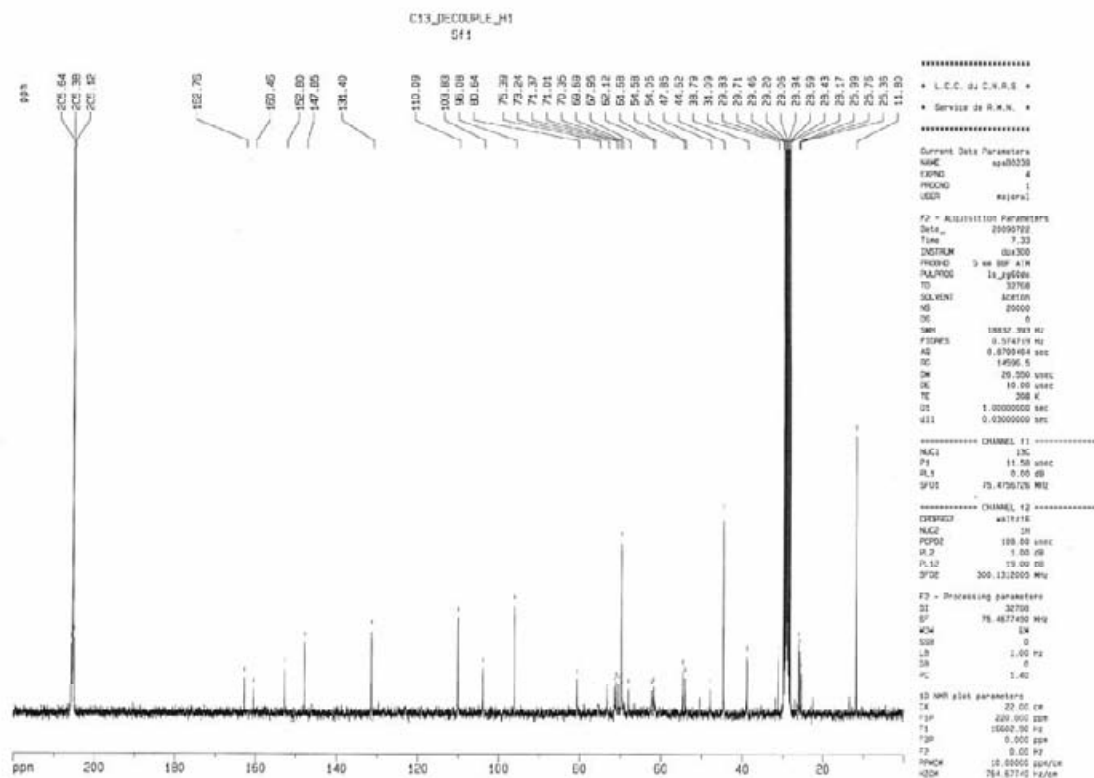
Composé 18-Lf RMN ¹H



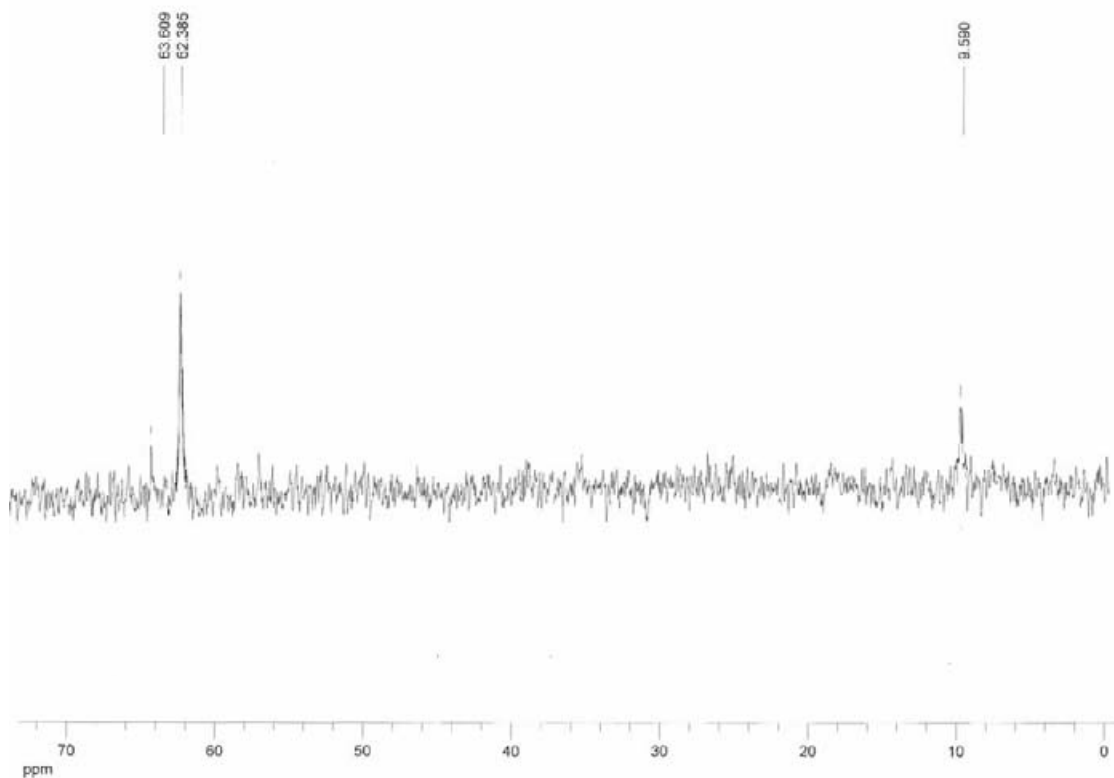
Composé 18-Lf RMN ¹H

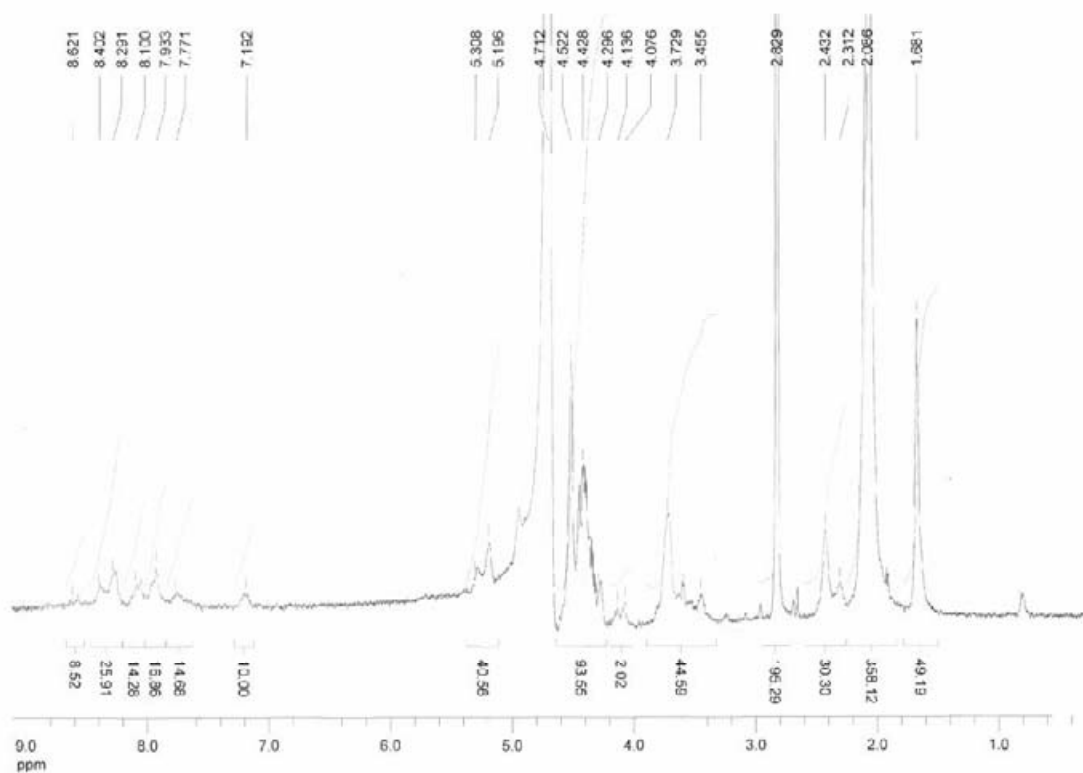
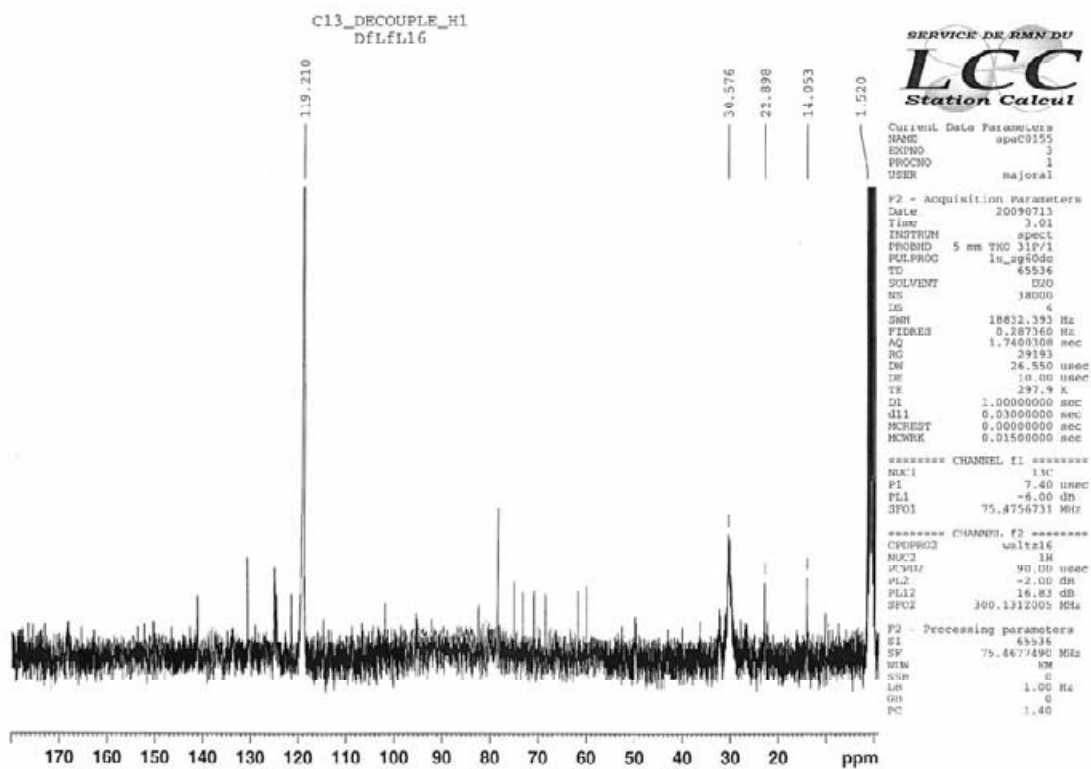


Composé 18-Lf RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$



Composé 28-Df(Lf)(L16), RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$



Composé 28-Df(Lf)(L16), RMN ^1H Composé 28-Df(Lf)(L16), RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 

Liste des publications

Une partie du travail présenté dans cette thèse a fait l'objet des publications suivantes :

Phosphonate terminated PPH dendrimers: influence of pendant alkyl chains on the in vitro anti-HIV-1 properties

Alexandra Pérez-Anes, Grégory Spataro, Yannick Coppel, Christiane Moog, Muriel Blanzat, Cédric-Olivier Turrin, Anne-Marie Caminade, Isabelle Rico-Lattes and Jean-Pierre Majoral, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 3491-3498

Multivalent cationic GalCer analogs derived from first generation dendrimeric phosphonic acids

Alexandra Pérez-Anes, Cristina Stefaniu, Christiane Moog, Muriel Blanzat, Cédric-Olivier Turrin, Anne-Marie Caminade, Isabelle Rico-Lattes and Jean-Pierre Majoral, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 242-248

Phosphonate terminated PPH dendrimers: influence of pendant alkyl chains on the in vitro anti-HIV-1 properties†

Alexandra Pérez-Anes,^{a,b,c} Grégory Spataro,^{a,b} Yannick Coppel,^{a,b} Christiane Moog,^d Muriel Blanzat,^{*c} Cédric-Olivier Turrin,^{*a,b} Anne-Marie Caminade,^{a,b} Isabelle Rico-Lattes^c and Jean-Pierre Majoral^{a,b}

Received 27th April 2009, Accepted 2nd June 2009

First published as an Advance Article on the web 7th July 2009

DOI: 10.1039/b908352a

The synthesis, characterization and in vitro anti-HIV activity of a series of generation one dendrimers having phosphonate groups with pendant alkyl chains are described. The influence of the lateral alkyl chains on the biological properties was correlated to ¹H-¹H NOESY experiments.

Introduction

Although combination antiretroviral therapy has revolutionized the management of HIV infection, the continuing HIV/AIDS pandemic confirms the need for new antiretroviral drugs. Among the new strategies currently under investigation, the early stages of the virus replication involving the recognition between the virus and host cells, and the subsequent fusion step, are often at the center of the debate. CD4(+) lymphoid cells are a key target for the HIV, and in this case the entry of the virus is initiated by the formation of ternary gp120/CD4/co-receptors (namely CCR5 or CXCR4) complex¹, followed by the anchoring of viral gp41 to the host cell. Recently FDA-approved Enfuvirtide² and other drug candidates (co-receptors antagonists, gp41 inhibitors) were designed to disrupt this ternary complex.

Alternatively, anionic polymers have been used to inhibit HIV-1 infection by preventing virus-cell fusion through ionic interactions with the V3 loop of gp120.³ Some of these polymers include topically applied microbicides designed to prevent vaginal HIV-1 transmission, like BufferGel, a polyanionic carbopol containing buffering gel (phase III trials).⁴ Multivalent effects⁵ are of great importance for these charge-based interactions, and dendrimers have naturally emerged as a new class of potential nanodevices for antiviral strategies. Indeed, dendrimers have received constantly increasing attention since the first synthesis was performed by Vögtle and co-workers.⁶ Actually, dendrimers offer a wide range of surface function availability and a regular structure which is tunable at will for the rational design of nanosized therapeutic platforms.⁷ For instance, polysulfonated dendrimers based on poly-L-lysine have given birth to Viva GelTM, a dendrimer-based topical microbicide (phase I/II trials).⁸ Many other examples deal with the use of polyanionic dendrimers terminated with

sialic acid moieties, carboxylates, or galactose sulfates.⁹ The multivalency effects^{10,11} induced by dendrimeric structures upon the ionic interactions are remarkably strengthened when dendrimeric compounds are used, but to the best of our knowledge, none of these multivalent systems have taken into account the possible influence of lipophilic-lipophilic interaction that could influence the anchorage of the inhibitors and thus its efficacy. This type of interaction is known to be determinant for numbers of supramolecular interactions, and we have thus assumed that the multivalent interaction of polyanionic dendrimers with gp120 could be influenced by lipophilic interactions with the lipophilic part of the V3 loop located on gp120. Actually, it has already been shown that a particular family of HIV-1 inhibitors (GalCer analogs)¹², that also prevent gp120-CD4 recognition, is sensitive to lipophilic interactions.¹³ In fact, the hydrophobic long chain grafted on these GalCer analogs, plays a key role in the interaction with the hydrophobic portion of the V3 loop and therefore in the enhancement of protein/ligand binding. In this respect, we present herein the synthesis and preliminary anti-HIV-1 inhibitory activity of a series of phosphorus-containing dendrimers, namely PPH (Poly-(PhosphorHydrazone)) dendrimers, equipped with terminal phosphonic acid moieties and lateral alkyl chains (Fig. 1). In order to highlight the influence of the alkyl chain and according to previous results¹⁴, the generation parameter was set to one.

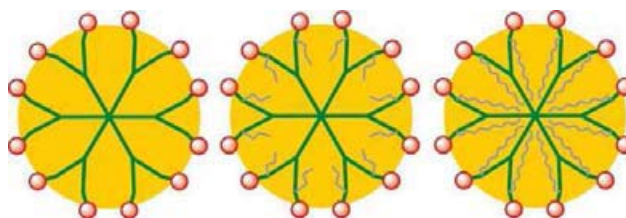


Fig. 1 A symbolic representation of phosphonic acid (red spheres) capped dendrimers without (left) and with C3 (centre) and C10 (right) lateral alkyl chains.

Results and discussion

Chemistry

We have designed series of phenols that can be easily grafted onto the dichlorothiophosphoryldrazone end groups which compose one of the easily affordable electrophilic surface of PPH

^aLaboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, UPR 8241, 205 route de Narbonne, F-31077, Toulouse, France. E-mail: turrin@lcc-toulouse.fr; Fax: +33(0)561 553 003; Tel: +33(0)561 333 134

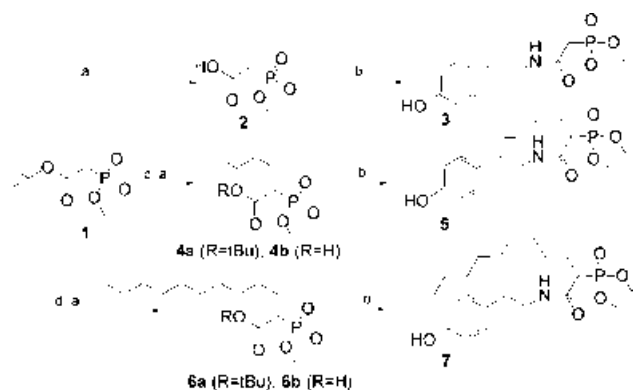
^bUniversité de Toulouse; UPS, INPT; LCC, F-31077, Toulouse, France

^cLaboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, CNRS UMR5623. Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062, Toulouse cedex, (France). E-mail: blanzat@chimie.ups-tlse.fr; Fax: +33 5 61 55 81 55

^dInstitut de Virologie, INSERM U544, Faculté de Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000, Strasbourg, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR spectra for all compounds. See DOI: 10.1039/b908352a

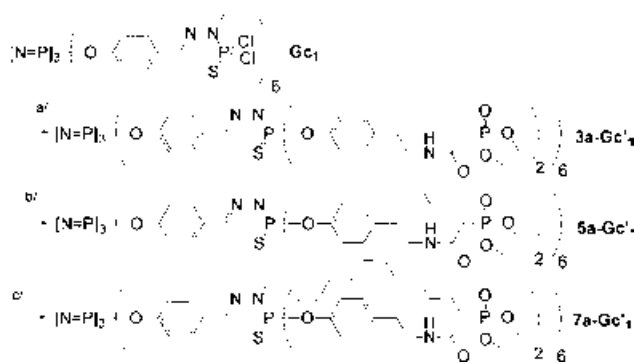
dendrimers.¹⁵ These phenols comprise dimethylphosphonate functions with a pendant alkyl chain (scheme 1), and can be readily transformed to the corresponding phosphonic acids after grafting onto the dendrimer's outer shell.¹⁶ Phenol **3** lacks lateral alkyl chains and is easily obtained by coupling tyramine with the deprotected P,P-dimethylphosphoacetic acid in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and N-hydroxybenzotriazole (HOBT). Compound **3** is obtained with moderate yields (46%) after purification by column chromatography, and shows on ¹H NMR a typical doublet at 2.84 ppm with ²J_{PH} = 21 Hz for the activated methylene group, whereas the phosphorus atom of the phosphonate resonates as a singlet at 25.6 ppm. The intermediary carboxylic acid **2** is obtained by TFA-assisted deprotection of the commercially available tert-butyl P,P-dimethylphosphonoacetate (scheme 1), and the total deprotection is easily assessed on proton NMR by disappearance of the signal corresponding to the tert-butyl group.



Scheme 1 Synthesis of phenols **3**, **5** and **7** [a: TFA (20% in CH₂Cl₂); b: tyramine, DCC, HOBT, c: HNa, IC₃H₇, cat. crown 15C5; d: HNa, IC₁₀H₂₁, cat. crown 15C5].

Phenols **5** and **7** are obtained with moderate yields in three steps (34% and 36% respectively). The alkyl chain is grafted on **1** by deprotonation of the activated methylene with sodium hydride and reaction of the resulting carbanion with 1-iodopropane or 1-iododecane to afford **4** and **6** respectively (scheme 1). After tertbutyl ester removal with TFA, the phenols **5** and **7** are obtained by acylation of tyramine with a DCC/HOBT procedure. No stereochemical control is induced during this procedure, racemate species are thus obtained for compounds **4** to **7**, and the diastereotopical methoxy groups of the phosphonate present a typical set of two doublets located around 3.7 ppm (³J_{HP} = 10 Hz) on ¹H spectra and a typical set of two doublets located around 53 ppm (²J_{PC} = 7 Hz) on the ¹³C spectra. The influence of the alkyl chain is observed on the ³¹P NMR spectra of compounds **5** and **7** on which the chemical shift of the phosphorus atom of the phosphonate group is displaced *ca.* 2.5 ppm upfield compared to compound **3**.

The phosphonate terminated dendrimers are obtained by nucleophilic substitution of the twelve terminal chlorine atoms located on the surface of a first generation dendrimer **Gc**₁ in the presence of the corresponding phenols and cesium carbonate as a base (scheme 2). The chain length has no influence on the course of the reactions, which can be monitored by ³¹P NMR directly from the reaction mixture. Typically, in the case of **5a-Gc**₁, a

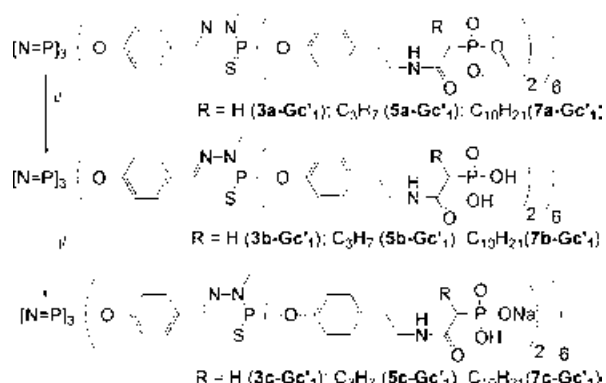


Scheme 2 Synthesis of dendrimers **3a-Gc**₁, **5a-Gc**₁ and **7a-Gc**₁ (a: **3**, Cs₂CO₃/THF; b: **5**, Cs₂CO₃/THF; c: **7**, Cs₂CO₃/THF).

singlet at 68.4 ppm is rapidly observed, indicating the formation of the intermediary –P(S)(OAr)Cl species on the surface of the dendrimers, along with the progressive disappearance of the singlet at 62.3 ppm corresponding to the starting P(S)Cl₂ end groups. The reaction goes to completion in one night at room temperature, as confirmed by ³¹P NMR with the total disappearance of the intermediary species at 68.4 ppm and the appearance of a new singlet at 62.8 ppm for the terminal P(S)(OAr)₂ functions. During the course of the reaction the cyclotriphosphazene core and the terminal phosphonate functions of the dendrimers remain unaffected, and resonate at 8.4 ppm and 28.2 ppm respectively on the ³¹P NMR spectra.

Although the solubility properties of PPH dendrimers are closely connected to the nature of the outer-shell functions, it is usually possible to separate them from excess of reagents by simple washing procedures involving a suitable mixture of solvents in which the dendrimers are scarcely soluble and the impurities or excess reactants are soluble. In the present case, phosphonate containing phenols **3**, **5** and **7** do not show significant differences in their solubility properties compared to the parent dendrimers **3a-Gc**₁, **5a-Gc**₁ and **7a-Gc**₁, which were consequently purified by flash column chromatography. These compounds were univocally characterized by ³¹P, ¹H and ¹³C NMR techniques, including two dimension experiments. As expected for PPH dendrimers, no clear information could be obtained from mass spectrometry analysis.¹⁷

Phosphonic acid terminated dendrimers **3b-Gc**₁, **5b-Gc**₁ and **7b-Gc**₁ are obtained from the corresponding phosphonate terminated dendrimers **3a-Gc**₁, **5a-Gc**₁ and **7a-Gc**₁ *via* silylation/methanolysis of the phosphonate end groups (scheme 3) as previously described for aminomethylene bis(dimethylphosphonate) capped dendrimers.¹⁸ The resulting compounds are scarcely soluble in water and poorly soluble in dimethylsulfoxide or methanol. The ³¹P NMR spectroscopy allows us to observe the complete transformation of the phosphonate surface by the total disappearance of the singlets at 25.4, 28.2 and 28.1 ppm and the disappearance of singlets at 16.9, 23.2, 22.8 ppm for **3b-Gc**₁, **5b-Gc**₁ and **7b-Gc**₁ respectively. The latter are readily transformed into the corresponding monosodium salts **3c-Gc**₁, **5c-Gc**₁ and **7c-Gc**₁ by addition of the stoichiometric amount of sodium hydroxide in water and subsequent lyophilisation. During this step, the signals corresponding to the terminal phosphonic acids are all moderately shielded to *ca.* 13 ppm on the ³¹P NMR spectra. As previously observed^{14,19}, proton spectra obtained from diluted water solutions are not well resolved (although sufficient



Scheme 3 Synthesis of dendrimers **3b,c-Gc'1**, **5b,c-Gc'1** and **7b,c-Gc'1** (i: BrTMS, MeOH; j: NaOH).

to perform 2D NOESY ^1H - ^1H), due to a lack of mobility of the interior of the dendrimers, but this phenomenon was surprisingly less pronounced in the case of **7-Gc'1**. In all cases, addition of a co-solvent (acetone or acetonitrile) allowed us to observe fully resolved signals and all compounds could thus be fully characterized by multi-nucleus NMR.

2D NOESY ^1H - ^1H experiments were performed with mixing time of 100 ms to prevent spin-diffusion phenomenon that can impair the interpretation of NOESY spectra for macromolecules. This technique allows the observation of 2D mapped correlations that traduce through space connectivities in a 5 \AA distance range.

It allowed us to observe for dendrimers **5c-Gc'1** and **7c-Gc'1**, an unambiguous interaction between the terminal methyl group and the methylene groups of the lateral alkyl chains with specific regions of the interior of the dendritic skeleton. In the case of **5c-Gc'1**, the CH_3 - $(\text{CH}_2)_n$ entity appears on proton spectra as a set of overlapped singlets from 0.60 ppm (CH_3) to 0.89 ppm ($(\text{CH}_2)_n$) and the 2D NOESY spectrum evidences a weak NOE correlation (figure 2, left) between the CH_3 - $(\text{CH}_2)_n$ entities and aromatic protons centered on 6.8 ppm belonging to the OC_6H_4 groups located on the first generation, whereas no correlation can be detected between the $\text{N}(\text{CH}_3)$ group located at 3.20 ppm and

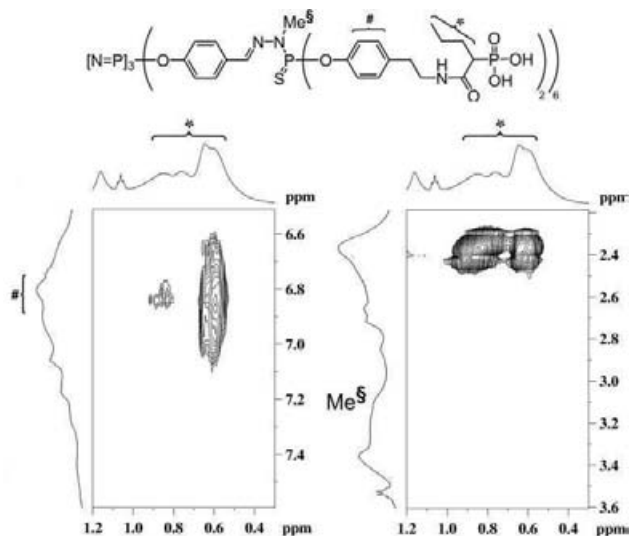


Fig. 2 Selected regions of the NOESY ^1H - ^1H spectrum obtained for **5c-Gc'1**.

the alkyl chains (figure 2, right). Additionally, one should notice that the signal of the terminal methyl group is relatively shielded, $\delta(^1\text{H}) = 0.6 \text{ ppm}$, instead of *ca.* 0.9 ppm for a terminal methyl group of a free alkyl chain, which is in agreement with shielding effects due to the dendrimer's interior.

In the case of **7c-Gc'1**, a clear correlation between the aromatic rings of the zeroth and the first layer can be observed (data not shown), indicating that these moieties are located within a 0.5 nm distance range, which is almost half of the expected distance. This observation is consistent with previous experiments run on PPH dendrimers equipped with water soluble end groups²⁰, and produces a drastic compaction of the structure. The terminal methyl group of the lateral alkyl chain is identified as a broad singlet centered at 0.49 ppm on the ^1H spectrum, and the methylene groups resonate as a non-resolved multiplet (0.84–1.00) ppm. Again, a strong shielding effect is observed on the terminal methyl group of the alkyl chain, causing it to bury into the interior of the dendrimer. The 2D NOESY spectrum shows a clear correlation between the methylene groups of the alkyl chain and the aromatic systems located on the zeroth and on the first generation, and an unambiguous correlation between the alkyl chains (terminal methyl group and methylene groups) and the signals of the aromatic systems located at 6.70, 7.40 and 7.45 ppm and attributed to the $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_0^3\text{-H}$ and $\text{CH}=\text{N}$ moieties respectively (figure 3 left). Another interaction between the alkyl chain and the signals at 6.90 and 7.05 ppm corresponding to the OC_6H_4 groups located on the first generation is also evidenced, while in the 2.4–3.6 ppm region, the terminal methyl group correlates with the $\text{N}(\text{CH}_3)$ groups at 2.95 ppm. The fact that the aromatic rings of the zeroth layer correlate with the aromatic rings of the first layer supports the idea that the extremities of the lateral C_{10} alkyl chains are buried inside lipophilic pockets located within the contracted dendrimer structure. This hypothesis is consistent with the observation of shortened distances between the different moieties of the structure. In addition, the fact that resolution of the spectra obtained in water is much better in the case of **7c-Gc'1** than in the case of **5c-Gc'1** can

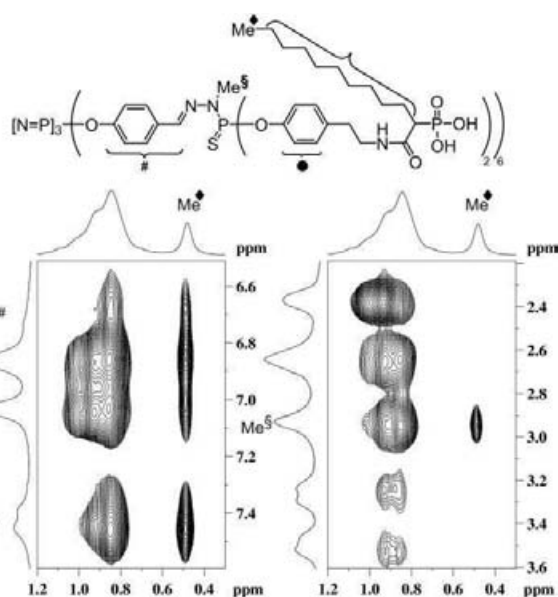


Fig. 3 Selected regions of the NOESY ^1H - ^1H spectrum obtained for **7c-Gc'1**.

be explained by the mutual interaction of the alkyl chain with the dendrimer internal structure, which provides lipophilic pockets to the alkyl chains and is reciprocally “solvated” by the latter.

The collected NMR data indicate an expected segregation between the lipophilic and hydrophilic domains of the dendrimers in water solutions, proving that the lateral alkyl chains of the terminal phosphonic acid monosodium salt functions interact with the dendrimer structure. In the case of **7c-Gc'**₁ strong interactions of the C10 alkyl chains with the interior of the PPH dendrimer structure can be assumed, whereas for **5c-Gc'**₁ the interaction of the C3 alkyl chains with the dendrimer's interior is assumed to be weaker.

Anti-HIV-1 assays

The inhibitory effects of dendrimers **3c-Gc'**₁, **5c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁ against HIV-1 were evaluated *in vitro* on two different types of cell lines, namely CEM-SS and MT-4 cells, according to published procedures.²¹⁻²³ The percentage of inhibition on both cell lines are plotted in figure 4 and 5. Remarkably, none of these three dendrimers present a cytotoxicity on both cell lines for the whole range of concentrations (1×10^{-7} to 1×10^{-4} mol L⁻¹). These results are therefore a guarantee that the measured IC₅₀ effectively correspond to an antiviral activity.

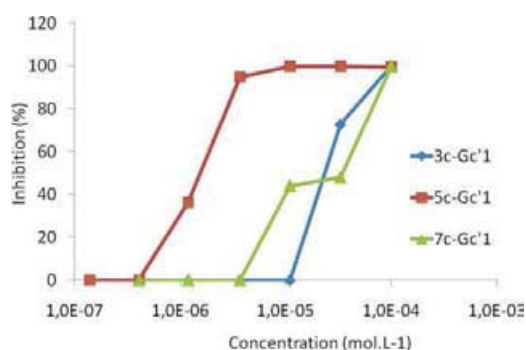


Fig. 4 Inhibition of HIV-1 infection of CEM-SS cells by dendrimers **3c-Gc'**₁, **5c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁.

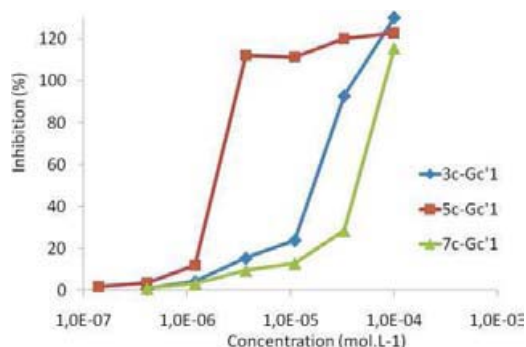


Fig. 5 Inhibition of HIV-1 infection of MT4 cells by dendrimers **3c-Gc'**₁, **5c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁.

The phosphonated dendrimers **3c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁ were found to inhibit HIV replication on CEM-SS cells in the same range of concentration with IC₅₀ values respectively at 2.5×10^{-5} and 1.6×10^{-5} mol L⁻¹ (figure 4). On the contrary, a significant increase in the

inhibitory effect was found for the dendrimer **5c-Gc'**₁, grafted with the short C3 alkyl chain. This dendrimer inhibits HIV-1 replication on CEM-SS cells at 1.5×10^{-6} mol L⁻¹. It is noteworthy that these values were determined by the viral reverse transcriptase titration, representative of the viral activity. To confirm these results, the three dendrimers were then evaluated on MT-4 cells, another T4-lymphoblastoid cell line that is very sensitive to the HIV infection (figure 5).

On this cell line, the antiviral efficiency is directly monitored by the inhibition of the virus-induced cytopathicity. These *in vitro* assays allowed us to confirm the better inhibitory activity of the phosphonated dendrimer equipped with a C3 alkyl chain. Actually, IC₅₀ were evaluated respectively at 1.0×10^{-5} and 3.5×10^{-5} mol L⁻¹ for **3c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁, and 1.5×10^{-6} mol L⁻¹ for **5c-Gc'**₁ (figure 5). The fact that the dendrimer **5c-Gc'**₁ is 10 fold more active than dendrimers **3c-Gc'**₁ (no alkyl chain) and **7c-Gc'**₁ (C10 alkyl chains) can be partially rationalized in the light of the NOESY ¹H-¹H experiments. Actually, one can assume that according to the hypothesis that the C10 alkyl chains of **7c-Gc'**₁ are strongly interacting with the contracted interior of the dendrimer structure, these chains are not available for any further interaction with external partners. In this regard, the fact that compound having a major structural difference like **3c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁ present the same inhibitory activity is not surprising if one considers that the C10 alkyl chains are irreversibly buried in the PPH skeleton. On the contrary, one can assume that the C3 alkyl chains of **5c-Gc'**₁ are more available to interact with the lipophilic regions of the V3 loop, responsible for the increased antiviral activity.

Conclusions

To summarize, we have developed an efficient strategy to synthesize phosphonic acid capped dendrimers equipped with alkyl chains in the vicinity of the surface functions. This strategy is adaptable to a wide range of other surface functions to produce functionalized phosphonic acid capped dendrimers. The three dendrimers were all found to be non-toxic at concentrations up to 1×10^{-4} mol L⁻¹. The inhibitory assays performed both on CEM-SS and MT4 cells indicate that the length of the alkyl chain influences the efficiency of these inhibitors. Actually, a comparable activity was evaluated for both **3c-Gc'**₁ and **7c-Gc'**₁ having respectively no alkyl chain and C10 alkyl chains grafted on α positions of the phosphonic acid terminations, whereas the inhibitory activity **5c-Gc'**₁ having a C3 alkyl chain was found to be 10 fold better. 2D NOESY experiments performed on these compounds in water solutions indicated that the alkyl chains of **7c-Gc'**₁ could be more tightly buried in the internal dendrimer skeleton. The availability of the alkyl chains for external interaction was then assumed to be a key parameter in the design of such anti HIV inhibitors.

Experimental

Chemistry

All manipulations were carried out using standard high-vacuum and dry-argon techniques. Chemicals were used as received and solvents were dried and distilled by routine procedures.²⁴ ¹H, ¹³C, ¹⁹F and ³¹P NMR spectra were recorded at 25 °C with Bruker

AC 200, AV 300, DPX 300, AV 400 or AV500 spectrometers. The following abbreviations were used in reporting spectra: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublets. References for NMR chemical shifts are 85% H_3PO_4 for ^{31}P NMR and SiMe_4 for ^1H and ^{13}C NMR. The attribution of ^{13}C NMR signals was done using J_{mod} , 2D ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^{31}P HMQC, Broad Band or CW ^{31}P decoupling experiments when necessary. Mass spectrometry was recorded on a Finniganmat TSQ 7000. The numbering schemes used for NMR are depicted in Fig. 6. Compound **Gc**₁ was prepared according to published procedures.^{25,26}

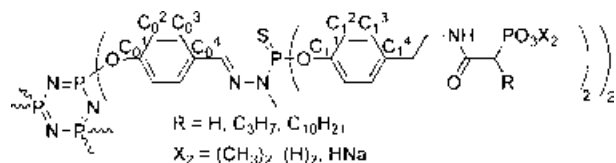


Fig. 6 Numbering scheme for dendrimers **3-Gc'**₁, **5-Gc'**₁ and **7-Gc'**₁.

2. A solution of 20% of TFA in dichloromethane (15 mL) was dropped on *tert*-butyl-2-dimethylphosphonoacetate (100 mg, 0.472 mmol) and the reaction mixture was stirred at RT for 1.5 h. The residue was co-evaporated with ethyl acetate so that remaining traces of TFA were removed upon evaporation to dryness. This sequence was repeated until total disappearance of the signal of TFA in ^{19}F NMR to afford **2** as a white powder (75 mg, 100%). The product was used in the next step without further purification. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 22.7$ ppm (s, PO_3Me_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 3.14$ (d, $^2J_{\text{PH}} = 22.2$ Hz, 2H, PCH_2), 3.89 (d, $^3J_{\text{PH}} = 11.4$ Hz, 6H, OCH_3) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 32.8$ (d, $^1J_{\text{PC}} = 136.5$ Hz, PCH_2), 53.5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.5$ Hz, OCH_3), 167.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.6$ Hz, COOH) ppm.

3. To a vigorously stirred mixture of **2** (117 mg, 0.700 mmol) and HOBT (107 mg, 1.400 mmol) in dry DMF (5 mL) was added DCC (163 mg, 1.400 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at RT for 1h, then a solution of tyramine (197 mg, 1.400 mmol) in dry DMF (1 mL) was added dropwise at 0 °C. The resulting mixture was stirred at RT for 12h and filtered. After solvent removal (lyophilization), the resulting dark red residue was diluted in chloroform (50 mL) and washed with an aqueous solution of HCl (0.1 M, 3×10 mL) and with brine (10 mL). The organic phase was separated, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel flash chromatography (DCM/MeOH, 95:5 then acetone/MeOH, 95:5) to give **3** as a white solid (92 mg, 46%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 25.6$ ppm (s, PO_3Me_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 2.71$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 2H, ArCH_2), 2.84 (d, $^2J_{\text{PH}} = 21.0$ Hz, 2H, PCH_2), 3.46 (q, $^3J_{\text{HH}} = ^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.74 (d, $^3J_{\text{PH}} = 11.4$ Hz, 6H, OCH_3), 6.77 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H, C^2H), 6.81 (m, 1H, NH), 7.00 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H, C^3H) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 34.1$ (d, $^1J_{\text{PC}} = 132.1$ Hz, PCH_2), 34.4 (s, ArCH_2), 41.5 (s, NHCH_2), 53.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.0$ Hz, OCH_3), 115.5 (s, C^2), 129.6 (s, C^4), 129.7 (s, C^3), 155.4 (s, C^1), 163.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4.5$ Hz, CONH) ppm; CI-MS: $m/z = 305$ [$\text{M} + \text{NH}_4$]⁺.

3a-Gc'₁. To a solution of **Gc**₁ (96 mg, 0.053 mmol) in THF (3 mL) were added the phenol **3** (200 mg, 0.690 mmol) and

cesium carbonate (410 mg, 1.260 mmol). The mixture was stirred at RT for 12 h, centrifuged, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by silica-gel flash chromatography (acetone/MeOH/ H_2O , 49:49:2) to give **3a-Gc'**₁ as a white solid (240 mg, 71%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 8.4$ (s, N_3P_3), 25.4 (s, PO_3Me_2), 62.8 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 2.76$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 24H, ArCH_2), 2.83 (d, $^2J_{\text{PH}} = 20.7$ Hz, 24H, PCH_2), 3.24 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.2$ Hz, 18H, NCH_3), 3.43 (q, $^3J_{\text{HH}} = ^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 24H, NHCH_2), 3.72 (d, $^3J_{\text{PH}} = 11.1$ Hz, 72H, OCH_3), 6.99–7.05 (m, 24H, C_0^2H and NH), 7.09 (br s, 48H, C_1^2H and C_1^3H), 7.61 (m, 12H, C_0^3H), 7.64 (m, 6H, $\text{N}=\text{CH}$) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 33.0$ (d, $^2J_{\text{PC}} = 12.2$ Hz, NCH_3), 34.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 131.9$ Hz, PCH_2), 34.8 (s, ArCH_2), 41.1 (s, NHCH_2), 53.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.6$ Hz, OCH_3), 121.3 (s, C_0^2), 121.4 (s, C_1^2), 128.3 (s, C_0^3), 129.8 (s, C_1^3), 132.2 (s, C_0^4), 136.1 (s, C_1^4), 138.7 (d, $^4J_{\text{PC}} = 14.2$ Hz, $\text{N}=\text{CH}$), 149.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.0$ Hz, C_1^1), 151.2 (s, C_0^1), 163.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4.3$ Hz, CONH) ppm.

3b-Gc'₁. To a vigorously stirred solution of **3a-Gc'**₁ (100 mg, 0.021 mmol) in a mixture of dry acetonitrile and dichloromethane (1:1, 2 mL) bromotrimethylsilane (74 μL , 0.570 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 12 h at RT, and then evaporated to dryness under reduced pressure. The crude residue was washed twice with methanol (10 mL) for 1 h at RT and dried under reduced pressure. The resulting white solid was washed with water, methanol and Et_2O to afford **3b-Gc'**₁ as a white solid (89 mg, 94%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 121.5 MHz): $\delta = 8.4$ (s, N_3P_3), 16.9 (s, PO_3H_2), 62.5 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm; ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 200.1 MHz): $\delta = 2.50$ – 2.70 (m, 48H, ArCH_2 and PCH_2), 3.10– 3.30 (m, 42H, NCH_3 and NHCH_2), 6.95– 7.25 (m, 60H, C_0^2H , C_1^2H and C_1^3H), 7.61 (s, 6H, $\text{CH}=\text{N}$), 7.63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, C_0^3H) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 62.9 MHz): $\delta = 32.8$ (br s, NCH_3), 34.3 (s, ArCH_2), 37.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 132.0$ Hz, PCH_2), 120.7 (s, C_1^2 and C_0^2), 128.2 (s, C_0^3), 129.9 (s, C_1^3), 132.0 (s, C_0^4), 136.6 (s, C_1^4), 139.0 (m, $\text{N}=\text{CH}$), 148.4 (m, C_1^1 and C_0^1), 165.4 (s, CONH) ppm.

3c-Gc'₁. The sodium monosalt form was obtained by adding aqueous sodium hydroxide (0.1023 N, 2.58 mL) to a suspension of **3b-Gc'**₁ (100 mg, 0.023 mmol) in water (5 mL) at 0 °C. The solution was filtered on micropore (1.2 μm) and lyophilized to give **3c-Gc'**₁ as a white powder (110 mg, 90%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5 MHz): $\delta = 9.7$ (s, N_3P_3), 13.8 (s, PO_3HNa), 64.0 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm; ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 300.1 MHz): $\delta = 2.86$ (d, $^2J_{\text{PH}} = 21.0$ Hz, 24H, PCH), 2.97 (m, 24H, ArCH_2), 3.49 (d, $^3J_{\text{PH}} = 9.0$ Hz, 18H, NCH_3), 3.55 (m, 24H, NHCH_2), 7.13 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 12H, C_0^2H), 7.31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 24H, C_1^2H), 7.43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, 24 Hz, C_1^3H), 7.85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, 12H, C_0^3H), 8.02 (s, 6H, $\text{N}=\text{CH}$) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 75.5 MHz): $\delta = 32.9$ (d, $^3J_{\text{PC}} = 11.7$ Hz, N-CH_3), 34.3 (s, ArCH_2), 38.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 117.9$ Hz, PCH), 41.2 (s, NHCH_2), 121.3 (s, C_1^2), 121.6 (s, C_0^2), 128.9 (s, C_0^3), 130.3 (s, C_1^3), 132.7 (s, C_0^4), 137.1 (s, C_1^4), 140.0 (s, $\text{N}=\text{CH}$), 148.9 (s, C_1^1), 150.7 (s, C_0^1), 171.0 (s, CONH) ppm.

4a. To a suspension of NaH (24 mg, 1.000 mmol) in DMF (2.5 mL) at 0 °C, was added dropwise a solution of *tert*-butyl-2-dimethylphosphonoacetate (224 mg, 1.000 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred for 1 h. Then, a solution of 1-iodopropane (0.195 mL, 2.000 mmol) and crown 15C5 (20 μL , 0.100 mmol) in DMF (1.0 mL) was dropped. The reaction was stirred at 50 °C

overnight. It was then cooled at RT, diluted in a saturated aqueous solution of NH_4Cl and extracted with Et_2O (2×50 mL). The organic phase was washed with water (2×50 mL) and brine (50 mL) and then it was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure to afford **4a** as a yellow oil (173 mg, 65%). The product was used in the next step without further purification. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 26.3$ (s, PO_3Me_2) ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.20–1.40 (m, 2H, CH_3CH_2), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.60–2.00 (m, 2H, CHCH_xH_y), 2.85–2.95 (m, 1H, PCH), 3.71 (d, $^3J_{\text{PH}} = 4.5$ Hz, 3H, OCH_3), 3.75 (d, $^3J_{\text{PH}} = 4.5$ Hz, 3H, OCH_3) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 13.4$ (s, CH_2CH_3), 21.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.4$ Hz, CHCH_2), 27.7 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.7 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.4$ Hz, CHCH_2CH_2), 44.6 (d, $^1J_{\text{PC}} = 131.8$ Hz, PCH), 53.5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.0$ Hz, OCH_3), 53.7 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.6$ Hz, OCH_3), 82.0 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 170.7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 4.3$ Hz, COO) ppm.

4b. A solution of 20% of TFA in dichloromethane (15 mL) was dropped on **4a** (120 mg, 0.450 mmol) and the reaction mixture was stirred at RT for 1.5 h. The residue was co-evaporated with ethyl acetate so that remaining traces of TFA were removed upon evaporation to dryness. This sequence was repeated until total disappearance of the signal of TFA in ^{19}F NMR to afford **4b** as a white powder (95 mg, 100%). The product was used in the next step without further purification. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 25.3$ (s, PO_3Me_2) ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 0.96$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.30–1.55 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1.75–2.05 (m, 2H, CHCH_xH_y), 3.13 (ddd, $^2J_{\text{PH}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{HHx}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{HHy}} = 3.0$ Hz, 1H, PCH), 3.86 (2 d, $^3J_{\text{PH}} = 5.4$ Hz, 3H, OCH_3), 3.89 (d, $^3J_{\text{PH}} = 5.4$ Hz, 3H, OCH_3) ppm, (COOH could not be detected); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 13.3$ (s, CH_2CH_3), 21.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11.2$ Hz, CHCH_2), 28.5 (d, $^3J_{\text{PC}} = 4.0$ Hz, CH_3CH_2), 44.5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 100.8$ Hz, PCH), 54.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.3$ Hz, OCH_3), 54.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.1$ Hz, OCH_3), 174.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2.9$ Hz, COO) ppm.

5. To a vigorously stirred mixture of **4b** (147 mg, 0.7 mmol), HOBt (107 mg, 1.4 mmol) and dry DMF (5 mL) was added DCC (163 mg, 1.4 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at RT for 1 h, then, a solution of tyramine (197 mg, 1.4 mmol) in dry DMF (1 mL) was added dropwise at 0 °C. The resulting mixture was stirred at RT for 12 h and filtered. After solvent removal (lyophilisation), the resulting dark red residue was diluted in chloroform (50 mL) and washed with HCl_{aq} (0.1 M, 3×10 mL) and brine (10 mL). The organic phase was separated, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel flash chromatography (DCM/MeOH, 95:5 then acetone) to afford **5** as a white solid (122 mg, 53%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 28.3$ ppm (s, PO_3Me_2) ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 0.91$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.20–1.50 (m, 2H, CH_3CH_2), 1.70–1.95 (m, 2H, CHCH_xH_y), 2.66–2.78 (m, 2H, PCH and ArCH_2), 3.51 (q, $^3J_{\text{HH}} = ^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.75 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.5$ Hz, 3H, OCH_3), 3.76 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.5$ Hz, 3H, OCH_3), 6.30 (br s, 1H, NH), 6.58 (s, 1H, OH), 6.78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 2H, C^2H), 7.05 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H, C^3H) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 13.7$ (s, CH_2CH_3), 21.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14.3$ Hz, CHCH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4.5$ Hz, CHCH_2CH_2), 34.4 (s, ArCH_2), 41.3 (s, NHCH_2), 45.9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 130.6$ Hz, PCH), 53.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.6$ Hz, OCH_3), 53.6 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, OCH_3), 115.5

(s, C^2), 129.7 (s, C^3 and C^4), 155.3 (s, C^1), 167.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2.3$ Hz, CONH) ppm; CI-MS: $m/z = 361$ [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$.

5a-Gc'. To a solution of **Gc**₁ (167 mg, 0.091 mmol) in THF (3 mL) were added the phenol **5** (400 mg, 1.210 mmol) and cesium carbonate (720 mg, 2.200 mmol). The mixture was stirred for 12 h at RT, centrifuged, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by silica-gel flash chromatography (DCM/MeOH 80:20 then acetone/MeOH, 95:5) to give **5a-Gc'** as a white solid (240 mg, 71%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz): $\delta = 8.4$ (s, N_3P_3), 28.2 (s, PO_3Me_2), 62.9 (s, P=S) ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 0.86$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1.10–1.40 (m, 24H, CH_3CH_2), 1.60–2.00 (m, 24H, CHCH_xH_y), 2.61–2.82 (m, 36H, ArCH_2 and PCH), 3.22 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.2$ Hz, 18H, NCH_3), 3.43 (br s, 24H, NHCH_2), 3.68 (d, $^3J_{\text{PH}} = 8.7$ Hz, 36H, OCH_3), 3.72 (d, $^3J_{\text{PH}} = 8.1$ Hz, 36H, OCH_3), 6.76–6.98 (br s, 12H, NH), 6.98 (d, $^2J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, C_0^2H), 7.08 (br s, 48H, C_1^2H and C_1^3H), 7.50–7.64 (m, 18H, C_0^3H and $\text{N}=\text{CH}$) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 13.7$ (s, CH_2CH_3), 21.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.1$ Hz, CHCH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 3.8$ Hz, CHCH_2), 33.0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 12.1$ Hz, NCH_3), 34.8 (s, ArCH_2), 41.0 (s, NHCH_2), 45.8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 130.6$ Hz, PCH), 53.0 (br s, OCH_3), 53.4 (br s, OCH_3), 121.3 (s, C_1^2 and C_0^2), 128.3 (s, C_0^3), 129.8 (s, C_1^3), 132.2 (s, C_0^4), 136.1 (s, C_1^4), 138.7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14.3$ Hz, $\text{N}=\text{CH}$), 149.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, C_1^1), 151.2 (s, C_0^1), 167.5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2.3$ Hz, CONH) ppm.

5b-Gc'. To a vigorously stirred solution of **5a-Gc'** (100 mg, 0.018 mmol) in a mixture of dry acetonitrile and dichloromethane (1:1, 2 mL) bromotrimethylsilane (67 μL , 0.520 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 12 h at RT, and then dried under reduced pressure. The crude residue was washed twice with methanol (2×10 mL) for 1 h at RT and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting white solid was washed once with water, once with methanol and once again with Et_2O to afford **5b-Gc'** as a white solid (83 mg, 92%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD , 121.5 MHz): $\delta = 9.3$ (s, N_3P_3), 23.2 (s, PO_3H_2), 62.8 (s, P=S) ppm; ^1H NMR (CD_3OD , 300.1 MHz): $\delta = 0.76$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1.07–1.24 (m, 24H, CH_3CH_2), 1.40–1.90 (m, 24H, CHCH_xH_y), 2.64 (br s, 36H, ArCH_2 and PCH), 3.19–3.29 (m, 42H, NCH_3 and NHCH_2), 7.02 (m, 36H, C_0^2H and C_1^2H), 7.15 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 48H, C_1^3H), 7.63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 12H, C_0^3H), 7.73–8.01 (m, 18H, $\text{N}=\text{CH}$ and NH) ppm; ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75.5 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH_2CH_3), 21.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.9$ Hz, CH_3CH_2), 29.3 (br s, CHCH_2), 33.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11.3$ Hz, NCH_3), 34.8 (s, ArCH_2), 41.2 (s, NH-CH_2), 46.9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 129.1$ Hz, PCH), 121.1 (s, C_1^2), 121.4 (s, C_0^2), 128.7 (s, C_0^3), 130.4 (s, C_1^3), 132.7 (s, C_0^4), 137.2 (s, C_1^4), 140.4 (s, $\text{N}=\text{CH}$), 148.8 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, C_1^1), 150.9 (s, C_0^1), 169.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4.5$ Hz, CONH) ppm.

5c-Gc'. The sodium monosalt form was obtained by adding aqueous sodium hydroxide (0.1023 N, 2.58 mL) to a suspension of **5b-Gc'** (100 mg, 0.021 mmol) in water (3 mL) at 0 °C. The solution was filtered on micropore (1.2 μm) and lyophilized to give **5c-Gc'** as a white powder (110 mg, 91%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5 MHz): $\delta = 9.9$ (s, N_3P_3), 17.4 (s, PO_3HNa), 63.5 (s, P=S) ppm; ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 300.1 MHz): $\delta = 1.09$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 36H, CH_2CH_3), 1.35–1.61 (m, 24H, CH_3CH_2), 1.85–2.08 (m, 24H, CHCH_xH_y), 2.59–2.71 (m, 12H, PCH), 3.01–3.12 (m, 24H, ArCH_2), 3.55 (d, $^3J_{\text{PH}} = 12.0$ Hz, 18H, NCH_3), 3.65–3.76 (m, 24H, NHCH_2), 7.20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, 12H, C_0^2H),

7.37 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 24H, C₁²H), 7.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, 24H, C₁³H), 7.90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 12H, C₀³H), 8.09 (s, 6H, N=CH) ppm; ^{13}C NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 100.6 MHz): $\delta = 13.3$ (s, CH₂CH₃), 21.6 (s, CHCH₂), 31.3 (s, CH₂CH₂), 32.8 (d, $^2J_{\text{PC}} = 22.4$ Hz, NCH₃), 34.0 (s, ArCH₂), 40.3 (s, NHCH₂), 49.9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 121.1$ Hz, PCH), 120.8 (br s, C₀² and C₁²), 128.4 (s, C₀³), 130.0 (s, C₁³), 136.5 (s, C₁⁴), 139.5 (s, N=CH), 148.5 (s, C₁¹), 150.8 (s, C₀¹), 174.0 (s, CONH) ppm (C₀⁴ could not be detected).

6a. To a suspension of NaH (24 mg, 1 mmol) in DMF (2.5 mL) at 0 °C, we added dropwise a solution of *tert*-butyl-P,P-dimethylphosphonoacetate (224 mg, 1 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred during 1 h. Then, a solution of 1-iododecane (0.426 mL, 2 mmol) and crown 15C5 (20 μL , 0.1 mmol) in DMF (1.0 mL) was dropped. The reaction was stirred at 50 °C overnight. It was then cooled at RT, diluted in a saturated aqueous solution of NH₄Cl and extracted with Et₂O (2 \times 50 mL). The organic phase was washed with water (2 \times 50 mL) and brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure to afford **6a** as a yellow oil (219 mg, 60%). The product was used in the next step without further purification. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): $\delta = 29.7$ (s, PO₃Me₂) ppm; ^1H NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): $\delta = 0.80$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.18 (br s, 16H, CH₂), 1.60–2.00 (m, 2H, CHCH_xH_y), 2.78 (ddd, $^2J_{\text{PH}} = 22.0$ Hz, $^3J_{\text{HHx}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{HHy}} = 4.0$ Hz, 1H, PCH), 3.68 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.0$ Hz, 3H, OCH₃), 3.74 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.0$ Hz, 3H, OCH₃) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH₂CH₃), 22.6 (s, CH₂), 26.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 4.5$ Hz, CH₂), 27.9 (s, C(CH₃)₃), 28.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.5$ Hz, CH₂), 29.0–31.9 (m, CH₂), 46.1 (d, $^1J_{\text{PC}} = 127.0$ Hz, PCH), 53.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.5$ Hz, OCH₃), 53.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.5$ Hz, OCH₃), 81.7 (s, C(CH₃)₃), 168.1 (d, $^3J_{\text{PC}} = 2.5$ Hz, COO) ppm.

6b. A solution of 20% of TFA in dichloromethane (15 mL) was dropped on **6a** (164 mg, 0.450 mmol) and the reaction mixture was stirred at RT for 1.5 h. The residue was co-evaporated with ethyl acetate so that remaining traces of TFA were removed upon evaporation to dryness. This sequence was repeated until total disappearance of the signal of TFA in ^{19}F NMR to afford **6b** as a white powder (75 mg, 100%). The product was used in the next step without further purification. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): $\delta = 29.9$ (s, PO₃Me₂) ppm; ^1H NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): $\delta = 0.86$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.23 (br s, 16H, CH₂), 1.60–2.05 (m, 2H, CHCH_xH_y), 2.98 (ddd, $^2J_{\text{PH}} = 24.0$ Hz, $^3J_{\text{HHx}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{HHy}} = 3.4$ Hz, 1H, PCH), 3.79 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.0$ Hz, 3H, OCH₃), 3.83 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.0$ Hz, 3H, OCH₃), 9.13 (s, 1H, COOH) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH₂CH₃), 22.6 (s, CH₂), 26.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.1$ Hz, CH₂), 28.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 19.5$ Hz, CH₂), 29.0–31.9 (m, CH₂), 45.1 (d, $^1J_{\text{PC}} = 130.0$ Hz, PCH), 53.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.0$ Hz, OCH₃), 53.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.0$ Hz, OCH₃), 171.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 2.0$ Hz, COO) ppm.

7. To a vigorously stirred mixture of **6b** (215 mg, 0.7 mmol), HOBt (107 mg, 1.4 mmol) and dry DMF (5 mL) was added DCC (163 mg, 1.4 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at RT for 1 h, then, a solution of tyramine (197 mg, 1.4 mmol) in dry DMF (1 mL) was added dropwise at 0 °C. The resulting mixture was stirred at RT for 12 h and filtered. After solvent removal (lyophilisation), the resulting dark red residue was diluted in chloroform (50 mL) and was washed with HCl_{aq} (0.1 M, 3 \times

10 mL) and brine (10 mL). The organic phase was separated, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel flash chromatography (DCM/MeOH, 95:5 than acetone) to afford **2c** as a white solid (185 mg, 62%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): $\delta = 28.4$ (PO₃Me₂) ppm; ^1H NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): $\delta = 0.89$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.26 (br s, 16H, CH₂), 1.70–1.90 (m, 2H, CHCH_xH_y), 2.68 (ddd, $^2J_{\text{PH}} = 14.7$ Hz, $^3J_{\text{HHx}} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{HHy}} = 4.2$ Hz, 1H, PCH), 2.75 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 2H, ArCH₂), 3.51 (q, $^3J_{\text{HH}} = ^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.74 (d, $^3J_{\text{PH}} = 11.1$ Hz, 3H, OCH₃), 3.77 ($^3J_{\text{PH}} = 11.1$ Hz, 3H, OCH₃), 6.32 (m, 1H, NH), 6.78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H, C²H), 7.04 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H, C³H) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH₂CH₃), 22.7 (s, CH₂), 27.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.3$ Hz, CH₂), 28.1 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.1$ Hz, CH₂), 29.2–31.9 (m, CH₂), 34.7 (s, ArCH₂), 41.3 (s, NHCH₂), 46.1 (d, $^1J_{\text{PC}} = 130.6$ Hz, PCH), 53.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, OCH₃), 53.4 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, OCH₃), 115.5 (s, C²), 129.7 (s, C³), 130.0 (s, C⁴), 155.0 (s, C¹), 167.3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2.3$ Hz, CONH) ppm. CI-MS: $m/z = 445$ [M + NH₄]⁺.

7a-Gc¹. To a solution of **Gc₁** (150 mg, 0.081 mmol) in THF (3 mL) were added the phenol **7** (200 mg, 0.69 mmol) and cesium carbonate (457 mg, 1.06 mmol). The mixture was stirred for 12 h at RT, centrifuged, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by silica-gel flash chromatography (DCM/MeOH, 80:20 then acetone/MeOH, 95:5) to give **7a-Gc¹** as a white solid (407 mg, 77%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): $\delta = 8.4$ (s, N₃P₃), 28.1 (s, PO₃Me₂), 63.0 ppm (s, P=S); ^1H NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 36H, CH₂CH₃), 1.25 (br s, 192H, CH₂), 1.60–2.10 (m, 24H, CHCH_xH_y), 2.73–2.79 (m, 36H, ArCH₂ and PCH), 3.24 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.2$ Hz, 18H, NCH₃), 3.35–3.52 (m, 24H, NHCH₂), 3.71 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.8$ Hz, 18H, OCH₃), 3.75 (d, $^3J_{\text{PH}} = 9.6$ Hz, 36H, OCH₃), 6.90 (br s, 12H, NH), 7.1 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 12H, C₀²H), 7.10 (br s, 48 H, C₁²H and C₁³H), 7.64 (m, 18H, C₀³H and N=CH) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH₂CH₃), 22.7 (s, CH₂), 27.1 (s, CH₂), 28.2 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14.3$ Hz, CH₂), 29.2–31.8 (s, CH₂), 32.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 11.9$ Hz, NCH₃), 34.9 (s, ArCH₂), 41.1 (s, NHCH₂), 45.9 (d, $^1J_{\text{PC}} = 129.4$ Hz, PCH), 53.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 38.6$ Hz, OCH₃), 121.81 (s, C₁² and C₀²), 128.2 (s, C₁³), 132.1 (s, C₀⁴), 136.1 (s, C₁⁴), 138.7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 14.0$ Hz, N=CH), 149.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 27.0$ Hz, C₁¹), 151.2 (s, C₀¹), 167.6 (s, CONH) ppm.

7b-Gc¹. To a vigorously stirred solution of **7a-Gc¹** (100 mg, 0.018 mmol) in a mixture of dry acetonitrile and dichloromethane (1:1, 2 mL) bromotrimethylsilane (67 μL , 0.520 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred at RT for 12 h and then evaporated to dryness under reduced pressure. The crude residue was washed twice with methanol (10 mL) for 1 h at RT and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting white solid was washed with water, methanol and with Et₂O to afford **2f** as a white solid (83 mg, 92%). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CD₃OD, 161.9 MHz): $\delta = 9.3$ (s, N₃P₃), 22.8 (s, PO₃H₂), 62.8 (s, P=S) ppm; ^1H NMR (CD₃OD, 400.1 MHz): $\delta = 0.94$ (br s, 36H, CH₂CH₃), 1.33 (br s, 192H, CH₂), 1.70–2.10 (m, 24H, CHCH_xH_y), 2.82 (br s, 36H, ArCH₂, PCH), 3.29 (d, $^3J_{\text{PH}} = 7.2$ Hz, 18H, NCH₃), 3.52 (br s, 24H, NHCH₂), 6.95 (br s, 12H, C₀²H), 7.17 (m, 48H, C₁²H and C₁³H), 7.70 (m, 12H, C₀³H), 7.8 (s, 6H, N=CH) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CD₃OD, 100.6 MHz): $\delta = 13.3$ (s, CH₂CH₃), 22.4 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 28.0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 16.2$ Hz, CH₂), 29.0–31.8 (m, CH₂), 32.6 (d,

$^2J_{PC} = 10.8$, NCH₃), 34.5 (s, ArCH₂), 40.8 (s, NHCH₂), 46.5 (d, $^1J_{PC} = 26.8$ Hz, PCH), 121.1 (s, C₁²), 121.3 (s, C₀²), 128.2 (s, C₀³), 129.7 (s, C₁³), 132.7 (s, C₀⁴), 136.5 (s, C₁⁴), 138.9 (d, $^3J_{PC} = 12.7$ Hz, N=CH), 149.2 (d, $^2J_{PC} = 7.1$ Hz, C₁¹), 151.0 (s, C₀¹), 170.2 (s, CONH) ppm.

7c-Gc'. The sodium monosalt form was obtained by adding aqueous sodium hydroxide (0.1023 N, 2.58 mL) to a suspension of **7b-Gc'** (100 mg, 0.017 mmol) in water (3 mL) at 0 °C. The solution was filtered on micropore (1.2 µm) and lyophilized to afford **7c-Gc'** as a white powder (110 mg, 95%). $\delta = 9.1$ (s, N₃P₃), 16.5 (s, PO₃HNa), 64.0 (s, P=S) ppm; $^1\text{H NMR}$ (D₂O/CD₃CN, 3:1, 500.3 MHz): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 36H, CH₂CH₃), 1.13–1.61 (m, 192H, CH₂), 1.90 (br s, 24H, CHCH₂), 2.62 (br s, 12H, PCH), 3.01 (m, 24H, ArCH₂), 3.45–3.80 (m, 42H, NCH₃ and NHCH₂), 7.11 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, 12H, C₀²H), 7.30 (br s, 24H, C₁²H), 7.42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 24H, C₁³H), 7.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 12H, C₀³H), 7.95 (s, 6H, N=CH) ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 125.8 MHz): $\delta = 14.0$ (s, CH₂CH₃), 22.7 (s, CH₂), 28.8 (d, $^2J_{PC} = 13.9$ Hz, CH₂), 29.2–29.8 (m, CH₂), 33.0 (d, $^3J_{PC} = 7.3$ Hz, NCH₃), 34.4 (s, CH₂), 40.5 (s, NHCH₂), 50.2 (d, $^2J_{PC} = 115.9$ Hz, PCH), 121.3 (s, C₀² and C₁²), 128.4 (s, C₄¹), 141.6 (s, C₀⁴), 149.0 (s, C₁¹), 151.3 (s, C₀¹), 175.1 (s, CONH) ppm.

Antiviral assays

CEM-SS and MT4 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (heated at 56 °C for 30 min). CEM-SS cells were infected with HIV-1 LAI and the production of virus was evaluated after five days, by measuring the reverse transcriptase (RT) which expresses the presence of HIV in the supernatant culture medium. RT inhibition percentage, providing IC₅₀ values (concentration of drug at which virus production is inhibited by 50%), was determined in comparison with the non-treated cells. MT4 cells were infected with HIV-1 IIIB. The determination of the antiviral activity of the tested compounds was based on a reduction of HIV-1-induced pathogenicity, the metabolic activity of the cells being measured by the ability of mitochondrial dehydrogenases to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan. The produced quantity of formazan (characterized by OD₅₄₀) is directly proportional to the number of living cells and to the IC₅₀.

Acknowledgements

The European Community is acknowledged for funding support (A. P.-A., Marie Curie EST "Nanotool" and G. S., FSE-Fonds Social Européen). The ANRS is acknowledged for molecular screening.

Notes and references

- 1 E. A. Berger, P. M. Murphy and J. M. Farber, *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, **17**, 657.
- 2 T. Matthews, M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi and D. Bolognesi, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2004, **3**, 215–225.
- 3 M. Moulard, H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong and Q. J. Sattentau, *J. Virol.*, 2000, **74**, 1948–1960.
- 4 J. Weber, K. Desai and J. Darbyshire, *PLoS Med.*, 2005, **2**, e142.
- 5 A. Mulder, J. Huskens and D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 3409–3424.
- 6 E. Buhleier, F. Wehner and F. Vögtle, *Synthesis*, 1978, **78**, 155–158.
- 7 O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2009, DOI: 10.1039/b901054h.
- 8 T. D. McCarthy, P. Karellas, S. A. Henderson, M. Giannis, D. F. O'Keefe, G. Heery, J. R. A. Paull, B. R. Matthews and G. Holan, *Mol. Pharm.*, 2005, **2**, 312–318.
- 9 A. R. Borges and C. L. Schengrund, *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2005, **5**, 247–254.
- 10 M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2754–2794.
- 11 P. I. Kitov and D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 16271–16284.
- 12 I. Rico-Lattes, M. F. Gouzy, C. André-Barrès, B. Guidetti and A. Lattes, *New J. Chem.*, 1998, 451–457.
- 13 J. Fantini, D. Hammache, O. Delezay, N. Yahi, C. André-Barrès, I. Rico-Lattes and A. Lattes, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 7245–7252.
- 14 M. Blanzat, C. O. Turrin, A. M. Aubertin, C. Couturier-Vidal, A. M. Caminade, J. P. Majoral, I. Rico-Lattes and A. Lattes, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 2207–2213.
- 15 A. M. Caminade, C. O. Turrin, R. Laurent, A. Maraval and J. P. Majoral, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 2333–2355.
- 16 L. Griffé, M. Poupot, P. Marchand, A. Maraval, C. O. Turrin, O. Rolland, P. Métivier, G. Bacquet, J. J. Fournié, A. M. Caminade, R. Poupot and J. P. Majoral, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2523–2526.
- 17 J. C. Blais, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5097–5105.
- 18 O. Rolland, L. Griffé, M. Poupot, A. Maraval, A. Ouali, Y. Coppel, J. J. Fournié, G. Bacquet, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. P. Majoral and R. Poupot, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 4836–4850.
- 19 M. Blanzat, C. O. Turrin, E. Perez, I. Rico-Lattes, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *Chem. Commun.*, 2002, 1864–1865.
- 20 J. Leclaire, R. Dagiral, S. Fery-Forgues, Y. Coppel, B. Donnadiou, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15762–15770.
- 21 C. Moog, A. Wick, P. L. Ber, A. Kirn and A.-M. Aubertin, *Antivir. Res.*, 1994, **24**, 275.
- 22 R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter and E. D. Clercq, *J. Virol. Methods*, 1988, **20**, 309.
- 23 V. Peytoux, R. Condom, N. Patino, R. Guedj, A.-M. Aubertin, N. Gelus, C. Bailly, R. Terreux and D. Cabrol-Bass, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 4042–4053.
- 24 D. D. Perrin and W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals, Third Edition*, Oxford, 1988.
- 25 N. Launay, A. M. Caminade, R. Lahana and J. P. Majoral, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 1589–1592.
- 26 N. Launay, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *J. Organomet. Chem.*, 1997, **529**, 51–58.



Multivalent cationic GalCer analogs derived from first generation dendrimeric phosphonic acids

Alexandra Pérez-Anes^{a,b,c}, Cristina Stefanu^c, Christine Moog^d, Jean-Pierre Majoral^{a,b}, Muriel Blanzat^{c,*}, Cédric-Olivier Turrin^{a,b,*}, Anne-Marie Caminade^{a,b}, Isabelle Rico-Lattes^c

^aLaboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, UPR 8241, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

^bUniversité de Toulouse, UPS, INPT, LCC, F-31077 Toulouse, France

^cLaboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, CNRS UMR5623, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

^dInstitut de Virologie, INSERM U544, Faculté de Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2009

Revised 27 October 2009

Accepted 29 October 2009

Available online 3 November 2009

Keywords:

Dendrimer

Galcer

Galactosylceramide

ABSTRACT

The synthesis and characterization of a new series of cationic multivalent analogs of GalCer is described. These systems are based on phosphonic acid terminated dendrimers and *N*-hexadecylamino lactitol moieties. Despite important structural differences that affect the dendrimers' outer-shell, these supramolecular assemblies showed a fairly comparable anti-HIV-1 activity. All compounds have submicromolar IC₅₀ in a cell-based HIV-infection model but also a high general cytotoxicity.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dendrimers are receiving a constantly increasing attention since the first synthesis was published by Vögtle and his co-workers.¹ Their globular and well-defined structure and the relative ease of discrete functionalization of their architecture make these macromolecules attractive scaffolds for biomedical applications.² Indeed, water-soluble dendrimers are efficient carriers of active substances that can be entrapped within the dendrimer's architecture³ or formulated with the latter.⁴ Another option is to graft covalently a drug or a pro-drug on the surface of a dendrimer,⁵ either with a complete capping of the surface, or in a statistical manner,⁶ leaving free sites to graft other molecules of interest like targeting moieties and/or fluorescent tags.

In the specific field of dendrimers designed for antiviral purposes,⁷ these strategies based on covalent grafting or cargo loading have also been developed with a special emphasis on multivalency.^{8,9} For instance, poly(propyleneimine) (PPI) tuftsin-dendrimer conjugates, a natural phagocytosis stimulating peptide that binds to macrophages, have been loaded with efavirenz.¹⁰ The same authors have loaded mannose capped PPI dendrimers with antiretroviral drug lamivudine and observed a significant increase

of its activity, cellular uptake and a reduced cytotoxicity.¹¹ Other strategies include the use of dendrimers to transfect suitable silencing RNA to infected lymphocytes and reduce HIV replication.¹²

The highly glycosylated glycoprotein gp120 present on the surface HIV-1 is also a key target to block the virus infection. Its recognition by CD4(+) and the subsequent formation of a ternary complex involving gp120, CD4 and co-receptors (namely CCR5 and CXCR4)¹³ is a pivotal step of the infection. In this regard, Schengrund et al. have reported on randomly sulfonated galactose-terminated PPI dendrimers^{14,15} as efficient *in vitro* binding antagonists for HIV-1. Recently, dendrimeric oligomannose glycans have been designed to mimic a mannose cluster identified as the epitope recognized by the HIV-1-neutralizing monoclonal antibody 2G12. These dendrimeric oligomannose glycans were found to strongly inhibit the binding of gp120 to 2G12.¹⁶ The virus can also infect CD4(−) cells through gp120 binding to galactosylceramide (GalCer).¹⁷ It has been shown that GalCer is directly interacting with gp41,¹⁸ and that gp120 is also expressed at the surface of infected cells.¹⁹ Consequently, the gp120/GalCer interactions have become a relevant target in view of blocking both CD4(+)-mediated and alternative CD4(−)-mediated infection pathways.^{20,21} In this respect, anionic polymers²² and dendrimers²³ have been used to inhibit HIV-1 infection by preventing virus-cell fusion through ionic interactions with the V3 loop of gp120 and led to barrier gels for topical use that are currently under clinical trials,²⁴ like Vivagel, a gel based on poly-L-lysine dendrimers with naphthalene sulfonic

* Corresponding authors. Tel.: +33 (0)561 557 375; fax: +33 (0) 561 558 155 (M.B.); tel.: +33 (0)561 333 134; fax: +33 (0)561 553 003 (C.-O.T.).

E-mail addresses: blanzat@chimie.ups-tlse.fr (M. Blanzat), turrin@lcc-toulouse.fr (C.-O. Turrin).

terminations.²⁵ These gels are based on polyanionic compounds, and to the best of our knowledge, none of them was designed with specific targeting moieties able to disrupt the HIV-1-CD4 or HIV-1-GalCer interactions.

In the past, we have developed a simple approach to design multivalent GalCer analogs^{4,26} based on catanionic systems,^{27–30} that proved to be good HIV-1 inhibitors. The influence of the core functionality of the PPH (poly(phosphorhydrazone)) dendrimeric structure³¹ was clearly identified, and the bioactivities were found to be core-dependent but not generation dependent. Noteworthy, the influence of the outer-shell had not been studied to date. In this respect, we present here a collection of new multivalent catanionic systems based on various first generation phosphonic acid terminated dendrimers and *N*-hexadecylamino-lactitol moieties in order to evaluate the direct influence of the vicinity of the phosphonic acid on the HIV-1 inhibitory properties of both the corresponding mono sodium salts and the related catanionic assemblies.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The general synthetic strategy is based on the conversion of dimethylphosphonate terminated dendrimers **1a-G1** to **6a-G1** (G stands for generation) to the corresponding poly-phosphonic acids **1b-G1** to **6b-G1** by means of a silylation-methanolysis procedure (Fig. 1).³² The reaction proceeds cleanly in dilute acetonitrile solutions (1–10 mmol L⁻¹) in 24 h at room temperature, using 2.5–3 equiv of bromotrimethylsilane per phosphonate.³³ In many cases, attempts to shorten the reaction time by a temperature elevation resulted in partial degradation of the dendrimeric structure. It is worth noting that the reaction can also be run in dichloromethane without major change. The acidic dendrimers were then converted to the corresponding mono sodium salts **1c-G1** to **6c-G1** (Fig. 1) by addition

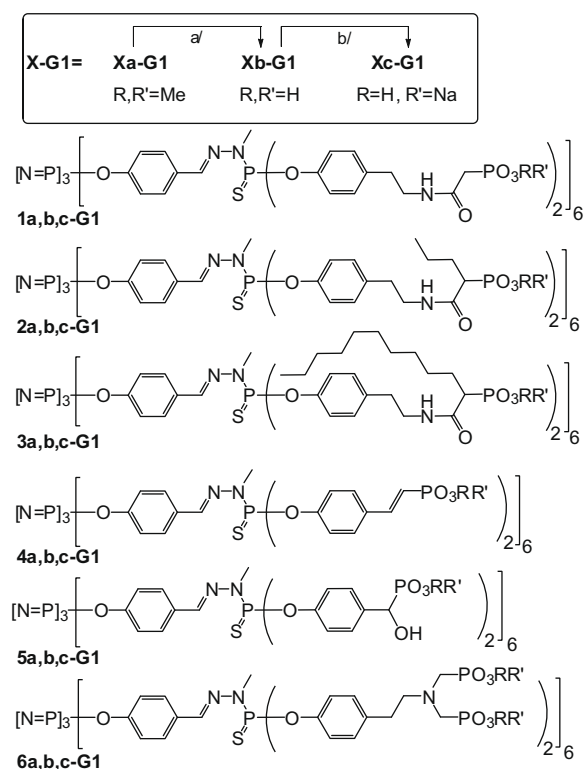


Figure 1. Collection of phosphonate-terminated dendrimers used as multivalent catanionic GalCer precursors ((a) BrSiMe₃, MeOH; (b) HONa).

of the stoichiometric amount of sodium hydroxide to a suspension of the acidic dendrimers in water. Alternatively, the catanionic assemblies **1d-G1** to **6d-G1** (Fig. 2) were obtained quantitatively by adding a stoichiometric amount of *N*-hexadecylamino-lactitol to the dendrimers suspended in water or in a water–propanol mixture. All compounds were fully characterized by multinucleus NMR. As previously reported, mass spectrometry is not compatible with the PPH (poly-phosphorhydrazone) dendrimeric structures³⁴ used in this study, nevertheless this technique was used for key intermediate compounds.

A first series of PPH dendrimers **1-G1** to **3-G1** bearing phosphonic acid moieties and lateral alkyl chains was prepared according to a phenol grafting procedure involving the use of tyramine-based dimethyl-phosphonoacetate with a pendant alkyl chain of variable length on the activated methylene position.³⁵ The dendrimers **1a-G1** to **3a-G1** were converted to the corresponding phosphonic acids monosodium salts **1c-G1** to **3c-G1**.

The dendrimeric catanionic systems were obtained by mixture of the acidic terminated dendrimers with 12 equiv of *N*-hexadecylamino-lactitol in water. The reaction mixture evolves from a heterogeneous mixture, in which the phosphonic acid terminated dendrimers are suspended, to a turbid and then clear solution. Interestingly, the effect of the alkyl chain on the formation of the catanionic assemblies was not linear. Indeed, **1d-G1** and **3d-G1** were obtained in 24 h, whereas **2d-G1** was obtained in three days. In this respect, we have recently shown³⁵ that the interactions of the C3 alkyl chains of **2c-G1** with the interior of the dendrimer structure were weaker than the interactions of the C10 alkyl chains of **3c-G1** with the same structure. This phenomenon can be explained by the localization of the alkyl chains of **3b-G1** which can be assumed to be more tightly buried within the interior of the structure. On the contrary, the C3 alkyl chains of **2b-G1** are less pre-organized within the dendrimeric structure and have more degrees of freedom. Consequently, the formation of the assembly **2d-G1** may be entropically more demanding. As expected for these phosphorus-containing structures, all reactions were easily monitored by ³¹P NMR (Table 1), for instance the conversion of the parent phosphonate moieties to the phosphonic acids is accompanied on the ³¹P NMR spectra by a shielding of the corresponding singlet from 28.2 ppm to 23.2 ppm in the case of **2-G1**. Upon addition of 12 equiv of sodium hydroxide this singlet is shielded to 17.4 ppm for **2c-G1**, while the formation of **2d-G1** is traduced by the appearance of a singlet at 16.8 ppm. Remarkably, the other regions of the spectrum, namely the singlets located in the 8–9 ppm and 62–64 ppm regions and attributed to the cyclotriphosphazene core and the PS atoms of the divergent points, respectively, are not affected by the whole procedure.

A new vinyl-dimethylphosphonate terminated dendrimer **4a-G1** was also prepared, and successfully converted into the corresponding vinyl-phosphonic acid capped dendrimer **4b-G1**. The first step involves a Horner–Wadsworth–Emmons reaction between the aldehyde terminated PPH dendrimer **G1** and tetramethylmethylene-*gem*-diphosphonate (Scheme 1) with sodium hydride as a base. The reaction proceeds cleanly at room temperature, and the removal of side product sodium dimethylphosphate was performed by column chromatography. Again, the reaction was followed by NMR, allowing us to observe the total disappearance of the signals corresponding to the aldehyde proton of **G1** ($\delta(^1\text{H}) = 9.97$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 189.9$ ppm), and the appearance of two sets of doublets on the ¹H NMR spectrum at 6.10 ppm and 7.35 ppm, with a typical ³J_{HHtrans} = 17.4 Hz, corresponding, respectively to the C₆H₄CH and CH–P proton of the vinyl group. The next step was again followed by ³¹P NMR, which shows the total disappearance of the singlet located at 21.9 ppm attributed to the PO₃Me₂ moieties of **4a-G1** and the appearance of a singlet at 13.6 ppm corresponding to the PO₃H₂ moieties of **4b-G1**. The

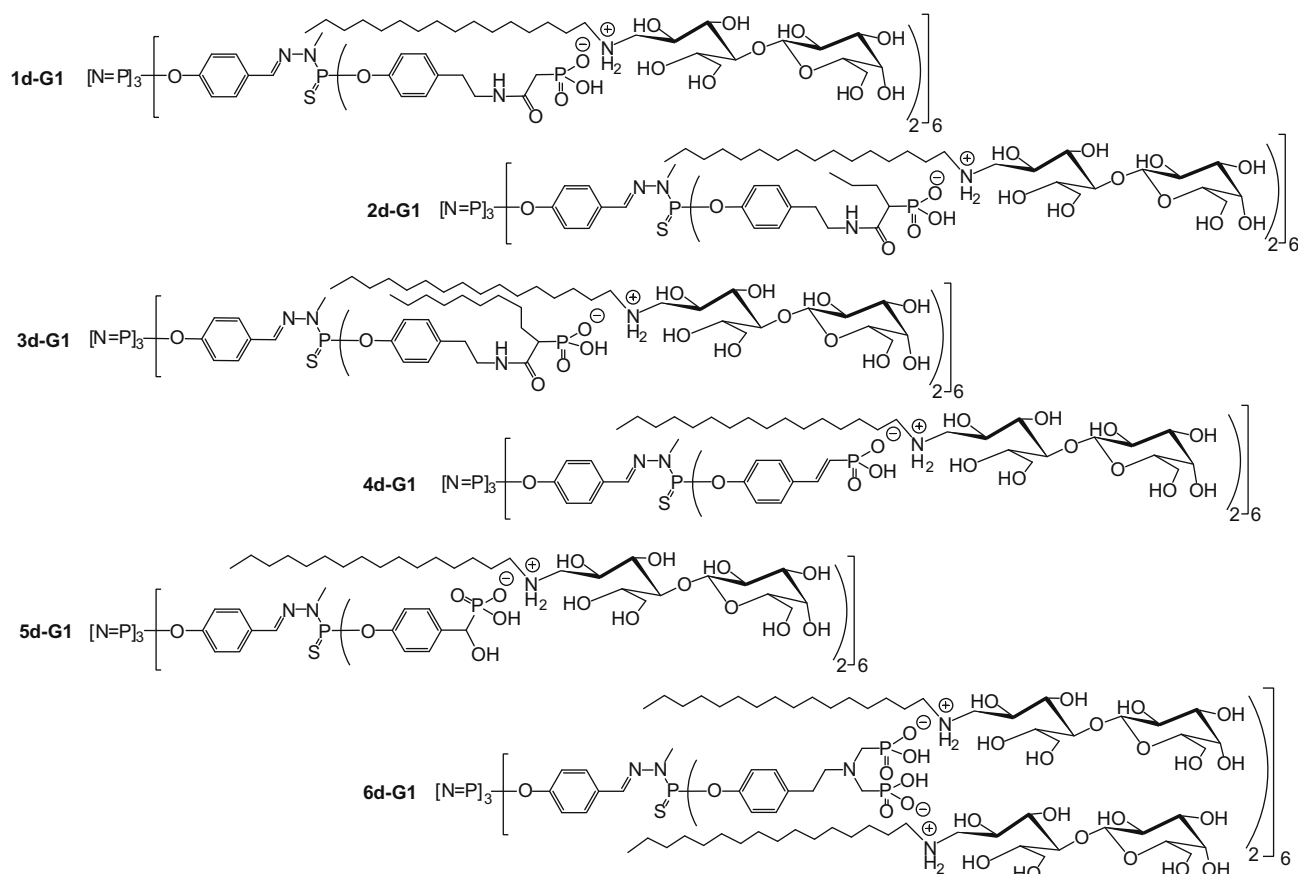
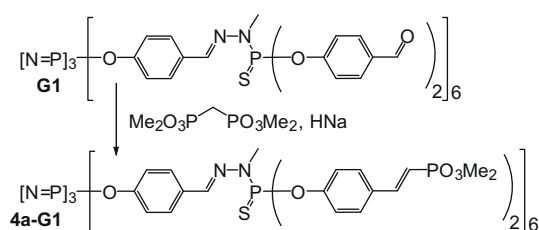


Figure 2. Collection of multivalent cationic systems based on phosphonate-terminated dendrimers and hexadecylamino lactitol.

Table 1
 ^{31}P NMR chemical shifts for the phosphorus atoms of compounds **1n-G1** to **6n-G1** ($n = \text{a to d}$)

Entry	Compound	$\delta^{31}\text{P}$ (CDCl_3 , $n = \text{a}$)			$\delta^{31}\text{P}$ (CD_3OD , $n = \text{b}$)			$\delta^{31}\text{P}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, $n = \text{c}$)			$\delta^{31}\text{P}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, $n = \text{d}$)		
		[P=N] ₃	PO ₃ Me ₂	P(S)	[P=N] ₃	PO ₃ H ₂	P(S)	[P=N] ₃	PO ₃ HNa	P(S)	[P=N] ₃	PO ₃ HL	P(S)
1	1n-G1	8.4	25.4	62.8	9.3	19.5	62.7	9.7	13.8	64.0	9.2	13.4	63.6
2	2n-G1	8.4	28.2	62.9	9.3	23.2	62.8	9.9	17.4	64.0	9.4	16.8	63.7
3	3n-G1	8.4	28.1	63.0	9.3	22.4	62.7	9.0	17.8	64.0	9.2	17.3	62.8
4	4n-G1	8.2	21.9	62.9	8.2	13.6	62.2	9.8	12.5	63.6	9.1	11.0	62.8
5	5n-G1	8.9	23.9	62.4	9.1	20.1	62.8	9.0	15.9	64.8	8.6	15.9	63.5
6	6n-G1	8.3	26.9	63.1	9.5	10.4	66.3	9.6	6.8	64.2	8.6	7.2	63.0



Scheme 1. Synthesis of dendrimer **4a-G1**.

monosodium salt **4c-G1** and the cationic assembly **4d-G1** were easily obtained as described above, and the chemical shifts observed on the ^{31}P spectra, along with ^1H and ^{13}C NMR analysis were consistent with the expected structures. In particular, the phosphorus atoms of the phosphonate groups were found to resonate at 12.5 and 11.0 ppm, respectively on the ^{31}P NMR spectra. The series of dendrimers **5a-G1** to **5c-G1** and **6a-G1** to **6c-G1** having

α -hydroxyphosphonate and bismethylene-phosphonate end-groups, respectively were synthesized³² according to a similar strategy. Similarly to previous series, the ^{31}P NMR was intensively used to follow all reactions, and the expected cationic dendrimers **5d-G1** and **6d-G1** presenting, respectively 12 and 24 GalCer analogs on their outer-shell were readily obtained and fully characterized by multinucleus NMR.

2.2. HIV-1 inhibitory activity

The **Xc-G1** ($X = 1-6$) series of mono sodium salt compounds were assayed in vitro on a CEM-SS cell-line to assess their inhibitory effect against HIV-1 (Table 2, entry 1–6).^{35–38} Interestingly, none of these compounds was found to be toxic in the whole range of concentrations (1×10^{-7} to 1×10^{-4} mol L⁻¹). Consequently, the measured IC₅₀ can be correlated to an effective antiviral activity. Among this series, the IC₅₀ values were found to slightly depend on the chemical nature of phosphonate's vicinity. The influence of the alkyl chain (Table 2, entries 1–3) has already been

Table 2
Classical HIV-1 inhibition and cytotoxicity results for compounds **1c-G1** to **6c-G1**, and **1d-G1** to **6d-G1**

Entry	Compound	HIV-1 inhibition IC ₅₀ , μM ^a	Cytotoxicity CC ₅₀ , μM ^a	T.I. ^b
1	1c-G1	25 ³⁵	>100	>4
2	2c-G1	1.5 ³⁵	>100	>67
3	3c-G1	16 ³⁵	>100	>6
4	4c-G1	0.65	>100	>153
5	5c-G1	50	>100	>2
6	6c-G1	20	>100	>5
7	1d-G1	0.40	1.9	4.8
8	2d-G1	0.33	1.5	4.5
9	3d-G1	0.31	6.1	19.7
10	4d-G1	0.25	1.6	6.4
11	5d-G1	0.21	1.2	4
12	6d-G1	0.16	1.1	6.9

^a Values are means of two or three experiments, standard deviation 10%.

^b In vitro therapeutic index (CC₅₀/IC₅₀).

evoked in a previous paper, and was assumed to be linked to its propensity to interact with the lipophilic region of the V3 loop of gp120.³⁵ Compounds **5c-G1** and **6c-G1** (Table 2, entry 5 and 6) show a relatively low HIV-1 inhibitory activity, in the range of that of **1c-G1** and **3c-G1** (Table 2, entry 1 and 3), whereas the vinyl-phosphonate terminated dendrimer (Table 2, entry 4) exhibit a good inhibitory activity (650 nmol L⁻¹) which is in the range of activity of two candidate polyanion compounds in clinical trials,³⁹ PRO 2000 and dextrin sulphate (DxS). The Therapeutic Index of **4c-G1** measured by default at 153 is one order of magnitude lower than the target value of 1000,⁴⁰ whereas all other compounds, for which the therapeutic indices (TIs) are too low, might induce mucosal irritation or inflammation that can be responsible for an increased HIV transmission.⁴¹

The **Xd-G1** (X = 1–6) series of catanionic multivalent GalCer analog compounds were assayed according to the same procedure (Table 2, entries 7–12). All compounds exhibit a relatively good anti-HIV-1 activity between 0.16 μM (Table 2, entry 12) and 0.40 μM (Table 2, entry 7), but their TIs is dramatically affected by CC₅₀ values that are less than tenfold the value of IC₅₀, except in case of **3d-G1** (Table 2, entry 9). The fact that the latter present a lower toxicity than its concurrent multivalent analogs is not fully understood. One possible explanation could reside in the possible lack of stability of the supramolecular assemblies in cell cultures. As a result, the system could eventually disassemble into dendrimeric phosphonates for which no cytotoxicity has been observed (Table 2, entries 1–6), and free *N*-hexadecylaminolactitol that could be responsible for the relatively high CC₅₀. Assuming that a putative complete disassembly of the catanionic systems would lead to 12 free *N*-hexadecylaminolactitol, the relative CC₅₀ of the disassembled **Xd-G1** series should then be corrected by a factor of 12-fold, leading to CC₅₀ that are in the range of *N*-hexadecylaminolactitol which is known to be cytotoxic on CEM-SS cells in the 10⁻⁴–10⁻⁵ mol L⁻¹ range due to its detergent properties.⁴ Accordingly, the supramolecular assembly **3d-G1** can be assumed to be more stable than the other thanks to the presence of a C10 alkyl chain close to the phosphonic acid, which could consolidate the lipophilic interaction between this C10 alkyl chain and the alkyl chain of the *N*-hexadecylaminolactitol.

3. Conclusions

We have described the preparation of a series of dendrimeric GalCer analogs based on catanionic assemblies of *N*-hexadecylaminolactitol moieties and phosphonic acid dendrimers. These compounds, along with their mono sodium salts and dendrimeric precursors have been extensively studied by multinucleus NMR.

In particular, the ³¹P NMR has proven to be an efficient tool to monitor all chemical transformations, and the collected chemical shifts of the terminal phosphonate (or phosphonic acid) moieties gathered in Table 1 present a coherent set of chemical shifts in agreement with previous works.⁴² The in vitro HIV-1 inhibitory properties on CEM-SS cells of the monosodium salt series are in agreement with previous observations for polyanionic dendrimers or linear polymers,²⁴ but all compounds suffer from low TIs values that prevent them from being so-called promising candidates. Nevertheless, our results show unambiguously that the local environment of the negative charges, that is the chemical nature of the phosphonate neighboring groups, strongly influences the inhibitory properties. On the contrary, this environment has a lower impact on the biological activity of catanionic multivalent analogs. Actually, the GalCer analog series show good HIV-1 inhibitory properties, but quite low TIs were measured for these compounds, due to relatively high CC₅₀ values, probably related to a lack of stability of the assemblies in vitro. Further experiments are currently under study to assess the fact that the length of an alkyl chain located close to the phosphonic acid end-groups could increase the in vitro stability of the supramolecular assembly. In this respect, multivalent GalCer systems based on supramolecular assemblies appear as a valuable strategy to develop original anti-HIV-1 candidates, given that their in vitro stability can be significantly increased.

4. Methods

4.1. Chemistry

4.1.1. General

All manipulations were carried out using standard high-vacuum and dry-argon techniques. Chemicals were used as received and solvents were dried and distilled by routine procedures.⁴³ ¹H, ¹³C, ¹⁹F and ³¹P NMR spectra were recorded at 25 °C with Bruker AC 200, AV 300, DPX 300, AV 400 or AV500 spectrometers. The following abbreviations were used in reporting spectra: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublets. References for NMR chemical shifts are 85% H₃PO₄ for ³¹P NMR and SiMe₄ for ¹H and ¹³C NMR. The attribution of ¹³C NMR signals was done using *f*mod, 2D ¹H–¹³C HSQC, ¹H–¹³C HMBC and ¹H–³¹P HMQC, Broad Band or CW ³¹P decoupling experiments when necessary. Mass spectrometry was recorded on a Finnigan-mat TSQ 7000. The numbering schemes used for NMR are depicted in Figure 3. PPH dendrimer precursors^{44,45} and *N*-hexadecylaminolactitol⁴⁶ were prepared according to published procedure.

4.1.2. Synthesis of phosphonate capped dendrimers **Xa-G1** (X = 1–6)

Dendrimers **1a-G1** to **3a-G1**,³⁵ **5a-G1** and **6a-G1** were prepared according to published procedure.³² Dendrimer **4a-G1** was prepared as follows: to a suspension of NaH (141 mg, 5.840 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise tetramethyl-methylene-*gem*-diphosphonate. Then, this solution was dropped into a solution of **G1** (1383 mg, 5.840 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at rt overnight and was evaporated to dryness. The white residue was diluted in water (150 mL) and extracted with chloroform (3 × 50 mL). The organic phase was washed with brine (50 mL), separated, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, R_f = 0.26) to obtain **4a-G1** as a white powder (779 mg, 54%). ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 8.2 (s, N₃P₃), 21.9 (s, PO₃Me₂), 61.9 (s, P=S) ppm; ¹H NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): δ = 3.28 (d, ³J_{PH} = 9.6 Hz, 18H, NCH₃), 3.74 (d, ³J_{PH} = 10.8 Hz, 72H, OCH₃), 6.10 (dd, ²J_{PH} = ³J_{HH} = 17.4 Hz, 12H, PCH), 7.01 (d, ³J_{HH} = 6.3 Hz, 12H, C₆H₅),

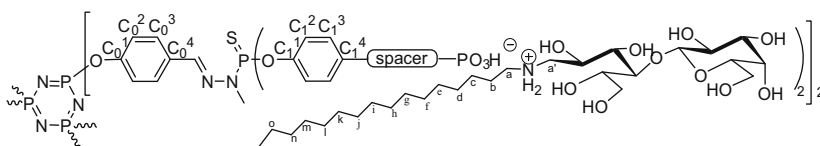


Figure 3. Numbering scheme for catanionic dendrimers.

7.17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 24H, C_1^2H), 7.35 (t, $^3J_{\text{HH}} = 20.7$ Hz, 12H, ArCH), 7.39 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 24H, C_1^3H), 7.61 (br d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 18H, C_0^3H , CH=N) ppm; ^{13}C { ^1H } NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 33.0$ (d, $^2J_{\text{PC}} = 12.1$ Hz, NCH₃), 52.5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.3$ Hz, OCH₃), 112.8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 192.5$ Hz, PCH), 121.4 (s, C_0^2), 121.8 (d, $^3J_{\text{PC}} = 4.5$ Hz, C_1^2), 128.3 (s, C_0^3), 129.1 (s, C_1^3), 132.0 (s, C_1^4), 132.3 (s, C_0^4), 139.0 (d, $^3J_{\text{PC}} = 15.1$ Hz, N=CH), 148.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, ArCH), 151.4 (s, C_0^1), 151.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz, C_1^1) ppm.

4.1.3. Synthesis of phosphonic acid capped dendrimers Xb-G1 (X = 1–6)

Dendrimers **1a-G1** to **3a-G1**,³⁵ **5a-G1** and **6a-G1** were prepared according to published procedure.³² Dendrimer **4b-G1** was prepared as follows: to a vigorously stirred solution of **4a-G1** (200 mg, 0.048 mmol) in dry acetonitrile (10 mL) bromotrimethylsilane (192 μL , 1.440 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 12 h at rt, and then evaporated to dryness under reduced pressure. The crude residue was washed twice with methanol (15 mL) for 1 h at rt and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting white solid was washed with water, methanol and Et₂O to afford **4b-G1** as a white solid (57 mg, 31%). ^{31}P { ^1H } NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 121.5 MHz): $\delta = 8.2$ (s, N_3P_3), 13.6 (s, PO_3Me_2), 62.2 (s, P=S) ppm; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300.1 MHz): $\delta = 3.29$ (d, $^3J_{\text{PH}} = 10.8$ Hz, 18H, NCH₃), 6.41 (dd, $^2J_{\text{PH}} = ^3J_{\text{HH}} = 18.2$ Hz, 12H, PCH), 7.01–7.25 (m, 48H, C_0^2H , C_1^1H and ArCH), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 24H, C_1^3H), 7.64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 12H, C_0^3H), 7.86 (br s, 6H, CH=N) ppm; ^{13}C { ^1H } NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75.5 MHz): $\delta = 33.3$ (d, $^2J_{\text{PC}} = 11.9$ Hz, NCH₃), 121.3 (d, $^1J_{\text{PC}} = 181.6$ Hz, PCH), 121.4 (s, C_0^2), 121.7 (br s, C_1^2), 128.8 (s, C_0^3), 129.4 (s, C_1^3), 132.4 (s, C_0^4), 133.3 (d, $^3J_{\text{PC}} = 22.4$ Hz, C_1^4), 141.0 (br s, N=CH), 142.1 (br s, ArCH), 151.0 (s, C_1^1), 151.1 (s, C_0^1) ppm.

4.1.4. Synthesis of sodium phosphonate capped dendrimers Xc-G1 (X = 1–6)

Dendrimers **1a-G1** to **3a-G1**,³⁵ **5a-G1** and **6a-G1** were prepared according to published procedure.³² Dendrimer **4c-G1** was prepared as follows: the sodium monosalt form was obtained by adding aqueous sodium hydroxide (0.1023 N, 3.09 mL) to a suspension of **4b-G1** (100 mg, 0.026 mmol) in water (5 mL) at 0 °C. The solution was filtered on micropore (1.2 μm) and lyophilized to give **4c-G1** as a white powder (96 mg, 91%). ^{31}P { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5 MHz): $\delta = 8.2$ (s, N_3P_3), 12.5 (s, PO_3Me_2), 63.6 (s, P=S) ppm; ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 300.1 MHz): $\delta = 3.28$ (d, $^3J_{\text{PH}} = 9.0$ Hz, 18H, NCH₃), 6.36 (dd, $^2J_{\text{PH}} = ^3J_{\text{HH}} = 15.0$ Hz, 12H, PCH), 7.00–7.08 (m, 48H, C_0^2H , C_1^1H and ArCH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 24H, C_1^3H), 7.61 (br s, 12H, C_0^3H), 7.82 (br s, 6H, CH=N) ppm; ^{13}C { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 125.8 MHz): $\delta = 32.8$ (br s, NCH₃), 113.9 (br s, PCH), 121.4 (br s, C_1^2), 122.5 (br s, C_0^2), 124.0 (s, C_0^3), 128.6 (s, C_1^3), 132.2 (s, C_0^4), 134.1 (s, C_1^4), 139.8 (br s, ArCH and CH=N), 151.4 (br s, C_0^1 and C_1^1) ppm.

4.1.5. Synthesis of catanionic dendrimers Xd-G1 (X = 1–6)

1d-G1: Dendrimer **1b-G1** (50 mg, 0.011 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (75 mg, 0.132 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **1d-G1** as a white powder (124 mg, 100%). ^{31}P { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5

MHz): $\delta = 9.2$ (s, N_3P_3), 13.8 (s, PO_3Me_2), 64.0 (s, P=S) ppm; ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$, 1:3, 500.1 MHz): $\delta = 0.77$ (br s, 36H, CH₃), 1.12 (br s, 312 H, $\text{C}_{\text{C-O}}\text{H}_2$), 1.60 (br s, 24H, C_bH_2), 2.56–2.68 (m, 48H, ArCH₂ and PCH₂), 2.93 (br s, 48H, C_aH and $\text{C}_a'\text{H}$), 3.17–3.28 (m, 42H, NHCH₂ and NCH₃), 3.41–3.99 (m, 156H, CHOH, CH₂OH and CH_{anom}), 6.83 (br s, 12H, C_0^2H), 7.02 (br s, 24H, C_1^2H), 7.09 (br s, 24H, C_1^3H), 7.59 (br s, 12H, C_0^3H), 7.69 (br s, 6H, CH=N) ppm; ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 75.5 MHz): $\delta = 14.1$ (s, CH₃), 22.9 (s, C_0), 26.2 (s, C_b), 26.9 (s, C_c), 29.8 (s, C_d), 30.2 (br s, $\text{C}_{\text{e-m}}$), 32.2 (s, C_n), 32.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 19.5$ Hz, CH₃N), 34.3 (s, ArCH₂), 38.3 (d, $^1J_{\text{PC}} = 197.3$ Hz, PCH), 41.2 (s, NHCH₂), 42.3 (s, C_a), 43.5 (s, C_a'), 60.4 (s, CH₂OH), 61.2 (s, CH₂OH), 68.7 (s, CHOH), 70.3 (s, CHOH), 71.4 (s, CHOH), 71.5 (s, CHOH), 72.8 (s, CHOH), 75.5 (s, CHOH), 78.7 (s, CHO), 78.9 (s, CHO), 103.1 (s, C_{anom}), 121.3 (s, C_1^2), 121.6 (s, C_0^2), 128.6 (s, C_0^3), 130.3 (s, C_1^3), 132.7 (s, C_0^4), 137.2 (s, C_1^4), 140.0 (br s, CH=N), 148.9 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.6$ Hz, C_1^1), 151.2 (s, C_0^1), 171.1 (s, CONH) ppm.

2d-G1: Dendrimer **2b-G1** (50 mg, 0.010 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (68 mg, 0.120 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **2d-G1** as a white powder (118 mg, 100%). ^{31}P { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5 MHz): $\delta = 9.4$ (s, N_3P_3), 16.8 (s, PO_3Me_2), 63.7 (s, P=S) ppm; ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{CO})\text{CD}_3$, 1:3, 500.1 MHz): $\delta = 0.90$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, 36H, CH₃), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, 36H, CH₃), 1.24–1.44 (br s, 360H, CH_3CH_2 and $\text{C}_{\text{C-O}}\text{H}_2$), 1.53–1.88 (m, 48H, CHCH₂ and C_bH), 2.68–2.91 (m, 36H, ArCH₂ and CHP), 3.06–3.17 (m, 48H, C_aH_2 and $\text{C}_a'\text{H}_2$), 3.18–3.29 (m, 18H, NCH₃), 3.32–3.48 (m, 48H, NHCH₂), 3.58–4.08 (m, 120H, CHOH and CH₂OH), 4.31 (br s, 12H, CH_{anom}), 6.91 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 12H, C_0^2H), 7.11 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 24H, C_1^2H), 7.17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 24H, C_1^3H), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, 12H, C_0^3H), 7.77 (br s, 6H, CH=N) ppm; ^{13}C { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3(\text{CO})\text{CD}_3$, 1:3, 125.6 MHz): $\delta = 13.7$ (s, CH₃), 13.8 (s, CH₃), 22.4 (s, CH_3CH_2), 22.6 (s, C_0), 25.6 (s, C_b), 26.6 (s, C_c), 29.1 (s, C_dH_2), 29.5 (br s, $\text{C}_{\text{e-m}}$), 31.2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 16.2$ Hz, NCH₃), 31.8 (d, $^3J_{\text{PH}} = 16.2$ Hz, CHCH₂), 31.9 (s, C_n), 34.7 (s, ArCH₂), 39.7 (d, $^1J_{\text{PC}} = 75.5$ Hz, PCH), 41.0 (s, NHCH₂), 48.1 (s, C_a), 49.9 (s, C_a'), 61.5 (s, CH₂OH), 62.1 (s, CH₂OH), 67.9 (s, CHOH), 69.0 (s, CHOH), 70.8 (s, CHOH), 71.2 (s, CHOH), 72.9 (s, CHOH), 75.6 (s, CHOH), 78.7 (s, CHO), 103.1 (s, C_{anom}), 121.1 (s, C_1^2), 121.2 (s, C_0^2), 128.3 (s, C_0^3), 129.8 (s, C_1^3), 132.6 (s, C_0^4), 136.5 (s, C_1^4), 138.9 (br s, CH=N), 149.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.9$ Hz, C_1^1), 151.0 (br s, C_0^1), 168.9 (s, CONH) ppm.

3d-G1: Dendrimer **3b-G1** (50 mg, 0.008 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (55 mg, 0.096 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **3d-G1** as a white powder (104 mg, 100%). ^{31}P { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 3:1, 121.5 MHz): $\delta = 9.2$ (s, N_3P_3), 17.3 (s, PO_3Me_2), 62.8 (s, P=S) ppm; ^1H NMR (CD_3OD , 125.6 MHz): $\delta = 0.86$ (br s, 36H, CH₃), 0.93 (br s, 36H, CH₃), 1.23–1.49 (m, 504H, CH₂ and $\text{C}_{\text{C-O}}\text{H}_2$), 1.51–1.68 (m, 24H, C_bH), 1.80 (br s, 24H, ArCH₂), 2.08–2.09 (m, 24H, CHCH₂), 2.51–2.67 (m, 12H, CHP), 2.73–2.92 (m, 18H, NCH₃), 3.11 (br s, 48H, C_aH_2 and $\text{C}_a'\text{H}_2$), 3.12–3.49 (m, 24H, NHCH₂), 3.55–3.99 (m, 156H, CHOH, CH₂OH and CH_{anom}), 6.81–7.93 (m, 12H, C_0^2H), 7.03–7.38 (m, 48H, C_1^2H and C_1^3H), 7.64 (br s, 12H, C_0^3H), 7.71 (br s, 6H, CH=N) ppm; ^{13}C { ^1H } NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$, 1:3, 125.6 MHz): $\delta = 13.7$ (s, CH₃), 13.9 (s, CH₃), 22.1 (s, C_0), 22.3 (s, CH₂), 26.0 (s,

C_b), 26.6 (s, C_c), 28.3 (br s, CHCH₂), 29.3 (s, C_dH₂), 29.5 (br s, CH₂ and C_{e-m}), 31.7 (s, CH₂), 31.9 (s, C_n), 34.5 (s, ArCH₂), 37.5 (d, ¹J_{PC} = 75.5 Hz, PCH), 40.6 (s, NHCH₂), 48.1 (s, C_a), 50.0 (s, C_{a'}), 61.4 (s, CH₂OH), 62.1 (s, CH₂OH), 68.1 (s, CHOH), 69.0 (s, CHOH), 70.7 (s, CHOH), 71.2 (s, CHOH), 72.8 (s, CHOH), 75.6 (s, CHOH), 78.9 (s, CHO), 103.1 (s, C_{anom}), 121.1 (br s, C₀² and C₁²), 128.0 (br s, C₀³), 129.8 (s, C₁³), 134.5 (s, C₀⁴), 136.8 (s, C₁⁴), 139.1 (s, CH=N), 149.2 (s, C₁¹), 152.3 (s, C₀¹), 173.5 (s, CONH) ppm.

4d-G1: Dendrimer **4b-G1** (50 mg, 0.013 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (88 mg, 0.156 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **4d-G1** as a white powder (137 mg, 100%). ³¹P {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121.5 MHz): δ = 9.1 (s, N₃P₃), 11.0 (s, PO₃Me₂), 62.8 (s, P=S) ppm; ¹H NMR (D₂O/CD₃COCD₃, 1:3, 500.1 MHz): δ = 0.98 (br s, 36H, CH₃), 1.18 (br s, 312 H, C_{c-o}H₂), 1.69 (br s, 24H, C_bH₂), 2.64–2.93 (m, 84H, ArCH₂, PCH₂, C_aH and C_{a'}H), 3.33–3.49 (m, 42H, NHCH₂ and NCH₃), 3.41–4.15 (m, 120H, CHOH and CH₂OH) 4.15 (br s, 12H, CH_{anom}), 6.29 (br s, 12H, CHP), 7.00 (br s, 36H, C₂H and C₁²H), 7.35 (br s, 24H, C₃H), 7.53 (br s, 12H, C₀³H), 7.67 (br s, 6H, CH=N) ppm; ¹³C {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 100.6 MHz): δ = 14.1 (s, CH₃), 22.9 (s, C_o), 26.2 (s, C_b), 27.0 (s, C_c), 29.8 (br s, C_d), 30.3 (br s, C_{e-m}), 32.3 (br s, C_n), 32.8 (br s, CH₃N), 48.2 (br s, C_a), 50.3 (br s, C_{a'}), 61.4 (s, CH₂OH), 62.8 (s, CH₂OH), 67.3 (s, CHOH), 69.0 (br s, CHOH), 70.6 (br s, CHOH), 71.3 (s, CHOH), 72.9 (br s, CHOH), 75.4 (br s, CHOH), 80.1 (br s, CHO), 103.2 (br s, C_{anom}), 121.6 (br s, C₀² and C₁²), 124.5 (s, CHP), 126.4 (s, C₀³), 128.5 (s, C₁³), 132.6 (s, C₀⁴), 134.7 (br s, C₁⁴), 139.4 (br s, ArCH, CH=N), 147.7 (br s, C₁¹), 150.8 (s, C₀¹) ppm.

5d-G1: Dendrimer **5b-G1** (50 mg, 0.013 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (88 mg, 0.156 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **5d-G1** as a white powder (138 mg, 100%). ³¹P {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121.5 MHz): δ = 8.6 (s, N₃P₃), 15.9 (s, PO₃Me₂), 63.5 (s, P=S) ppm; ¹H NMR (D₂O/CD₃(CO)CD₃, 1:3, 500.1 MHz): δ = 1.02 (br s, 36H, CH₃), 1.39 (br s, 336 H, C_{b-o}H₂), 2.59–3.19 (m, 48H, C_aH and C_{a'}H), 3.36–3.63 (m, 18H, NCH₃), 3.65–4.29 (m, 156H, CHOH, CH₂OH and CHOHP), 7.31 (br s, 36H, C₀²H and C₁²H), 7.60 (br s, 24H, C₃H), 7.81 (br s, 18H, C₀³H and CH=N) ppm; ¹³C {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 75.5 MHz): δ = 14.1 (s, CH₃), 22.9 (s, C_o), 25.9 (s, C_b), 27.0 (s, C_c), 29.8 (s, C_d), 30.3 (br s, C_{e-m}), 32.3 (br s, C_n), 32.8 (br s, CH₃N), 46.7 (s, C_a), 48.3 (br s, C_{a'}), 61.4 (br s, CH₂OH), 62.5 (br s, CH₂OH), 68.0 (s, CHOH), 69.1 (br s, CHOH), 71.3 (br s, CHOH and CHOHP), 72.8 (br s, CHOH), 75.5 (br s, CHOH), 80.0 (br s, CHO), 103.4 (br s, CH_{anom}), 120.7 (br s, C₀² and C₁²), 128.8 (br s, C₀³ and C₁³), 132.3 (br s, CH=N), 137.8 (br s, C₁⁴), 140.4 (s, C₀⁴), 149.3 (br s, C₁¹), 151.1 (br s, C₀¹) ppm.

6d-G1: Dendrimer **6b-G1** (50 mg, 0.009 mmol) was added to a solution of *N*-hexadecylaminolactitol (123 mg, 0.216 mmol) in distilled water (10 mL). After 3 days stirring at rt, the colorless homogeneous solution was freeze-dried to afford **6d-G1** as a white powder (170 mg, 100%). ³¹P {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 121.5 MHz): δ = 8.6 (s, N₃P₃), 7.2 (s, PO₃Me₂), 63.0 (s, P=S) ppm; ¹H NMR (D₂O/CD₃COCD₃, 1:3, 500.1 MHz): δ = 0.93 (br s, 72H, CH₃), 1.32 (br s, 624H, C_{c-o}H₂), 1.73 (br s, 48H, C_bH₂), 2.82–3.06 (m, 96H, C_aH and C_{a'}H), 3.24–3.46 (m, 66H, NCH₂P and NCH₃), 3.63–4.20 (m, 288H, CHOH and CH₂OH), 4.51 (br s, 24H, CH_{anom}), 6.89–7.12 (m, 12H, C₀²H), 7.20 (br s, 24H, C₁²H), 7.40 (br s, 12H, C₃H), 7.73 (br s, 12H, C₀³H), 7.89 (br s, 6H, CH=N) ppm; ¹³C {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 3:1, 125.8 MHz): δ = 14.0 (s, CH₃), 22.8 (s, C_o), 26.0 (s, C_b), 26.8 (s, C_c), 29.7 (s, C_d), 30.2 (br s, C_{e-m} and ArCH₂), 32.2 (s, C_n), 32.7 (br s, CH₃N), 47.9 (br s, C_a), 50.1 (br s, C_{a'}), 53.1 (br s, NCH₂P), 57.4 (br s, CH₂N), 61.3 (s, CH₂OH), 62.2 (br s, CH₂OH), 67.8 (br s, CHOH), 68.8 (br s, CHOH), 71.1 (br s, CHOH), 72.8 (br s, CHOH), 75.3 (br s, CHOH), 77.2 (br s, CHOH), 79.7 (br s, CHO), 103.2

(br s, C_{anom}), 121.5 (br s, C₀² and C₁²), 128.3 (br s, C₀³), 130.6 (br s, C₁³), 132.5 (br s, C₀⁴), 134.5 (br s, C₁⁴), 139.2 (br s, CH=N), 149.6 (br s, C₁¹), 151.0 (br s, C₀¹) ppm.

4.2. Antiviral assays

CEM-SS cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (heated at 56 °C for 30 min). CEM-SS cells were infected with HIV-1 LAI and the production of virus was evaluated after five days, by measuring the reverse transcriptase (RT) which expresses the presence of HIV in the supernatant culture medium. RT inhibition percentage, providing IC₅₀ values (concentration of drug at which virus production is inhibited by 50%), was determined in comparison with the non-treated cells. The cytotoxicities evaluation is based on the viability of the non-infected cells using a colorimetric assay. This colorimetric MTT test is based on the capacity of living cells to reduce MTT to formazan. The produced quantity of formazan (characterized by OD540) is directly proportional to the number of living cells and to the CC₅₀ (concentration at which OD540 was reduced by half).

Acknowledgments

The European Community is acknowledged for funding support (A. P.-A., Marie Curie EST 'Nanotool').

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.bmc.2009.10.058.

References and notes

- Buhleier, E.; Wehner, F.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 78, 155.
- Rolland, O.; Turrin, C.-O.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *New J. Chem.* **2009**, 33, 1809.
- Patri, A. K.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 2203.
- Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. *ChemBioChem* **2005**, 6, 2207.
- Najlah, M.; D'Emanuele, A. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2007**, 10, 756.
- Myc, A.; Douce, T. B.; Ahuja, N.; Kotlyar, A.; Kukowska-Latallo, J.; Thomas, T. P.; Baker, J. R. *Anti-Cancer Drugs* **2008**, 19, 143.
- Rosa Borges, A.; Schengrund, C. L. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2005**, 5, 247.
- Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2754–2794.
- Kitov, P. I.; Bundle, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16271.
- Dutta, T.; Garg, M.; Jain, N. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, 34, 181.
- Dutta, T.; Jain, N. K. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2007**, 1770, 681.
- Weber, N.; Ortega, P.; Clemente, M. I.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M.; de la Mata, F. J.; Gomez, R.; Munoz-Fernandez, M. A. *J. Controlled Release* **2008**, 132, 55.
- Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, 17, 657.
- Kensinger, R. D.; Catalone, B. J.; Krebs, F. C.; Wigdahl, B.; Schengrund, C. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1614.
- Kensinger, R. D.; Yowler, B. C.; Benesi, A. J.; Schengrund, C. L. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 349.
- Wang, S. K.; Liang, P. H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T. L.; Hsieh, S. L.; Burton, D. R.; Wong, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 3690.
- Yahi, N.; Sabatier, J.-M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; Gonzalez-Scarano, F.; Fantini, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24349.
- Alfsen, A.; Bomsel, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25649.
- Faroux-Corlay, B.; Greiner, J.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D.; Aubertin, A. M.; Vierling, P.; Fantini, J. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2188.
- Rico-Lattes, I.; Blanzat, M.; Franceschi-Messant, S.; Perez, E.; Lattes, A. *C.R. Chimie* **2005**, 8, 807.
- Rico-Lattes, I.; Garrigues, J. C.; Perez, E.; André-Barrès, C.; Madelaine-Dupuich, C.; Lattes, A.; Linas, M. D.; Aubertin, A. M. *New J. Chem.* **1995**, 19, 341.
- Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Zhao, L.; Olson, W.; Kwong, P. D.; Sattentau, Q. J. *J. Virol.* **2000**, 74, 1948.
- McCarthy, T. D.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; Giannis, M.; O'Keefe, D. F.; Heery, G.; Paull, J. R. A.; Matthews, B. R.; Holan, G. *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 312.
- Weber, J.; Desai, K.; Darbyshire, J. *Plos Med.* **2005**, 2, 392.
- McCarthy, T.; Karellas, P.; Henderson, S.; Giannis, M.; O'Keefe, D.; Matthews, B.; Bragg, B.; Paull, J.; Heery, G.; Krippner, G.; Holan, G. *Antiviral Res.* **2004**, 62, A44.

26. Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Chem. Commun.* **2002**, 1864.
27. Iampietro, D. J.; Kaler, E. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 8590.
28. Consola, S.; Blanzat, M.; Perez, E.; Garrigues, J. C.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3039.
29. Pasc-Banu, A.; Stan, R.; Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Labrot, T.; Oda, R. *Colloids Surf., A* **2004**, *242*, 195.
30. Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2008**, *24*, 2326.
31. Caminade, A. M.; Maraval, V.; Laurent, R.; Turrin, C. O.; Sutra, P.; Leclaire, J.; Griffe, L.; Marchand, P.; Baudoin-Dehoux, C.; Rebout, C.; Majoral, J. P. *C.R. Chimie* **2003**, *6*, 791.
32. Poupot, M.; Griffe, L.; Marchand, P.; Maraval, A.; Rolland, O.; Martinet, L.; L'Faqih-Olive, F. E.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Fournié, J. J.; Majoral, J. P.; Poupot, R. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2339.
33. Marchand, P.; Griffe, L.; Poupot, M.; Turrin, C.-O.; Bacquet, G.; Fournié, J.-J.; Majoral, J.-P.; Poupot, R.; Caminade, A.-M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3963.
34. Blais, J. C.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5097.
35. Pérez-Anes, A.; Spataro, G.; Coppel, Y.; Blanzat, M.; Turrin, C.-O.; Moog, C.; Caminade, A.-M.; Rico-Lattes, I.; Majoral, J.-P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3491.
36. Moog, C.; Wick, A.; Ber, P. L.; Kirn, A.; Aubertin, A.-M. *Antiviral Res.* **1994**, *24*, 275.
37. Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; Clercq, E. D. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309.
38. Peytoux, V.; Condom, R.; Patino, N.; Guedj, R.; Aubertin, A.-M.; Gelus, N.; Bailly, C.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4042.
39. Fletcher, P. S.; Wallace, G. S.; Mesquita, P. M. M.; Shattock, R. J. *Retrovirology* **2006**, *3*, 46.
40. Macri, R. V.; Karlovská, J.; Doncel, G. F.; Du, X.; Maisuria, B. B.; Williams, A. A.; Sugandhi, E. W.; Falkinham, J. O., III; Esker, A. R.; Gandour, R. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3162.
41. Fichorova, R. N.; Tucker, L. D.; Anderson, D. J. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 418.
42. Rolland, O.; Griffe, L.; Poupot, M.; Maraval, A.; Ouali, A.; Coppel, Y.; Fournié, J. J.; Bacquet, G.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Poupot, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4836.
43. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed.; Pergamon Press: Oxford, 1988.
44. Launay, N.; Caminade, A. M.; Lahana, R.; Majoral, J. P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1589.
45. Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
46. Vivares, D.; Soussan, E.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2008**, *24*, 9260.

Author: Alexandra Perez ANES

Phosphorus dendrimers catanionic as HIV inhibitors: Synthesis, physicochemical properties and antiviral activity

Abstract

The galactosylceramide or GalCer, a glycolipid derived, is a cellular receptor of the HIV. It acts through its high affinity for the V3 loop of gp120 of HIV. One therapeutic strategie employed involves the synthesis of chimeras designed to mimic the receptor and then, to block the recognition between the virus and the cells GalCer (+) and CD4 (+). In addition, the most cell recognition processes are multivalent. The inhibition of these processes is more effective when a multivalent inhibitor is used. It is within this context that the use of phosphorus dendrimers catanionic GalCer analogues mimicking cell surfaces was considered. These compounds are obtained by a simple acid-base reaction in water between an acid-terminated dendrimer and a long chain aminosugar called aminolactitol. These catanionics dendrimers are supramolecular assemblies whose stability is ensured by hydrophobic interactions between the dendrimer branches and the chains of amino sugar.

Previous work conducted in our laboratories have shown that these multivalent analogs of GalCer are very good inhibitors of HIV-1 but they have a non-negligible cell toxicity. In order to reduce the cytotoxicity and to study the influence of the periphery of the dendrimer on the anti-HIV activity by introducing various chemical modifications near the ion pair, we designed a series of first generation phosphonic acid-terminated dendrimers and their catanionic analogs of GalCer.

The central hypothesis of this strategy was the possibility of increasing the stability of the ion pair through chemical changes, including increased hydrophobic effects by an additional alkyl chain. This series of catanionic analogs of GalCer shows a very good activity but a low therapeutic index due to relatively high values of toxicity, despite the structural changes made.

For this reason, first of all, we have verified that this cytotoxicity was not related to aggregation properties of these catanionic dendritic analogues. This validation has confirmed our initial hypothesis that explains the cytotoxicity by a lack of *in vitro* stability of the ion pair, and the partial release of aminolactitol in the biological environment. This detergency effect could explain this cytotoxicity. To validate this hypothesis, fluorimetry experiments were performed using model compounds. For that, new catanionic fluorescent analogues have been designed. The dissociation constants obtained by spectrofluorometry are low (about 10^{-5} M) for all dendrimers. This means that the ion pair is partially dissociated in the cell culture medium. It can be possible that interactions between the aminolactitols of catanionic assemblies and cellular receptors enhance the dissociation. Indeed, these dissociation constants are 10000 times larger than those corresponding to other biological partners of GalCer. For instance, the dissociation constant of the gp120-GalCer complex is the order of nanomoles. Although this is a model, the ion pair is probably not able to maintain the association catanionic. This work allowed us to correlate the biological properties of catanionic dendrimers and their physico-chemical properties and may help to design other multivalent analogs of GalCer which can be more efficient.

Keywords: dendrimer, catanionic, HIV, inhibitor, activity, stability, ion pair

Auteur : Alexandra PEREZ ANES

Dendrimères Phosphorés Catanioniques comme inhibiteurs du VIH : Synthèse, propriétés physicochimiques et activité antivirale

Directeurs de thèse : Cédric-Olivier Turrin et Muriel Blanzat

Résumé

Le galactosylcéramide ou GalCer, dérivé glycolipidique, est l'un des récepteurs cellulaires du VIH. Il agit grâce à son affinité élevée pour la boucle V3 de la gp120 du VIH. Une des stratégies thérapeutiques employées consiste en la synthèse de leurres visant à mimer ce récepteur afin de bloquer la reconnaissance entre le virus et les cellules GalCer(+) et CD4(+). De plus, la plupart des processus de reconnaissance cellulaire sont multivalents. L'inhibition de ces processus est donc plus efficace quand un inhibiteur multivalent est utilisé. C'est dans ce contexte que l'utilisation de dendrimères phosphorés catanioniques analogues du GalCer mimant les surfaces cellulaires a été envisagée. Ces composés sont obtenus par une simple réaction acido-basique dans l'eau entre un dendrimère à terminaisons acide et un aminosucre à longue chaîne appelé aminolactitol. Les dendrimères catanioniques résultants sont des assemblages supramoléculaires dont la stabilité est assurée par des interactions hydrophobes entre les branches du dendrimère et les chaînes de l'aminosucrose.

Les travaux précédents réalisés dans nos laboratoires ont ainsi montré que ces analogues multivalents du GalCer sont des très bons inhibiteurs du VIH-1 mais qu'ils possèdent une toxicité cellulaire non-négligeable. Dans le but de diminuer cette cytotoxicité et d'étudier l'influence de la périphérie du dendrimère sur l'activité anti-VIH par l'introduction de diverses modifications chimiques près de la paire d'ions, nous avons conçu une série de dendrimères de première génération à terminaison acide phosphonique et leurs analogues catanioniques du GalCer. Ces composés et leurs précurseurs ont été étudiés par spectrométrie de RMN du proton, du phosphore 31 et du carbone 13. En particulier, la spectrométrie de RMN du phosphore 31 a été un outil efficace pour contrôler les modifications chimiques.

L'hypothèse centrale de cette stratégie était la possibilité d'augmenter la stabilité de la paire d'ions grâce à des modifications chimiques, notamment par l'augmentation des effets hydrophobes apportés par une chaîne alkyle supplémentaire. Cette série d'analogues catanioniques du GalCer montre une très bonne activité mais des index thérapeutiques bas à cause des valeurs relativement élevées de la toxicité, malgré les modifications structurales réalisées.

C'est pourquoi nous avons d'abord vérifié que cette cytotoxicité n'était pas liée aux propriétés d'aggrégation de ces analogues catanioniques dendritiques. Cette validation a conforté notre hypothèse initiale qui explique la cytotoxicité par un manque de stabilité de la paire d'ion *in vitro*, et la libération partielle d'aminolactitol dans le milieu biologique, dont les propriétés détergentes pourraient expliquer la cytotoxicité. Pour valider cette hypothèse, des études par fluorimétrie ont été réalisées avec des composés modèles, à l'aide de nouveaux analogues catanioniques fluorescents conçus pour cette étude. Les constantes de dissociation obtenues par spectrofluorométrie sont faibles (de l'ordre de 10^{-5} M) pour tous les dendrimères. Cela signifie que la paire d'ions est partiellement dissociée dans le milieu de culture cellulaire. Il n'est donc pas exclu que des interactions entre les aminolactitols du catanioniques et des récepteurs cellulaires renforcent la dissociation. En effet, ces constantes de dissociation sont 10000 fois plus grandes que celles correspondantes à des autres partenaires biologiques du GalCer, par exemple, la constante de dissociation du complexe GalCer-gp120 est de l'ordre de la nanomole. Bien qu'il s'agisse d'un modèle, la paire d'ions n'est pas sans doute capable de maintenir l'association catanionique. Ces travaux nous ont permis de corrélérer des propriétés biologiques de dendrimères catanioniques à leur comportement physico-chimiques et pourraient aider à concevoir d'autres candidats analogues multivalents du galcer plus performants.

Mots clés : dendrimère, catanionique, VIH, inhibiteur, activité, stabilité, paire d'ions

Discipline : Chimie macromoléculaire et supramoléculaire

*Laboratoire de Chimie de Coordination – 205, Route de Narbonne - 31077 Toulouse cedex 4
Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623
Université Paul Sabatier – Bât 2R1 – 118, Route de Narbonne - 31062 Toulouse cedex 4*