

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :

Boris GAILLARD

soutenue le : **05 avril 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie thérapeutique

**Prodrogues d'alkylphospholipides (pro-APLs)
pour une nouvelle approche thérapeutique du
cancer par les lipides antitumoraux**

THÈSE dirigée par :

Dr. LEBEAU Luc

Dr. REMY Jean-Serge

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. JAFFRÈS Paul-Alain

Pr. BARTHÉLÉMY Philippe

Professeur, Université de Brest

Professeur, Université de Bordeaux

EXAMINATEUR :

Dr. ERBACHER Patrick

Docteur, Polyplus Transfection

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactive (UMR 7199), à la faculté de pharmacie d'Illkirch, et plus particulièrement au sein de l'équipe V-SAT (Vecteurs : Synthèse, Application & Toxicologie), sous la direction conjointe du Dr. Luc Lebeau et du Dr. Jean-Serge Remy. Ce manuscrit est le résultat de trois années et demie de travail, une longue période durant laquelle je me suis pleinement épanoui, à la fois à ma paillasse de chimie mais également en salle de culture.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier de la Région Alsace et du Laboratoire d'excellence (LabEx) Médalis, c'est pourquoi je remercie vivement chacun d'eux. Je suis également reconnaissant de l'association « L'alsace contre le cancer », qui m'a accordée sa confiance en finançant les six mois additionnels de ce doctorat, ce qui m'a permis de mener à bien les différents objectifs que je m'étais fixé.

Je remercie le Professeur Paul-Alain Jaffrès, le Professeur Philippe Barthélémy et le Docteur Patrick Erbacher, pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury et d'évaluer mon travail. Je remercie par ailleurs le Docteur Patrick Erbacher et le Docteur Thomas Grutter pour avoir participé à mon jury de mi-thèse et pour m'avoir guidé pour la fin de mes travaux.

Je souhaite tout naturellement remercier mes directeurs de thèse, le Dr. Luc Lebeau et le Dr. Jean-Serge Remy, pour m'avoir accueilli dans leur équipe et m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet à l'interface de la chimie et la biologie, alors que je ne possédais aucun bagage en biologie. Je ne prétendrai pas être devenu biologiste à l'issue de cette thèse mais j'ai indéniablement progressé.

Je remercie tout particulièrement Luc qui m'a guidé durant tout ce doctorat et qui a su prendre le temps pour des discussions, parfois un peu longues je l'admets, des interprétations, de l'aide à la paillasse mais aussi pour sa patience durant la rédaction de ce manuscrit.

Jean-Serge, tes responsabilités en tant que directeur d'unité et directeur d'école doctorale t'ont rendu peu disponible, mais je te remercie de la confiance que tu m'as accordée pendant cette thèse et je t'en suis reconnaissant. Tu as toutefois su me consacrer du temps lorsque j'en avais besoin et ta bonne humeur et ton relativisme m'ont souvent aidé dans les moments difficiles.

Un grand merci également au Professeur Françoise Pons, pour son aide précieuse en biologie, ses conseils réguliers et sa patience lorsque je monopolisais le chef à l'heure du départ.

Je remercie bien sûr toute l'équipe des chimistes, Mickaël, Micka, Luc, Aurélie, Léo, Pauline, Zaid, pour la bonne humeur quotidienne au labo, même lorsque les manips ne marchent pas... Je remercie également nos voisins de palier (Sri, Lucie, Tic & Tac, Stéphou, Manon...) pour les échanges scientifiques ou juste pour les moments passés avec vous.

Je remercie également l'équipe des biologistes, Maud, Thomas, Anne, Carole, Yasmin et Juliette, une autre belle et joyeuse bande. Un grand merci en particulier à Chloé et Marc qui m'ont initié à la culture cellulaire et à tant de techniques qui me semblaient bien obscure au départ. La rigueur qu'ils m'ont inculquée s'est retranscrite sur tout mon travail et je les remercie pour cela.

Il est évident qu'une thèse ce n'est pas que le labo et je pense que ma santé mentale n'aurait pas tenu le coup si je n'avais pas eu la muletterie (Dada, Vlad, la Truite, PA, H, Flo' et le Jap'), les Strasbourgeois (David, Blandine, Alice, Fallia, Maeva, Elo, Thomas, Zélie, Franck, Pauline), la Troupe (Alice, David, Blandine, Fallia, P, Eloyse, Thibaut, Elo) ou même la possibilité d'aller à Crossfit Strasbourg (avec Thomas, Zélie, Elo, Franck, les coachs et tous les autres adhérents...).

Je remercie bien évidemment toute ma famille, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui, en particulier mes parents Denis et Laurence et mon frère Arthur. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix et vous avez même subi une semaine complète de rédaction à domicile. Je sais que cette thèse c'est un grand charabia, mais je sais aussi que vous êtes fiers de ce charabia.

Et bien évidemment, je remercie mon Elodie, avec qui je partage ma vie et qui me supporte au quotidien. Tu me connais mieux que personne et je pense qu'il me faudrait écrire un autre manuscrit pour pouvoir exprimer l'amour que je te porte et le bonheur que tu m'apportes. Merci à toi.

Sommaire

Sommaire	1
Abréviations	5
Introduction générale	7
Chapitre 1 - Introduction bibliographique	11
I. Le cancer	13
I.1. Qu'est-ce que le cancer ?.....	13
I.2. Les chiffres du cancer	14
I.3. Les facteurs de risque.....	15
I.3.1. Les facteurs évitables	15
I.3.2. Les facteurs non évitables	16
I.4. Les thérapies	16
I.4.1. Chirurgie.....	16
I.4.2. Radiothérapie.....	17
I.4.3. Hadronthérapie.....	17
I.4.4. Hormonothérapie	18
I.4.5. Immunothérapie	18
I.4.6. Chimiothérapie.....	19
I.4.7. Combothérapies	23
II. Les alkylphospholipides (APLs) contre le cancer	24
II.1. APLs : de leur découverte aux applications cliniques	24
II.1.1. Les LPC à l'origine des APLs	24
II.1.2. Édelfosine.....	25
II.1.3. Miltéfosine	25
II.1.4. Périfosine.....	26
II.1.5. Érufosine	27
II.2. Mécanismes d'action des APLs.....	28
II.2.1. Internalisation et résistance cellulaire	29
II.2.2. Interférence avec le métabolisme	31
II.2.3. Inhibition des voies de signalisation de la survie cellulaire	32
II.2.4. Activation des voies de signalisation pro-apoptotiques	32
II.2.5. Activation de l'autophagie	34
II.3. Sélectivité tumorale	35
II.4. APLs et combothérapie	35
II.4.1. APLs et radiothérapie	36
II.4.2. APLs et chimiothérapie conventionnelle	36
II.4.3. Cancer, thérapie génique et APLs	36

III. La thérapie génique contre le cancer	37
III.1. Les acides nucléiques comme médicaments	37
III.1.1. Les plasmides d'ADN.....	37
III.1.2. L'utilisation thérapeutique d'un plasmide TRAIL	38
III.1.3. Les petits ARN interférents (siARN)	42
III.1.4. Les autres types d'acides nucléiques	44
III.2. La vectorisation des acides nucléiques	45
III.2.1. Les vecteurs viraux.....	45
III.2.2. Les méthodes physiques pour le transfert de gènes.....	47
III.2.3. Les vecteurs non-viraux.....	49
III.3. Les obstacles au transfert non-viral de gènes.....	54
III.3.1. À l'échelle du corps entier	54
III.3.2. À l'échelle de la tumeur	57
III.3.3. À l'échelle de la cellule	62
IV. Conclusion et objectifs de la thèse.....	68
Chapitre 2 - Conception de prodrogues cationiques d'alkylphospholipides (pro-APLs).....	71
I. Des APLs aux pro-APLs.....	73
I.1. Cahier des charges	74
I.1.1. Caractère cationique des pro-APLs.....	74
I.1.2. Caractère biolabile des pro-APLs	74
I.1.3. Caractère biocompatible des pro-APLs.....	75
I.2. Prodrogues de phosphodiester.....	75
I.3. Design des pro-APLs	78
I.3.1. Stratégie générale.....	78
I.3.2. Choix des APLs	79
I.4. Cibles, nomenclature et rétrosynthèse.....	79
I.5. Pro-APLs de II ^{ème} génération.....	82
I.5.1. Conjugés érufosine-DTG.....	82
I.5.2. Pro-érufosines « tricaténaires ».....	83
I.5.3. Pro-APLs geminis	84
II. Synthèse des vecteurs	85
II.1. Synthèse des APLs	85
II.1.1. Miltéfosine	86
II.1.2. Périfosine.....	86
II.1.3. Érufosine	87
II.2. Synthèse des électrophiles.....	87
II.2.1. Esters de 1-chloroalkyle.....	87
II.2.2. Carbonates de 1-chloroalkyle.....	89

II.2.3. Triflates d'alkyle.....	90
II.2.4. Électrophiles bicaténaires et homobifonctionnels	90
II.3. Synthèse des pro-APLs	93
II.3.1. Procédure générale.....	93
II.3.2. Pro-miltéfosines.....	93
II.3.3. Pro-périfosines.....	94
II.3.4. Pro-érufosines.....	94
III. Conformité au cahier des charges	95
III.1. Interaction entre pro-APLs et acide nucléique.....	95
III.2. Dégradabilité des pro-APLs.....	96
III.3. CMC/CAC des pro-APLs et biocompatibilité	98
IV. Conclusion.....	101

Chapitre 3 - Développement de formulations de pro-APLs pour une combothérapie antitumorale..... 103

I. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection de siARN.....	105
I.1. Le gène rapporteur de la luciférase en transfert de siARN	105
I.2. Complexation du siARN par les pro-APLs	106
I.3. Résultats de vectorisation et optimisations des conditions.....	107
I.3.1. Résultats	108
I.3.2. Optimisation par modification du protocole de transfection	109
I.3.3. Optimisation par introduction de DOPE dans les formulations	109
I.3.4. Optimisation par l'emploi des pro-APLs de II ^{ème} génération.....	110
I.4. Conclusion sur la délivrance de siARN par les pro-APLs	111
II. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection d'ADN	112
II.1. Le gène rapporteur de la luciférase en transfert d'ADN.....	112
II.2. Complexation et condensation de l'ADN par les pro-APLs	113
II.3. Résultats de vectorisation et optimisations	114
II.3.1. Influence de la nature du lien clivable	115
II.3.2. Étude de l'influence de la DOPE dans les formulations	116
II.3.3. Étude de la cinétique d'expression du transgène.....	118
II.3.4. Étude des conditions de formulation des lipoplexes d'ADN	119
II.3.5. Étude de l'influence de la chaîne alkyle du motif clivable	120
II.3.6. Études des pro-APLs de II ^{ème} génération.....	122
II.3.7. Optimisation 3 candidats retenus.....	123
II.4. Conclusion sur la délivrance d'ADN.....	125
III. Les pro-APLs comme prodrogues antitumorales	125
III.1. Toxicité des APLs et des pro-APLs sur les cellules pulmonaires.....	125
III.2. Toxicité des APLs et des pro-APLs pour les cellules sanguines	128

III.3. Conclusion sur la toxicité des pro-APLs	131
IV. Les pro-APLs en combothérapie antitumorale	131
IV.1. Le choix du modèle <i>in vitro</i>	132
IV.1.1. Les récepteurs de TRAIL.....	132
IV.1.2. La sensibilité à TRAIL	133
IV.2. Résultats de vectorisation d'ADN codant TRAIL	134
IV.2.1. Le plasmide pEGFP-TRAIL	134
IV.2.2. Le plasmide pUNO1-hTRAIL	135
IV.3. Conclusion sur la transfection thérapeutique.....	138
V. Conclusion.....	138
Conclusion générale et perspectives	141
Partie expérimentale.....	147
Références bibliographiques	207
Annexe.....	227

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
APLs	Alkylphospholipides
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine de sérum bovin
C₁₂E₄	Tétraéthylène glycol monododécyle éther
CAC	Concentration d'agrégation critique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMC	Concentration micellaire critique
DDQ	<i>2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone</i>
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMAP	<i>diméthylaminopyridine</i>
DOPC	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DOPE	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>
équiv.	Équivalent
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
ESI	<i>Ionisation électrospray</i>
Et₃N	Triéthylamine
Glc 5%	Glucose à 5 %
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HR-MS	Spectrométrie de masse haute performance
IC₅₀	Concentration à 50% d'inhibition
i.v.	Intraveineux
Luc	Luciférase
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5-diphényltétrazolium
N/P	Ratio de charge d'un complexe
PBS	Tampon phosphate salin Polydiacétylénique
PMB	<i>p</i> -méthoxybenzyl
pmm	Partie par million
pro-APL	Prodrogue d'alkylphospholipide
R_f	Rapport frontal
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotation par minute
siARN	<i>small interfering</i> ARN / petit ARN interférent
siC	siARN contrôle
siLuc	siARN dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine de la luciférase
SVF	Sérum de veau fœtal
ta	Température ambiante
TBE	Tampon tris-borate-EDTA
THF	Tétrahydrofurane
TRAIL	<i>Tumour necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
UV	Ultraviolet

Introduction générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité des précédentes recherches réalisées dans l'équipe de Vecteurs - Synthèse, Applications & Toxicologie. Parmi les différentes thématiques de recherche étudiées, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à la conception de systèmes lipidiques pour le développement de vecteurs non-viraux pour la thérapie génique. Certaines des constructions établies au laboratoire ont permis d'obtenir d'excellents résultats sur des modèles *in vitro* et *in vivo* et nous avons souhaité, en travaillant sur le même concept, développer de nouveaux vecteurs permettant de combiner plusieurs approches thérapeutiques, thérapie génique et chimiothérapie.

En effet, la thérapie génique pourrait constituer une avancée majeure de la médecine du 21^{ème} siècle, car elle vise à réparer la cause d'un dysfonctionnement cellulaire à l'origine d'une maladie, au lieu de n'en traiter que les symptômes. Elle constitue en particulier une importante source d'espoir dans la lutte contre le cancer, une des causes majeures de mortalité dans le monde (13 % des décès en 2012). L'émergence de phénomènes de résistance tumorale constitue une sérieuse entrave aux actuelles thérapies antitumorales peut, fort heureusement, être combattue de façon de plus en plus efficace à l'aide de combinaisons de différentes thérapies anticancéreuses.

C'est dans ce contexte que ce travail de doctorat a été mené avec, pour objectif, le développement de nouveaux outils pour la thérapie génique qui s'inscrivent dans le concept de combothérapie antitumorale. Ce projet de thèse se situe à l'interface de la chimie et de la biologie et s'est déroulé en alternant des phases de synthèse et des phases d'évaluation biologique. Chimiste de formation, pour pouvoir gérer moi-même ces deux aspects de mon projet, j'ai été formé en interne à l'ensemble des techniques impliquées dans l'évaluation biologique des composés produits.

Ce mémoire décrit donc l'essentiel des travaux que j'ai réalisés pour le développement spécifique de systèmes lipidiques innovants dédiés à la délivrance simultanée de plusieurs agents thérapeutiques (un gène "médicament" et un agent de chimiothérapie conventionnel), en tirant profit des travaux antérieurs du laboratoire.

Le **Chapitre 1** se présente sous la forme d'une étude bibliographique qui aborde, dans un premier temps, les notions de cancer et de thérapies anticancéreuses conventionnelles. Les fondamentaux de notre stratégie anticancéreuse sont ensuite décrits au travers d'une présentation générale des alkylphospholipides (APLs), comme nouvelle classe d'agents anticancéreux, suivie d'un exposé sur la thérapie génique, ses enjeux et ses obstacles. Enfin, nous décrivons notre vision d'une utilisation de dérivés d'alkylphospholipides en tant que nouveaux actifs thérapeutiques avec un potentiel en thérapie génique et en oncologie.

Le **Chapitre 2** expose, en premier lieu, les raisonnements sur lesquels se fonde la conception de prodrogues cationiques d'alkylphospholipides (pro-APLs) issus de trois composés APLs prometteurs et introduits dans le premier chapitre, à savoir la miltéfosine, la périfosine et l'érufosine. Par la suite, les travaux de synthèse portant sur les APLs sont rappelés et les voies de synthèse utilisées au cours de ce travail sont présentées de façon critique. Enfin, la conformité des pro-APLs à un cahier des charges préalablement établi est analysée à l'aide de diverses études et caractérisations physico-chimiques.

Le **Chapitre 3** relate le développement des formulations à base de pro-APLs conçues dans l'optique d'une combothérapie anticancéreuse innovante, alliant la vectorisation d'acide nucléique avec la génération *in situ* des agents antitumoraux que sont les APLs. Les approches thérapeutiques par thérapie génique (siARN, puis plasmide d'ADN) et par la stratégie de prodrogues antitumorales sont présentées indépendamment, en amont de l'exposé du modèle de combothérapie antitumorale utilisé dans notre étude.

À l'issue de ces trois chapitres, nous présentons une conclusion générale sur nos travaux et discutons des perspectives offertes par les pro-APLs.

Enfin, une partie expérimentale complète décrit les synthèses des différentes molécules préparées au cours de cette thèse, les protocoles expérimentaux ainsi que les diverses méthodes utilisées lors de l'évaluation biologique de nos composés.

Le manuscrit se termine sur la liste des références bibliographiques évoquées dans les différents chapitres, ainsi qu'une annexe regroupant la liste des pro-APLs étudiés lors de ces travaux.

Chapitre 1
-
Introduction bibliographique

I. Le cancer

I.1. Qu'est-ce que le cancer ?

Le cancer se définit comme l'ensemble des pathologies associées à une prolifération anormale de cellules qui, échappant au contrôle de l'organisme, se multiplie indéfiniment. Celles-ci envahissent alors les tissus voisins en les détruisant et se répandent dans l'organisme en métastases. Cette pathologie porte un nom différent selon le tissu dont il est question. On parlera de carcinome lorsque la tumeur se développe à partir du tissu épithélial, comme pour le poumon, le sein, la peau, le côlon, ou encore la prostate. Lorsque ce dernier est une glande sécrétoire, c'est d'un adénocarcinome. Les sarcomes sont des tumeurs malignes associées aux muscles et aux os. Quant aux lymphomes, ce sont des tumeurs malignes qui se développent dans les ganglions et vaisseaux lymphatiques, les tissus impliqués dans les défenses immunitaires de l'organisme. Enfin, il y a les leucémies, des cancers qui se développent dans la moelle osseuse et concernent particulièrement les cellules destinées à la production des globules blancs.

Au cours des divisions cellulaires et sous l'influence d'agressions extérieures (tabac, alcool, rayons UV, infections...) ou d'instabilités génétiques, il peut apparaître des altérations de l'ADN pouvant conduire à des mutations. En temps normal, un système de réparation permet l'identification et la correction de ces anomalies. Lorsque celles-ci ne sont pas réparables, le processus d'apoptose se met en place au sein des cellules concernées, programmant ainsi leur auto-destruction. Une défaillance du système de réparation peut donc conduire à la multiplication anarchique de cellules qui présentent des mutations. Cet échappement au contrôle de l'organisme favorise ainsi la formation d'une tumeur (Figure 1).

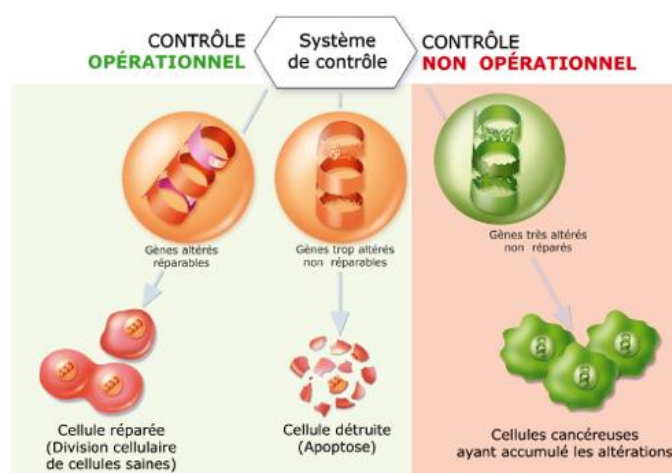


Figure 1. Le dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN, dans le cadre de la réparation des gènes, peut entraîner la prolifération de cellules cancéreuses.

Dans le cas d'une tumeur bénigne, la fonctionnalité des cellules concernées n'est pas remise en cause, en raison d'un faible nombre d'altérations, et ces cellules n'ont pas la capacité d'envahir

d'autres organes. Concernant les tumeurs malignes, le grand nombre de mutations accumulées par les cellules au cours du temps conduit à l'acquisition de nouvelles fonctions favorisant la progression tumorale et l'apparition de métastases, au détriment du fonctionnement normal des cellules. Une représentation de ces fonctions acquises a été proposée par Weinberg et Hanahan en 2000, puis en 2011, et met en avant les caractéristiques d'un tissu qui peuvent être favorables au développement d'un cancer (Figure 2).^{1,2}

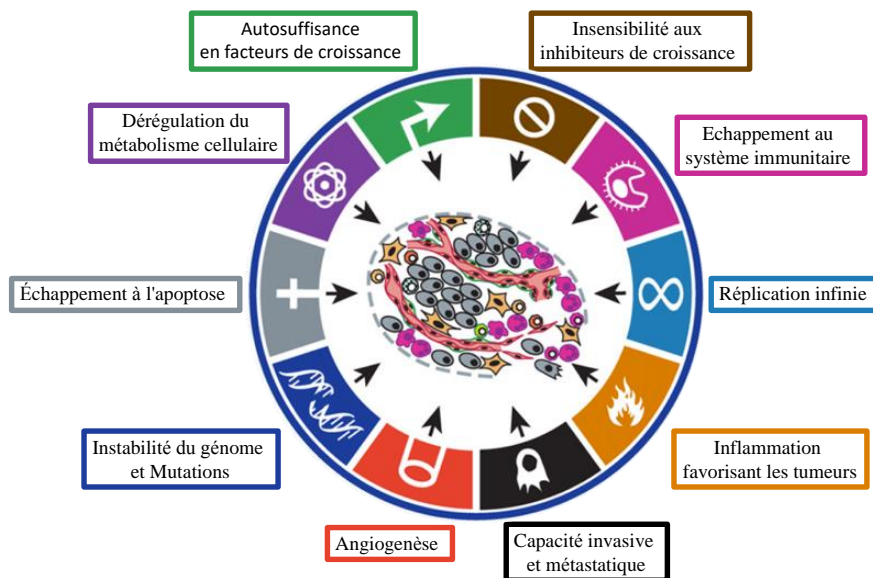


Figure 2. Les 10 caractéristiques ou capacités acquises des cellules tumorales, selon Weinberg et Hanahan.²

I.2. Les chiffres du cancer

Selon un rapport du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC),³ pas moins de 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde en 2012. Plus de 60 % des cas concernaient les populations d'Afrique, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud. Plus accablant encore, durant cette seule année 2012, environ 8,2 millions de personnes sont décédées d'un cancer dans le monde, dont 70 % dans les régions précédemment citées. Le cancer du poumon était responsable du plus grand nombre de décès chez les hommes (23,6 %) et constitue la seconde cause de mortalité par cancer chez les femmes (13,8 %), après le cancer du sein (14,7 %).

En France, l'Institut National du Cancer (INCa) indique dans un rapport publié en 2018⁴ que 400 000 nouveaux cas de cancer ont été décelés en 2017, et estime à 150 000 le nombre de décès causés par un cancer avec, en première ligne, le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer de la prostate chez l'homme, et le cancer du sein chez la femme. Le cancer est ainsi la première cause de mortalité prématurée (décès survenu avant 65 ans), devant les maladies cardiovasculaires, dans notre pays.

Néanmoins, les progrès de la recherche ont permis, ces dernières années, d'augmenter l'efficacité des traitements et le taux de guérison. On parle de guérison lorsqu'aucun signe de

rechute n'a été décelé pendant les 5 années qui suivent le traitement. Le taux de guérison varie fortement selon la nature du cancer. Il est actuellement estimé à 87 % pour les cancers du sein, à 94 % pour les cancers de la prostate, à 63 % pour le cancer colorectal mais seulement à 17 % pour les cancers du poumon.⁴

I.3. Les facteurs de risque

Comme il a été mentionné précédemment, le cancer est le produit d'une accumulation d'anomalies génétiques qui peuvent être causées par de multiples facteurs. Concernant la France, les principaux facteurs de risque ont été inventoriés en 2007 dans un rapport du CIRC.⁵ On peut les classer en deux groupes : les facteurs évitables (comportementaux et environnementaux) et les facteurs non évitables.

I.3.1. Les facteurs évitables

La consommation de tabac constitue le principal facteur de risque de cancer évitable connu. Elle est responsable de plus de 30 % des tumeurs malignes et d'un quart des décès par cancer. Le tabagisme passif ne doit pas non plus être négligé : on estime qu'il a causé plus de 250 décès en France en 2000. Certaines habitudes alimentaires peuvent également être impliquées dans la survenue des cancers, comme la consommation excessive de viandes animales ou de charcuterie, dans le cas du cancer colorectal. L'excès de sel et d'aliments salés exposerait à un risque de cancer de l'estomac. Enfin, l'abus d'alcool est responsable de 6 % de l'ensemble des cancers en France, principalement les cancers de la bouche, du pharynx, du larynx et du foie. L'exposition aux UV (soleil, cabines de bronzage...) est un facteur de risque bien connu de cancer de la peau et est impliquée dans environ 70 % des mélanomes. Enfin, la sédentarité, l'absence d'activité physique, le surpoids et l'obésité peuvent aussi représenter un risque de développer certains cancers. À l'inverse, certaines habitudes de vie peuvent s'avérer être des facteurs protecteurs contre le cancer. L'activité physique, au même titre que la consommation de fruits, de légumes, d'aliments riches en fibres ou de produits laitiers peuvent ainsi être bénéfiques.⁶

Si certains facteurs sont liés à notre comportement, d'autres sont liés à l'environnement et à notre cadre de vie. Les polluants,⁷ incluant des substances comme l'amiante, le benzène, le chrome, la poussière de bois, ou les pesticides qui peuvent être retrouvés dans l'alimentation, seraient responsables d'environ 1 % des cancers. Les infections subies par l'organisme ont également un rôle dans l'apparition de certaines tumeurs. Des infections par les virus des hépatites B et C seraient impliquées dans 75 % des cas de cancers du foie, et celles par les papillomavirus humains le seraient dans 70 % des cancers du col de l'utérus.

Paradoxalement, mais sans surprise, des traitements tels que la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'administration d'immunosuppresseurs peuvent aussi augmenter les risques de cancer, en particulier des cancers du sang et de la peau.

I.3.2. Les facteurs non évitables

Si certains facteurs peuvent être maîtrisés, voire totalement évités, il n'en est rien en ce qui concerne la vieillesse, les variations du système hormonal ou les prédispositions génétiques. En effet, la vieillesse, exemple par excellence de facteur non évitable, conduit à l'accumulation de lésions dans l'ADN des cellules et augmente la probabilité que celles-ci conduisent à la formation d'une tumeur. Les hormones et leur dérèglement accompagnent l'organisme tout au long de la vie, notamment durant la puberté, les périodes de grossesses, de ménopause ou d'andropause, pouvant alors avoir une incidence sur le cancer. La prise de contraceptifs oraux ou de traitements hormonaux peut ainsi être impliquée dans le développement de cancers et pourrait, dans certains cas, être classée dans la catégorie des facteurs évitables. Les prédispositions génétiques héréditaires, pour leur part, semblent responsables d'environ 10 % des cancers et peuvent même représenter la principale origine de certains cancers, comme c'est le cas pour la tumeur du rein de Wilms. Les déficits immunitaires, présents dans le cas des maladies inflammatoires ou auto-immunes, sont quant à eux associés à un risque augmenté de lymphome.

I.4. Les thérapies

Compte tenu de la multitude de cancers et de la diversité des profils des patients, de nombreuses stratégies ont été élaborées pour prévenir, éliminer ou contenir la progression tumorale. Les traitements décrits ci-dessous constituent les principales approches thérapeutiques mises en œuvre, mais la liste n'est pas exhaustive.

I.4.1. Chirurgie

L'opération chirurgicale, la méthode la plus ancienne, consiste à retirer physiquement la tumeur et constitue aujourd'hui l'option thérapeutique la plus fréquemment utilisée (dans 80 % des cas). Cette pratique peut être à visée curative, diagnostique ou palliative, et le type d'intervention dépend de la nature du cancer. Plus la tumeur est petite et plus les chances de succès sont importantes. Par ailleurs, aucun phénomène de résistance tumorale ne peut se développer à la suite de ce type de thérapie.

I.4.2. Radiothérapie

La radiothérapie est actuellement impliquée dans plus de la moitié des traitements de cancers.⁸ Elle repose sur l'application locale d'un faisceau de photons à forte énergie, de rayons gamma ou de rayons X, pour détruire les cellules cancéreuses par induction de leur apoptose.⁹ Le plus souvent, la tumeur est irradiée au moyen d'une source externe, d'où le nom de **radiothérapie externe conventionnelle**. Les rayons doivent alors traverser la peau du patient pour atteindre, de manière non spécifique, la zone des tissus à traiter.

Les rayonnements peuvent aussi provenir d'une source interne, préalablement introduite dans la tumeur, ou à proximité de celle-ci. Il s'agit en général de microsphères ou de fils composés d'iridium ou de césium radioactif et on parle dans ce cas de **curiethérapie**. La radiothérapie, seule ou associée à la chimiothérapie, est généralement à visée curative, mais peut constituer un traitement palliatif, par exemple pour diminuer la taille de la tumeur et augmenter les chances de retirer toutes les cellules cancéreuses lors d'une chirurgie à venir.

Les limitations de la radiothérapie proviennent des risques d'irradiation des cellules saines voisines de la tumeur à éradiquer qui peuvent occasionner de sévères effets secondaires.

I.4.3. Hadronthérapie

Cette technique est une modalité de radiothérapie externe spécifique, basée sur l'utilisation d'un faisceau d'ions légers, appelés hadrons. On parle de **protonthérapie** ou **carbonethérapie** si ces hadrons sont des protons ou des ions carbone.¹⁰⁻¹³

Lors d'une irradiation conventionnelle (*i.e.*, par des photons), le rayonnement traverse les tissus en leur transmettant une certaine énergie dont le niveau décroît avec la profondeur. Dans le cas d'ions légers, les particules sont stoppées dans la matière et c'est en fin de parcours que la libération d'énergie est la plus importante, c'est le pic de Bragg. L'énergie de la particule est dissipée sur une courte distance et à une profondeur donnée en fonction de l'énergie initiale. En modulant l'énergie du faisceau incident il est ainsi possible de superposer des pics de Bragg natifs pour obtenir un pic de Bragg étalé offrant ainsi une efficacité supérieure à celles des photons, par transmission d'un maximum d'énergie à la tumeur (Figure 3).

Cela permet d'atteindre plus précisément des tumeurs profondes, non opérables ou résistantes aux rayons X, en épargnant mieux les tissus sains voisins. En contrepartie un contrôle plus rigoureux du tir est nécessaire, sous peine d'endommager les cellules saines plus gravement qu'avec un traitement classique.

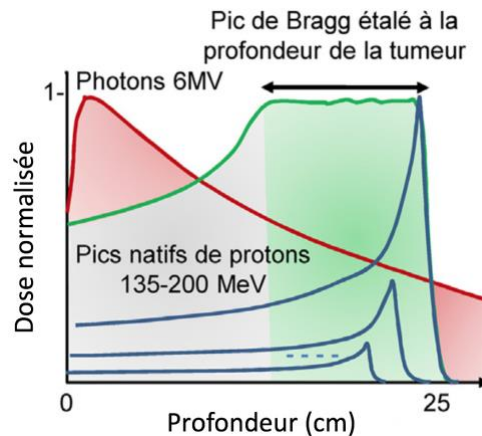


Figure 3. Distribution de dose en profondeur des photons (en rouge), des protons natifs (en bleu) et de la superposition de différents protons natifs formant un pic de Bragg étalé (en vert).¹³

I.4.4. Hormonothérapie

Contrairement à la radiothérapie, l'hormonothérapie n'a pas pour but d'éradiquer la tumeur mais plutôt d'entraver sa prolifération, en bloquant la production ou l'action de certaines hormones favorables à la prolifération des cellules tumorales (qui présentent les récepteurs associés). Cette thérapie est principalement prescrite dans les cas des cancers dits hormono-dépendants (cancer du sein, de l'endomètre et de la prostate, par exemple) impliquant les œstrogènes, la progestérone ou la testostérone. Plus particulièrement, il s'agit d'un traitement de référence lorsqu'il s'agit de cancers métastatiques de la prostate.

Il est possible de recourir à l'intervention chirurgicale pour retirer l'organe responsable de la production de l'hormone incriminée, ou d'administrer par voie orale ou sous cutanée des substances bloquant la production de celle-ci. Ainsi, les agonistes de la gonadolibérine permettent de bloquer la production de la testostérone par les testicules, ou des œstrogènes par les ovaires. Il est également possible d'altérer le fonctionnement de l'hormone en empêchant la liaison à son récepteur par utilisation d'un antagoniste, une anti-hormone, comme le tamoxifène, un anti-œstrogènes utilisé dans le cas du cancer du sein, ou l'acétate de cyprotérone, un anti-androgène qui prend la place de la testostérone sur les récepteurs hormonaux des cellules cancéreuses. Néanmoins, agir sur une hormone en supprimant sa production ou en interférant avec son fonctionnement peut causer des effets secondaires multiples, propres à chaque individu et variables selon le traitement utilisé.

I.4.5. Immunothérapie

L'immunothérapie est une stratégie thérapeutique ciblée, au même titre que l'hormonothérapie, qui regroupe l'ensemble des traitements faisant intervenir le système immunitaire du patient pour vaincre la tumeur, en le modulant.¹⁴ L'**immunothérapie active** est une stimulation générale du système immunitaire à l'aide de vaccins, comme le BCG, permettant l'obtention d'une mémoire immunitaire susceptible de réduire le risque de rechute ou l'apparition

de nouvelles tumeurs. L'**immunothérapie passive**, quant à elle, consiste à injecter des stimulants spécifiques de la réponse immunitaire, à l'image de l'anticorps monoclonal pembrolizumab qui est un inhibiteur de point de contrôle prescrit pour traiter le cancer du poumon. Le système immunitaire est capable d'identifier les cellules saines de l'organisme en reconnaissant des ligands spécifiques à leurs surfaces, des points de contrôle, comme la protéine PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*).

Certaines cellules cancéreuses expriment le ligand de PD-1 (PD-L1), ce qui leur permet de passer pour des cellules normales et d'échapper au système immunitaire. Le pembrolizumab bloque le point de contrôle PD-1 situé sur les lymphocytes T et empêche son interaction avec le ligand PD-L1 situé sur les cellules tumorales, restaurant ainsi l'activité des lymphocytes à l'encontre de ces cellules tumorales démasquées. Enfin, l'**immunothérapie adoptive** se traduit par l'enrichissement du système immunitaire du patient par des cellules immunologiquement compétentes provenant d'un autre patient, grâce à la greffe, de moelle par exemple. L'utilisation de cette stratégie est cependant limitée par la compatibilité entre le donneur et le patient.

I.4.6. Chimiothérapie

La chimiothérapie regroupe la totalité des traitements systémiques visant à éliminer les cellules cancéreuses par le biais de molécules chimiques cytotoxiques. De manière générale, ces traitements agissent sur divers processus liés à la multiplication des cellules, les cellules tumorales se divisant rapidement. Ils ne discriminent pas les cellules tumorales des cellules saines et entraînent donc des effets secondaires allant d'une simple chute des cheveux à la destruction des globules blancs, éléments essentiels du système immunitaire. Néanmoins, en raison d'un nombre de cellules tumorales nettement plus faible que celui des cellules saines, l'efficacité des traitements par chimiothérapie donne des résultats satisfaisants dans de nombreux cas.

Les modes d'actions de ces traitements sont divers et variés, mais il est possible de les classer en 2 groupes majeurs. D'un côté se trouvent les modes d'action qui agissent sur la division cellulaire,¹⁵ par un ciblage de l'ADN ou des processus de réplication de celui-ci ou encore des processus de mitose. La seconde classe regroupe les modes d'action qui ciblent spécifiquement le développement tumoral,¹⁶ par une perturbation de la croissance cellulaire, de l'angiogenèse et de la signalisation membranaire associée.

I.4.6.1 Ciblage direct de l'ADN

Une première manière d'altérer l'ADN est d'introduire des molécules planes au sein des double brins afin d'induire une distorsion de l'hélice et rendre les séquences inutilisables par les enzymes engagées dans la réplication de l'ADN. On parle alors d'**agents intercalants** et la doxorubicine ou la mitoxantrone, de la famille des anthracyclines qui inhibent l'action de la topoisomérase II par intercalation entre les brins, en sont des exemples (Figure 4). On peut

également citer la bléomycine qui fait une pseudo intercalation dans l'ADN double brin et forme un complexe avec les ions ferreux environnants, induisant la production de radicaux oxygénés responsables de ruptures simple ou double brin dans l'ADN.¹⁷

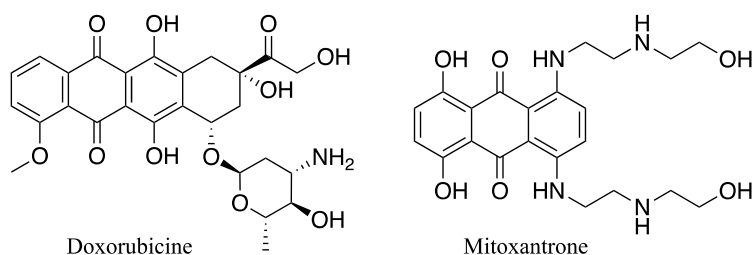


Figure 4. Deux agents intercalants de l'ADN issus de la famille des anthracyclines et qui présentent des structures planes, favorables à l'insertion entre les paires de bases de l'ADN.

Les **agents alkylants** sont également susceptibles d'engendrer des dommages à l'ADN. Ces espèces électrophiles réagissent avec des atomes riches en électrons dans les bases de l'ADN, créant ainsi des liaisons covalentes. Le témozolomide agit par *N*- ou *O*-méthylation des guanines. D'autres agents alkylants, bifonctionnels, sont capables de ponter deux bases de l'ADN entre-elles, au sein d'un même brin, ou entre deux brins différents. C'est le cas du *cis*-platine qui provoque ainsi une distorsion du brin d'ADN¹⁸ et du chlorambucil, de la famille des moutardes à l'azote, qui est capable de *N*-alkyler deux guanines et de les ponter entre-elles. Les modifications chimiques engendrées par les agents alkylants entraînent l'arrêt du processus de réplication et donc, à terme, la mort des cellules, sans toutefois présenter de spécificité.

1.4.6.2 Ciblage des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN

Si l'altération directe de l'ADN permet d'induire des conséquences sur le processus de réplication, le ciblage des enzymes intervenant dans ce processus de réplication offre une autre possibilité d'action. Les topoisomérases I et II sont des enzymes qui induisent les cassures transitoires de l'ADN qui sont nécessaires pour démêler les surenroulements de celui-ci lors de la réplication, et les inhibiteurs de topoisomérases sont donc tout indiqués en chimiothérapie. La camptothécine et l'étoposide sont des poisons des topoisomérases I et II, respectivement, qui stabilisent les complexes ADN-enzyme, rendant irréversible la cassure simple ou double brin qui a été initiée, et enraillant ainsi le processus de réplication.

Les **antimétabolites** constituent une autre classe d'inhibiteurs qui peuvent cibler l'ADN polymérase (aphidicoline¹⁹), certaines enzymes en charge de la synthèse des purines et des pyrimidines, principalement la thymidine synthase (5-fluorouracile ou 5-FU), ou encore la dihydrofolate réductase (méthotrexate). Par ailleurs, compte tenu de leur similitude structurale avec les nucléosides, des molécules telles que la 5-FU ou la 6-mercaptopurine jouent un rôle de "terminateur de chaîne", après métabolisation en triphosphate correspondant, et leur incorporation dans le brin d'ADN en cours de réplication bloque le processus d'élongation.²⁰

Les deux classes d'inhibiteurs présentées ci-dessus voient leur action drastiquement contrecarrée par la cellule qui met en place un arsenal d'outils de réparation de l'ADN. Des nucléases peuvent réaliser l'excision d'une base ou de plusieurs nucléotides et permettre la recombinaison de brin par copie du brin intact. Par exemple, les alkyltransférases sont en mesure de corriger les dommages engendrés par le témozolomide. Ces enzymes peuvent donc elles-mêmes constituer des cibles pour de nouveaux inhibiteurs.

1.4.6.3 Ciblage des microtubules au cours de la mitose

Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette qui jouent un rôle très important dans la division cellulaire, notamment lors de la formation du fuseau mitotique qui va permettre la migration des chromatides. Elles sont faites d'un assemblage polymérique de deux protéines (tubulines α et β) en équilibre dynamique constant (polymérisation \leftrightarrow dépolymérisation). En altérant cet équilibre, les **poisons du fuseau**, comme les alcaloïdes de Pervenche, et les **stabilisants du fuseau**, comme le paclitaxel de la famille des taxanes, perturbent le bon fonctionnement de la mitose et conduisent ainsi à l'apoptose.

1.4.6.4 Perturbation du développement tumoral

D'autres stratégies ont été développées dans le but d'entraver non plus le processus de division cellulaire mais celui de la croissance ou de la vascularisation tumorale, principalement par le biais des **inhibiteurs de kinases** et des **inhibiteurs d'angiogenèse**. La croissance cellulaire dépend de l'équilibre entre les facteurs et les inhibiteurs de croissance, des molécules de signalisation qui se lient à leurs récepteurs présents à la surface des cellules, comme l'EGF-R (*Epithelial Growth Factor Receptor*).²¹ Les cellules cancéreuses peuvent ignorer les signaux d'arrêt de croissance, surexprimer certains récepteurs des facteurs de croissance ou les garder actifs, voire même synthétiser leurs propres facteurs de croissance. Dans le cas des cancers pancréatiques ou du poumon à petites cellules, un **inhibiteur de kinases** fréquemment utilisé est le cetuximab, un anticorps monoclonal qui reconnaît le domaine extracellulaire de l'EGF-R et bloque ainsi la liaison du récepteur à son ligand. L'erlotinib, quant à lui, est une petite molécule qui inhibe l'activité des cytosines kinases associées à l'EGF-R intracellulaire. Un autre anticorps monoclonal, le trastuzumab, vise la protéine HER-2 (un récepteur du facteur de croissance épidermique humain) surexprimée dans certains cancers du sein et bloque ainsi le processus de développement tumoral.²² Le ciblage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (*Vascular Epidermal Growth Factor*) permet de contrôler l'angiogenèse, le processus conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le réseau existant, en réponse à un besoin en oxygène et autres nutriments de la part des cellules.²³ Empêcher l'approvisionnement des cellules tumorales en bloquant VEGF ou son récepteur (VEGF-R) constitue donc une possible approche thérapeutique.

Les principaux **inhibiteurs d'angiogenèse** utilisés à ce jour sont le bevacizumab, qui se lie au VEGF et bloque la liaison à son récepteur, et le sorafenib, un inhibiteur de VEGF-R. Une autre alternative consiste à détruire les vaisseaux générés à l'aide d'agents anti-vasculaires, comme l'acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique (DMXAA).²⁴

1.4.6.5 Ciblage des voies de signalisation

Les voies de signalisation cellulaires régissent les processus de survie et d'apoptose. Elles sont souvent modifiées dans les cellules cancéreuses afin de favoriser la prolifération tumorale. Inhiber les voies de la survie, ou activer celles de l'apoptose, constitue donc une approche thérapeutique à part entière.

Le vemurafenib est un inhibiteur de la protéine RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) approuvé en 2011 par la FDA²⁵ et utilisé pour bloquer la voie RAS/RAF/MEK/ERK impliquée dans les processus de prolifération cellulaire.²⁶ Son action inhibe la phosphorylation de protéines essentielles au bon fonctionnement de cette voie dans le cas de mélanomes métastatiques présentant la mutation V600E, fréquemment observée dans ces tumeurs. D'autres inhibiteurs spécifiques de cette voie de signalisation sont étudiés en cliniques pour le traitement de différents types de cancers.²⁷

Les alkylphospholipides (APLs) sont d'autres actifs antitumoraux qui possèdent des mécanismes d'action impliquant des voies de signalisation membranaires. La partie suivante de ce chapitre leur est entièrement consacrée, avec une description détaillée de leurs modes d'action.

1.4.6.6 Chimiothérapies combinées

Bien que les différentes stratégies de chimiothérapie aient toutes respectivement montré de bons résultats, l'administration conjointe de plusieurs actifs thérapeutiques s'avère, en général, plus efficace que l'utilisation isolée de chacun d'eux (monothérapies).²⁸ La combinaison de plusieurs médicaments (bevacizumab/doxorubicine, bevacizumab/paclitaxel...) ²⁹ ayant des modes d'action différents permet, notamment, de limiter ou retarder l'apparition des phénomènes de résistance tumorale rencontrés avec les monothérapies et, ainsi, d'éviter l'échappement thérapeutique. En effet, la diversité génétique des tumeurs solides est le résultat de résistances intrinsèquement liées à la nature de la tumeur, ou acquises suite à une réponse partielle à un traitement antérieur (Figure 5).

Parmi les mécanismes impliqués dans la résistance tumorale, on peut citer l'activation des voies de réparation de l'ADN, l'augmentation de l'activité des pompes à efflux qui conduit à une réduction de la concentration intracellulaire du médicament, la mutation des cibles thérapeutiques qui rend le médicament inefficace, ou encore la création de voies de signalisation parallèles qui tendent à préserver la survie de la cellule tumorale.^{30,31}

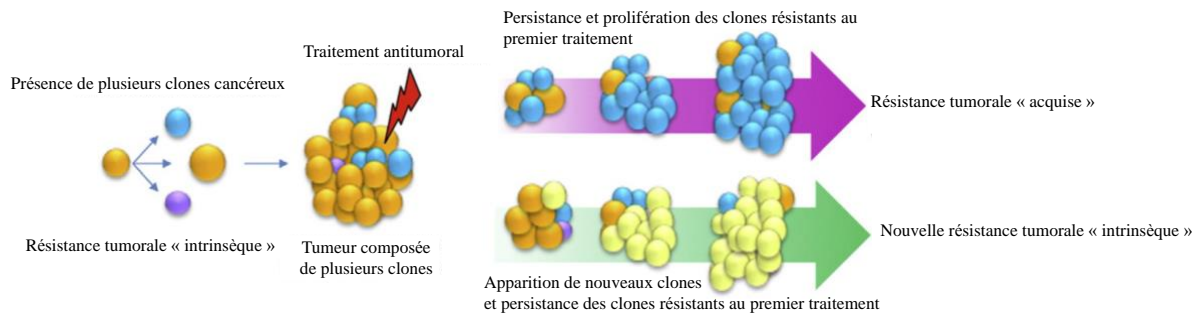


Figure 5. La résistance tumorale a plusieurs origines, dont la persistance après un traitement antérieur, ou l'apparition spontanée de nouveaux clones cancéreux.

1.4.6.7 Chimiothérapie et vectorisation

Pour améliorer l'efficacité d'un médicament et favoriser sa spécificité cellulaire, il est possible de le délivrer par le biais d'un vecteur. Le rôle de ce dernier est multiple. Il assure la protection du principe actif vis-à-vis des processus de dégradation et d'élimination, en limitant ses interactions avec le milieu biologique environnant. Par ailleurs, le vecteur limite les effets secondaires déclenchés chez le patient en permettant autant que possible un ciblage spécifique des tissus et des cellules à traiter, ainsi que le relargage local d'une grande quantité de matériel pour maximiser l'effet thérapeutique. La vectorisation d'un médicament (*drug delivery*) permet, en outre, de pallier les éventuels problèmes de solubilité rencontrés avec certains actifs thérapeutiques, (doxorubicine, paclitaxel, mifamurtide...).³² Par ailleurs, compte tenu de propriétés intrinsèques particulières (solubilité, stabilité, taille...), certains actifs thérapeutiques ne peuvent être délivrés sans recourir à l'utilisation d'un vecteur. Les produits de thérapie génique sont présentés par la suite.

1.4.7. Combothérapies

À l'instar de la combinaison de plusieurs actifs de chimiothérapie (chimiothérapies combinées) utilisée pour améliorer l'efficacité des traitements, il est possible de mettre en œuvre différentes modalités thérapeutiques conjointement, afin de tirer bénéfice des effets de chacune d'elles et dégager un effet de synergie.³³ Par exemple, l'opération chirurgicale peut être employée en combinaison avec l'ensemble des différentes thérapies présentées précédemment. Réalisée en première intention, elle peut faciliter un traitement par chimiothérapie qui va suivre. Elle peut aussi être réalisée à la suite d'un traitement préalable (par exemple une radiothérapie) qui aura pour objectif une réduction de la taille de la tumeur à retirer. Les programmes chimiothérapie/radiothérapie sont fréquents, la libération de médicaments vectorisés par des nanoparticules métalliques pouvant être activée par les rayons électromagnétiques (X, UV, IR). Enfin, le potentiel des agents de chimiothérapie dite "conventionnelle" peut être combiné à celui des produits de la thérapie génique, ce qui fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses et le travail développé dans le cadre de ma thèse s'inscrit également dans cette perspective.

II. Les alkylphospholipides (APLs) contre le cancer

La majorité des agents de chimiothérapie actuellement utilisés ciblent l'ADN et les processus de réplication qui lui sont associés (*vide supra*). Comme on l'a vu précédemment, les alkylphospholipides constituent une classe de composés à part puisqu'ils agissent au niveau de la membrane cellulaire en altérant certaines voies de signalisation. Dans ce qui suit, nous allons faire un état des connaissances sur les APLs, en nous focalisant plus particulièrement sur ceux qui sont à l'origine du travail développé au cours de ma thèse, à savoir la miltéfosine, l'érufosine et la périfosine (Figure 6).

II.1. APLs : de leur découverte aux applications cliniques

II.1.1. Les LPC à l'origine des APLs

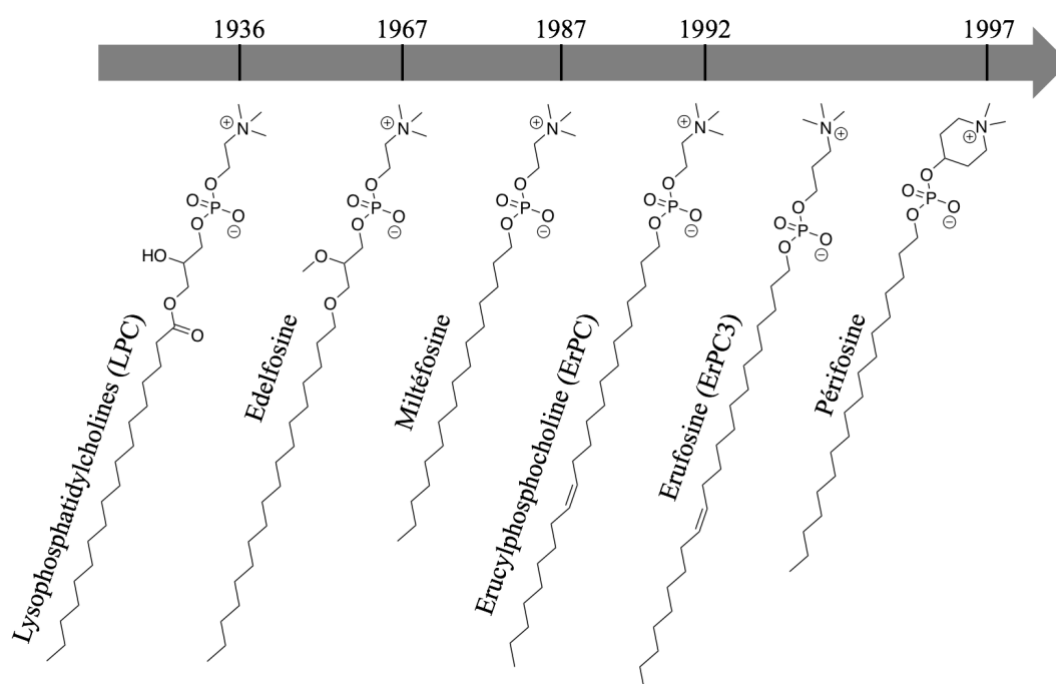


Figure 6. Structures chimiques d'APLs majeurs, dans l'ordre chronologique de leur apparition.

Les travaux de Bergenheim et Fahraeus sur les phospholipides dans les années 1930 ont mis en évidence l'activité hémolytique des lysolécithines, ou 2-lysophosphatidylcholines (LysoPC) (Figure 6), faisant de ces molécules des candidats potentiels pour le contrôle d'un certain nombre d'activités biologiques.³⁴ En particulier, Modolell *et al.* ont montré *in vitro* que la phagocytose de particules de silice par des macrophages s'accompagne d'une production transitoire de lysoPC qui résulte de l'action de la phospholipase A2 sur les lécithines, ou phosphatidylcholines (PC). Ces travaux les ont amenés à proposer un effet immuno adjuvant pour les lysoPC.^{35,36} Dans la cellule, celles-ci étant rapidement transformées en PC par les acyltransférases, et en glycérophosphocholine (GPC) par les lysophospholipases (Figure 7),³⁷ de nombreux travaux ont été initiés sur le

développement d'analogues stables, à l'image de ceux de Eibl en 1967.³⁸⁻⁴⁰ Parmi les analogues proposés, certains ont par ailleurs montré des propriétés antitumorales sélectives *in vitro*,⁴¹ puis *in vivo*,⁴² faisant alors émerger l'édelfosine comme le prototype structural de la famille des APLs.

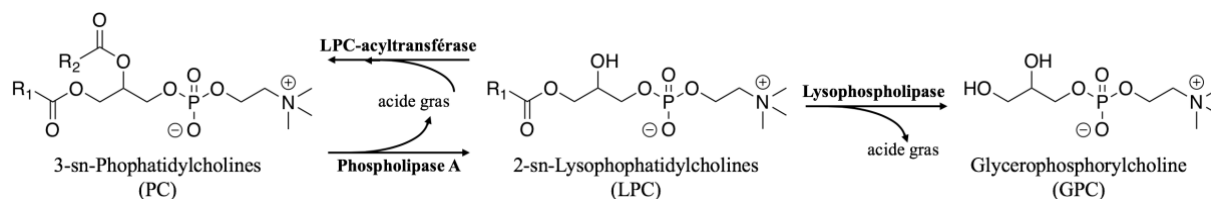


Figure 7. Voie de métabolisation enzymatique des LPC en PC ou en GPC.⁴²

II.1.2. Édelfosine

II.1.2.1 Développement

L'édelfosine ou 1-*O*-octadécyl-2-*O*-méthyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine résulte des modifications structurales apportées à la lysoPC sur les positions C₁ et C₂ du motif glycérol, la liaison ester en C₁ ayant été remplacée par une liaison éther et l'hydroxyle en C₂ par un groupement méthoxy (Figure 6). L'origine de ces changements structuraux est directement liée à la résistance qu'offre le lien éther vis-à-vis des acyltransférases et lysophospholipases.

II.1.2.2 Applications cliniques

Dès 1978, l'activité cytotoxique de l'édelfosine a été démontrée *in vitro* sur de nombreuses lignées tumorales solides,⁴³ hématologiques, ou normales, une sélectivité pour les cellules tumorales vis-à-vis des cellules saines étant rapportée dans le cas des cellules sanguines.^{41,44} Une activité antiproliférative *in vivo* a également été constatée dans des modèles murins.⁴⁵ Cependant, en raison d'un important caractère hémolytique et d'une toxicité gastro-intestinale prononcée,⁴⁶ les applications cliniques de l'édelfosine se limitent à la purge de la moelle des patients atteints de leucémie aiguë en rémission, avant une greffe de moelle osseuse autologue.^{47,48}

II.1.3. Miltéfosine

II.1.3.1 Développement

La synthèse et l'activité antitumorale de l'hexadécylphosphocholine, ou miltéfosine (Figure 6), ont été rapportées pour la première fois en 1987 par Eibl et Unger,⁴⁹ qui avaient déjà découvert l'édelfosine et qui ont, par la suite, identifié la structure minimale des APLs nécessaire à l'expression d'une activité antinéoplasique.⁵⁰ La miltéfosine se distingue de l'édelfosine par le retrait du motif glycérol et le raccourcissement de la chaîne grasse à 16 atomes de carbones.

II.1.3.2 Applications cliniques

La miltéfosine a été évaluée *in vitro*⁵¹ et *in vivo*⁵² et présente une bonne activité oncolytique sur les tumeurs solides et hématologiques, avec une bonne sélectivité pour les cellules tumorales de la moelle osseuse dans le cas des leucémies.⁵³ Le développement clinique de la miltéfosine fut toutefois compromis par des propriétés hémolytiques importantes, incompatibles avec une administration par voie intraveineuse.⁵⁴ Il faut noter à ce propos qu'une formulation liposomale préparée à partir de miltéfosine, de cholestérol et de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol permet de réduire le caractère hémolytique de la miltéfosine, avec une HC₅₀ (concentration provoquant 50 % d'hémolyse) passant de 5 µM à 110 µM, ce qui autorise cette administration par voie intraveineuse.⁵⁵ Quant à l'administration orale, des études cliniques menées en phase II et publiées en 1993 ont révélé que les posologies testées induisaient peu d'activité contre les sarcomes osseux,⁵⁶ les tumeurs solides colorectales,⁵⁷ ou les cellules squameuses métastatiques du cancer de la tête et du cou,⁵⁸ tout en entraînant les effets secondaires bien connus des APLs, à savoir vomissements et nausées. À cela s'ajoute un profil de métabolisation similaire à celui déjà observé avec les précédents APLs, avec formation principalement de choline, phosphocholine et phosphatidylcholine, tous non toxiques.⁴⁹ Cela suggère que la miltéfosine est également soumise à des dégradations provoquées par des phospholipases, comme les autres APLs. La miltéfosine a néanmoins trouvé des applications en clinique, avec des administrations par voie topique pour le traitement des lymphomes cutanés⁵⁹ et des métastases cutanées du cancer du sein.^{60,61}

Indépendamment des travaux réalisés dans le domaine du cancer, la miltéfosine fut également étudiée dans le cadre d'un programme de recherche axé sur la leishmaniose viscérale,⁶² une maladie induite par un parasite et sévissant principalement en Inde. La miltéfosine deviendra par la suite un antiparasitaire de référence dans ce domaine de recherche⁶³ et figure sur la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé pour son indication antiparasitaire.

II.1.4. Périfosine

II.1.4.1 Développement

Avec l'objectif d'améliorer la stabilité biologique de la miltéfosine, et des APLs de manière générale, Hilgard et Engel ont publié en 1997 la synthèse et l'évaluation de la périfosine (Figure 6), un des nombreux analogues d'APLs élaborés selon une nouvelle stratégie synthétique.⁶⁴ En effet, la pharmaco-modulation au niveau de la chaîne alkyle avait déjà été passablement étudiée par le passé, mais le remplacement du motif choline par un autre groupement ne fut étudié que plus tard et avait conduit, en 1993, à l'octadécyl-[2-(*N*-méthyl-pipéridinio)-éthyl]phosphate, ou OMPEP (Figure 8).⁶⁵ Ce composé est alors le premier APL hétérocyclique qui apporte une amélioration significative dans le cadre de la tolérance gastro-intestinale des APLs. La périfosine, qui présente

un ammonium quaternaire terminal espacé du phosphate par un motif *p*-hydroxypipéridine, résulte des travaux d'optimisation qui ont suivis.

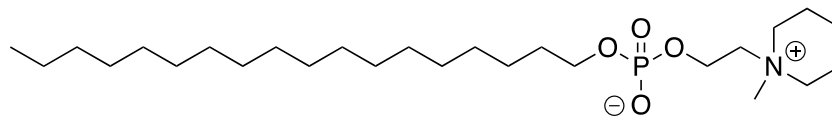


Figure 8. La structure de l'OMPEP, avec sa tête polaire hétérocyclique, est assez similaire à celle de la périfosine.

II.1.4.2 Applications cliniques

Les premières études *in vitro* ont montré une bonne activité antitumorale et un caractère sélectif dans le cas de tumeurs hématologiques de type myélome.⁶⁶ Les évaluations *in vivo* ont révélé peu de toxicité systémique et ont débouché sur des essais cliniques en phase I et II.⁶⁴ Par ailleurs, les études de biodistribution indiquent que, à l'instar de la miltéfosine, la périfosine n'est pas métabolisée par les phospholipases et présente un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) dans le plasma de 137 heures, contre 96 heures pour la miltéfosine.⁶⁷ Pour autant, les études en phase I menées au début des années 2000 révèlent que seule l'administration orale de la périfosine peut être retenue et que celle-ci entraîne un profil de toxicité similaire à celui de son homologue, la miltéfosine, avec une toxicité gastro-intestinale qui reste le principal facteur restreignant son utilisation. Une dose de 200 mg par jour est cependant bien tolérée par les patients^{68,69} et, contrairement à la miltéfosine, la périfosine ne semble pas s'accumuler dans les reins ce qui limite tout dysfonctionnement rénal post-traitement. Au cours des études en phase II, la toxicité gastro-intestinale de la périfosine a malgré tout conduit à des résultats cliniques décevants et l'utilisation orale de la périfosine en monothérapie ne s'est pas révélée concluante pour le traitement des cancers avancés ou métastatiques du sein,⁷⁰ de la tête et du cou,⁷¹ de la prostate,⁷² ou encore de mélanomes métastasés.⁷³ En conséquence, la périfosine n'est actuellement utilisée oralement qu'en tant qu'inhibiteur Akt (*vide infra*), en combinaison avec d'autres stratégies anticancéreuses, telles que la radiothérapie.^{74,75}

II.1.5. Érufosine

II.1.5.1 Développement

Dans les années 1990, alors que certains laboratoires basent leurs programmes d'optimisation sur des modifications de la tête polaire des APLs, ce qui conduira à la découverte de la périfosine, d'autres restent focalisés sur les pharmaco-modulations au niveau de la chaîne alkyle. En 1992,⁷⁶ l'équipe de Eibl décrit ainsi l'érucylphosphocholine (ErPC), puis l'érucylphosphohomocholine, ou érufosine (ErPC3), qui comportent une chaîne alkyle à 22 atomes de carbone avec une insaturation de stéréochimie *cis* en position 9 (ω -9-*cis*) (Figure 6). Ces deux composés montrent une activité hémolytique plus faible que les autres APLs, suffisamment pour permettre d'envisager leur utilisation par voie intraveineuse, contrairement à l'ensemble des APLs synthétisés jusque-là.⁷⁷ Cette baisse

d'activité hémolytique est due à la chaîne érucyle, longue et insaturée, qui diminue la solubilité aqueuse des composés et induit leur auto-organisation sous la forme de bicouche lamellaire et non plus de micelle.⁷⁸ La concentration micellaire critique (CMC) de l'ErPC a ainsi été évaluée autour de 10^{-8} M, ce qui est trois ordres de grandeur en dessous de celle de la miltéfosine (10^{-5} M).⁷⁹ En revanche, aucune donnée ne fait référence à la valeur de la CMC de l'érufosine.

II.1.5.2 Applications cliniques

Très rapidement, les deux composés ont été évalués et comparés aux APLs précédemment décrits. En 1995, on démontre que l'utilisation de l'ErPC sur des rats est plus efficace par voie intraveineuse que par voie orale, avec une dose nécessaire 5 fois plus faible dans le cas d'une administration i.v., pour le même effet.⁷⁹ Dans cette même étude, l'ErPC apparaît plus efficace que la miltéfosine, que celle-ci soit administrée par voie orale (voie classique) ou en i.v. sous forme de solution liposomale.⁵⁵ Par ailleurs, une étude de la biodistribution de l'ErPC montre une forte accumulation de ce composé dans le cerveau,⁸⁰ ouvrant d'intéressantes perspectives pour le traitement du cancer du cerveau.⁸¹

L'activité antitumorale de l'érufosine (ErPC3) *in vitro* a également été largement étudiée sur des lignées de cellules de cancer du sein,⁸² de la vessie,⁸³ et de leucémie myéloïde aigüe. Le motif homocholine de l'érufosine induit une certaine sélectivité dans le cas de cellules de leucémie lymphocytaire chronique,⁸⁴ sans réduire la capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique.⁸⁵ L'érufosine peut donc constituer une option thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers du cerveau. Une étude clinique en phase I a débuté en 2006 afin d'étudier la faisabilité et la tolérance d'une administration intraveineuse d'érufosine (ErPC3) chez des patients atteints de cancers avancés. En 2008, des résultats de cette étude démontraient l'efficacité d'un traitement par l'érufosine seule,⁸⁶ ou en combinaison avec d'autres médicaments anti-leucémiques sur des prélèvements de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe.^{87,88} Une étude parue en 2010 et portant sur des cas de leucémie lymphocytaire chronique démontrait la faible toxicité du traitement et suggérait le lancement d'un essai en phase II.⁸⁴ Les résultats de cet essai ne sont pas disponibles à ce jour.

II.2. Mécanismes d'action des APLs

Depuis la découverte des propriétés des premiers APLs, de nombreuses équipes se sont penchées sur l'étude des mécanismes d'action, ciblés à la membrane cellulaire et non à l'ADN, qui régissent leur activité cytotoxique.⁸⁹ Parmi elles, on peut citer celles de Eibl, van Blitterswijk, Mollinedo, Carrasco, ou encore de Gamaro.

La structure des APLs leur confère un caractère amphiphile et des propriétés tensioactives qui se traduisent par une valeur élevée de CMC. Ces composés peuvent interagir avec les membranes cellulaires (membrane plasmique, membrane du réticulum endoplasmique, ou de la

mitochondrie...) et modifier leurs propriétés, voire entraîner leur déstabilisation et conduire à la lyse cellulaire ou à la rupture de compartiments intracellulaires.

De nombreux modes d'action ont été proposés pour les APLs (Figure 9). Ils peuvent être classés principalement en trois catégories : ceux faisant intervenir une perturbation du métabolisme des phospholipides et du cholestérol,⁹⁰ ceux passant par une inhibition de voies de signalisation de la survie cellulaire,⁹¹ et enfin, ceux impliquant une activation de voies de signalisation pro-apoptotiques.⁹² D'autres mécanismes ont encore été identifiés ou restent à élucider, comme ceux passant par une induction de la perméabilité de la paroi mitochondriale,⁹³ par la perturbation des canaux ioniques,⁹⁴ ou encore par l'altération de la voie autophagique.⁹⁵

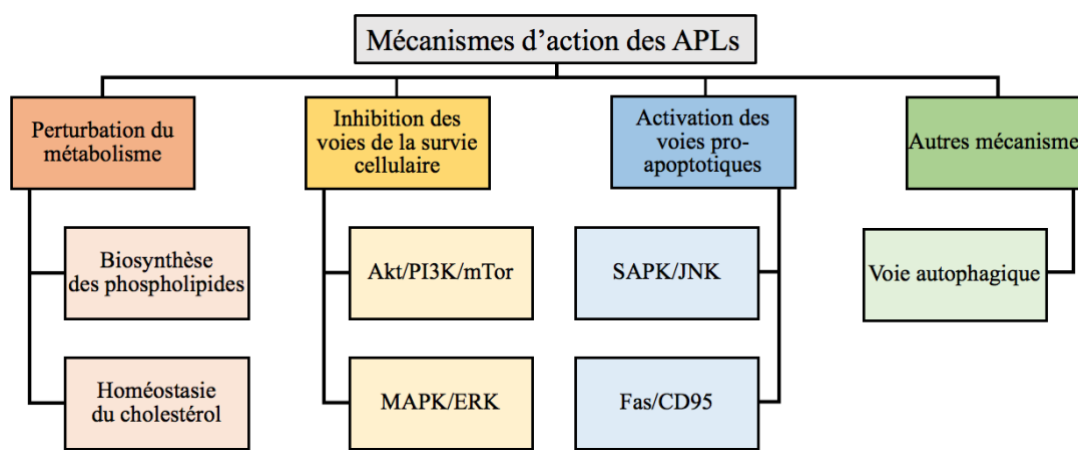


Figure 9. Résumé de divers modes d'action connus des APLs.

II.2.1. Internalisation et résistance cellulaire

Avant de pouvoir exercer leur activité conduisant à la mort des cellules tumorales, les APLs doivent en première instance être internalisés dans les cellules.⁹² Ainsi, des fibroblastes résistants à l'édelfosine, et donc peu sensibles à son action extracellulaire, peuvent entrer en apoptose si la drogue est introduite dans le compartiment cellulaire par micro-injection.⁹⁶ Deux voies principales sont impliquées dans le passage de la barrière cellulaire par ces composés. La première est l'endocytose, et plus particulièrement l'endocytose guidée par les radeaux lipidiques (rafts). La seconde implique des enzymes transmembranaires, comme la phospholipide flippase. L'internalisation des APLs par les cellules cancéreuses de lymphomes et de leucémie procède le plus souvent par endocytose alors que les cellules malignes de carcinomes privilégient l'internalisation enzymes-dépendante.⁹¹

II.2.1.1 Internalisation par endocytose

L'équipe de van Blitterswijk a démontré l'intervention des rafts lipidiques dans l'endocytose des APLs à partir de cellules cancéreuses du col de l'utérus (lignée HeLa),⁹⁷ et de cellules de lymphome de souris sensibles et résistantes aux APLs (S49 et S49^{AR}, respectivement).⁹⁸

L'internalisation de l'édelfosine et de la périfosine dans ces cellules est inhibée à 4 °C, ce qui révèle l'implication d'un processus énergie-dépendant (faisant intervenir une hydrolyse d'ATP). L'internalisation est également diminuée en présence de monensine, un inhibiteur du trafic vésiculaire.⁹⁹ Par ailleurs, ces deux APLs, ainsi que l'ErPC, démontrent un plus faible potentiel antitumoral lorsque des cellules S49 sont prétraitées à la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui déplete le cholestérol des rafts et perturbe ainsi le trafic membranaire.¹⁰⁰

II.2.1.2 Internalisation par les flippases

Une déplétion en potassium ou l'utilisation de M β CD ne conduit pas à une diminution de l'internalisation de l'édelfosine ou de la périfosine dans le cas de cellules de carcinomes d'épiderme KB.¹⁰¹ Ceci suggère que les cellules KB internalisent les APLs par une autre voie qui doit impliquer des transporteurs. L'équipe de Gamaro confirme cette hypothèse avec divers travaux portant notamment sur l'internalisation spécifique de la périfosine par des cellules KB dans un milieu dépleté en ATP,¹⁰² et suggère l'intervention d'une aminophospholipide translocase de type P4.¹⁰³ La démonstration du rôle essentiel de ces P4-ATPases dans le transport des phospholipides dans un modèle de levure,¹⁰⁴ et le rétablissement de l'internalisation de la miltéfosine dans des parasites initialement résistants et qui ont été transfectés par un gène codant pour une P4-ATPase fonctionnelle, appuient également cette hypothèse.¹⁰⁵

II.2.1.3 Résistance tumorale vis-à-vis des APLs

Comme pour les autres traitements de chimiothérapie (*vide supra*), l'efficacité antitumorale des APLs est soumise à l'apparition de phénomènes de résistance. Aussi, diverses lignées cellulaires résistantes ont été étudiées afin d'élucider l'origine de ces résistances et les mécanismes impliqués. Ceux-ci apparaissent principalement liés au processus d'internalisation et sont, de ce fait, cellule-dépendants. Une absence ou un dysfonctionnement des translocases, qui transportent les APLs exclusivement de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane plasmique, constitue une origine possible de la résistance des cellules de carcinomes, comme les KB.¹⁰⁶ *A contrario*, il a été montré que les pompes à efflux, classiquement responsables de la résistance à la doxorubine, ne sont pas impliquées dans le cas de cellules KB résistantes à la périfosine.¹⁰³ D'autre part, l'internalisation des APLs par endocytose raft-dépendante dans les cellules sanguines peut être altérée, et donc induire une résistance, par des modifications au niveau des rafts lipidiques. Il a ainsi été montré qu'une dérégulation de la sphingomyéline synthase (SMS1) impliquée dans la synthèse des PCs et l'homéostasie du cholestérol (intégrité des rafts) est responsable de la résistance des cellules S49.¹⁰⁷ De manière générale, les données de la littérature indiquent qu'une résistance induite par un APL spécifique entraîne une résistance à l'ensemble des APLs.

II.2.2. Interférence avec le métabolisme

Le premier mode d'action des APLs est une perturbation engendrée au niveau du métabolisme des phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les sphingolipides ou encore le cholestérol, qui sont des composants majeurs et essentiels des membranes cellulaires et des rafts, et dont l'altération peut conduire à un important stress cellulaire, voire à l'apoptose.¹⁰⁸

II.2.2.1 Biosynthèse des phospholipides

Les voies de métabolisation des lipides constituent un processus global qui permet de maintenir l'intégrité des membranes cellulaires et d'assurer le bon fonctionnement de la cellule. Une des principales cibles des APLs est la phosphocholine cytidyltransférase (CTP), une enzyme qui intervient dans la synthèse des phosphatidylcholines.⁹⁰ Les PCs sont les phospholipides les plus abondants des membranes, représentant plus de 50 % des lipides membranaires. L'inactivation de la CTP entraîne une réduction de la biosynthèse des PCs et génère un stress sévère pour le réticulum endoplasmique,^{109,110} suffisant pour conduire à l'apoptose de la cellule.¹¹¹ La plupart des APLs précédemment cités ont montré une activité inhibitrice sur cette enzyme dans des lignées cellulaires hépatiques,¹¹² hématologiques,¹¹³ ovariennes,¹¹⁴ ou dans des macrophages, même si cette activité n'est pas la seule à déclencher l'apoptose.¹¹⁵ En effet, la méthylation de la phosphatidyléthanolamine, une voie secondaire de synthèse des PCs se trouve également altérée par les APLs.¹¹⁶

II.2.2.2 Homéostasie du cholestérol

À l'image de la phosphatidylcholine, ou de la sphingomyéline, le cholestérol joue un rôle important dans le bon fonctionnement cellulaire puisqu'il est également un constituant majeur des membranes. Le trafic intracellulaire du cholestérol fait intervenir 3 principales organelles : le réticulum endoplasmique (RE) qui gère la synthèse, la régulation et l'estérification du cholestérol, la membrane plasmique (MP) qui accumule le cholestérol, ainsi que les endosomes/lysosomes qui produisent des précurseurs du cholestérol à partir des lipoprotéines de basse densité provenant du réseau sanguin.¹¹⁷ L'équipe de Carrasco est la première à décrire l'implication de la miltéfosine dans la perturbation du métabolisme et du transport intracellulaire du cholestérol dans des cellules du foie et du rein.¹¹⁸ Normalement, quand le cholestérol ne peut plus être stocké dans la membrane plasmique, il est retourné au réticulum endoplasmique pour y être estérifié avant dégradation et maintenir ainsi un niveau stable de cholestérol libre dans la cellule. L'APL inhibe cette étape d'estérification par inactivation de l'acétyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT), une enzyme du réticulum endoplasmique. L'augmentation intracellulaire du cholestérol libre qui en résulte modifie l'équilibre entre celui-ci et les PCs, équilibre crucial pour l'intégrité des membranes et le fonctionnement des rafts lipidiques. Des activités similaires ont été montrées pour l'édelfosine, la périfosine et l'ErPC.¹¹⁹

II.2.3. Inhibition des voies de signalisation de la survie cellulaire

La perturbation du métabolisme lipidique est certes un évènement majeur pour la cellule mais n'est pas suffisante pour induire l'apoptose, ce qui suggère l'implication des APLs dans d'autres processus vitaux pour la cellule.¹¹⁴ L'inhibition des voies de signalisation de la survie cellulaire et, plus particulièrement, l'inhibition de certaines kinases impliquées dans ces voies, constitue ainsi un autre mécanisme important de l'action des APLs qui a pu être identifié.

PI3K/Akt/mTOR est une voie majeure de signalisation qui régule le cycle cellulaire et qui présente une activité aberrante dans la plupart des cancers. Schématiquement, cette voie peut être activée par un ligand qui se lie à PI3K, une protéine kinase, par le biais de sa sous-unité régulatrice p85. PI3K phosphoryle et active alors une autre protéine kinase, Akt. L'activation d'Akt a plusieurs effets en aval, dont la phosphorylation du phospholipide membranaire PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) et l'activation de mTOR (main Target Of Rapamycin), une kinase impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires (croissance, prolifération, motilité et survie cellulaire, synthèse des protéines, autophagie, transcription...).

L'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR par la périfosine procède par l'inactivation d'Akt *via* un blocage conformationnel qui est incompatible avec le recrutement de la kinase par PIP3 au niveau de la membrane.¹²⁰ La périfosine est de loin l'APL le plus étudié pour l'inhibition d'Akt. Elle fait l'objet actuellement d'essais cliniques en phase II, en combinaison avec des inhibiteurs de mTOR comme la rapamycine.⁷⁵ L'équipe de Bagley a démontré en 2011 que l'érufosine inhibe également la phosphorylation d'Akt, de manière moins importante que la périfosine toutefois.¹²¹ La miltéfosine et l'édelfosine ont également été décrites pour intervenir dans l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR,¹²² ainsi que d'une voie secondaire, la voie MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-signal-Regulated Kinase*), régie par les protéines Ras et Raf.¹²³

II.2.4. Activation des voies de signalisation pro-apoptotiques

À côté de leur pouvoir inhibiteur des voies de signalisation de la survie cellulaire, les APLs interviennent également en activant les voies de signalisation pro-apoptotiques, ce qui constitue un troisième mécanisme d'action antitumorale.

II.2.4.1 SAPK/JNK

Les APLs ciblent la voie de signalisation pro-apoptotique SAPK/JNK (*Stress-Activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase*) et participent donc au déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque. Verheij *et coll.* ont démontré, pour l'édelfosine, la miltéfosine et la périfosine, des propriétés d'induction dose-dépendante de l'activité de SAPK.¹²⁴ Parallèlement, l'équipe de Mollinedo a montré que l'expression de l'ARN messager *c-jun* est augmentée d'un facteur 17 à 38

pour les lignées hématologiques Jurkat et HL-60, après 4 heures d'exposition à l'édelfosine.¹²⁵ Cette expression se traduit par l'activation de JNK et induit une forte apoptose après 6 heures. Plus récemment, une réduction de l'apoptose induite par l'édelfosine a été observée à la suite de l'inhibition d'ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), une kinase directement impliquée dans la voie et capable de l'activation de celle-ci lorsqu'ASK1 est surexprimée par transfection avec un plasmide.¹²⁶ Enfin l'implication de la voie SAPK/JNK dans l'apoptose de cellules de glioblastome traitées à l'ErPC a été observée, l'apoptose étant réduite par l'action d'inhibiteurs de kinases spécifiques à cette voie, bloquant par exemple l'interaction de JNK avec son substrat.¹²⁷

II.2.4.2 Fas/CD95 et apoptose directe

L'apoptose directe peut également être induite selon la voie dite extrinsèque. Suite à la liaison de ligands solubles extracellulaires (TNF- α , FasL/CD95L et TRAIL) à leurs récepteurs de mort, ancrés à la membrane, ceux-ci trimérisent et s'associent à la protéine adaptatrice FADD (*Fas Associated Death Domain*) pour former le complexe DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Ce dernier active les pro-caspases 8 initiatrices et déclenche l'action d'une cascade de caspases menant à l'apoptose (Figure 10). Le ligand FasL possède un récepteur de mort (Fas), le ligand TRAIL, lui, en possède 2 : TRAIL-R1 et TRAIL-R2.

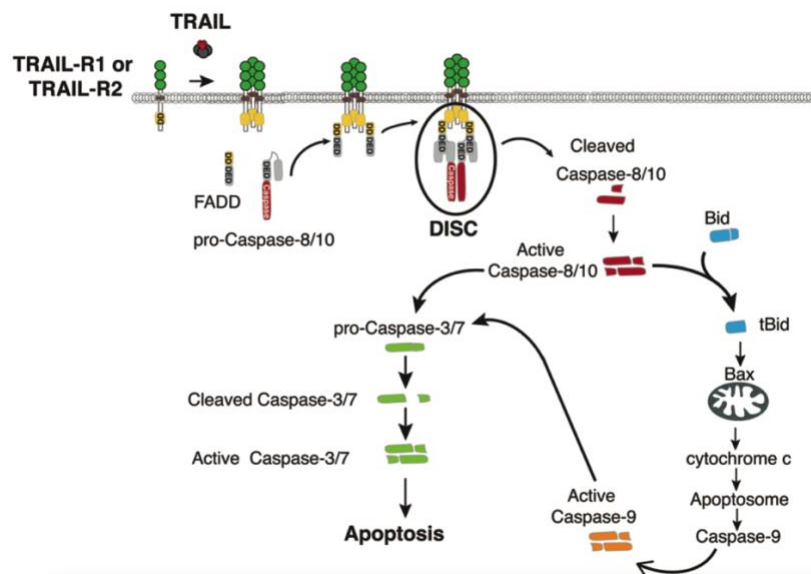


Figure 10. L'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque, commune à Fas/CD95 et TRAIL.

Si la voie d'apoptose extrinsèque est normalement activée par des facteurs externes, il est possible de l'initier au sein de la cellule en provoquant une réorganisation des récepteurs, et, plus précisément, en induisant le regroupement de ceux de Fas/CD95 sous la forme de trimères actifs.¹²⁸ C'est de cette manière que les APLs semblent induire l'apoptose dans le cas des cellules hématologiques. En effet, le groupe de Mollinedo a démontré qu'une redistribution des récepteurs

Fas/CD95 dans les rafts lipidiques s'opérait, sans intervention du ligand FasL/CD95L,⁹⁶ à la suite du traitement de cellules plasmatiques de multiples myélomes (*MM cells*) par l'édelfosine ou la périfosine.^{129,130} Ces travaux posent néanmoins plusieurs questions comme la susceptibilité aux APLs d'un type cellulaire à l'autre ou la nécessité de la présence de Fas/CD95.^{131,132} En effet sur des cellules déficientes en Fas/CD95, l'apoptose n'est pas induite par l'édelfosine, ce qui est cohérent avec le mécanisme proposé, mais elle ne l'est pas non plus avec TRAIL ou TNF- α , dont les récepteurs restent pourtant exprimés (Figure 11). Par ailleurs, le groupe de van Blitterswijk, par exemple, n'a pas observé d'inhibition d'apoptose induite par l'édelfosine ou l'ErPC lorsque la voie associée à Fas/CD95 était entravée.¹³³ En conclusion, le mécanisme d'action proposé reste encore relativement controversé.⁹²

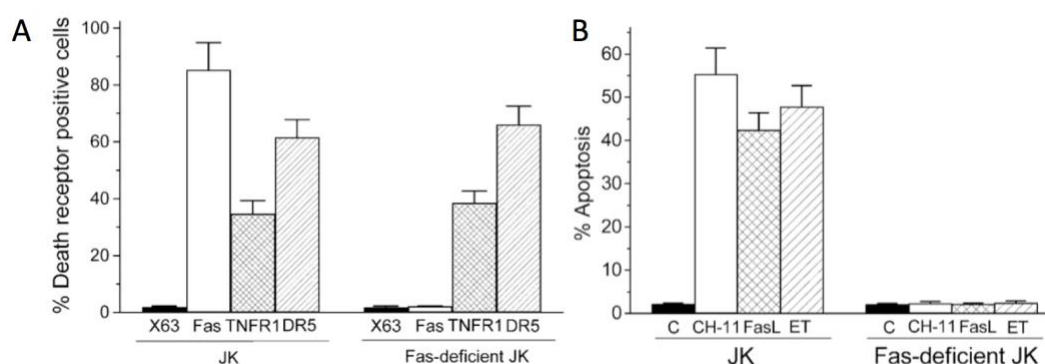


Figure 11. La déplétion de Fas sur cellules Jurkat produit des cellules Fas-déficientes (A), qui sont alors résistantes à l'action apoptotique des APLs, ce qui prouve le rôle de Fas dans leur mode d'action (B).

II.2.5. Activation de l'autophagie

L'autophagie est initialement une forme de survie cellulaire faisant intervenir des organelles d'autodigestion de résidus intracellulaires, appelés autophagosomes et autolysosomes, qui permettent de fournir des nutriments à la cellule lorsque celle-ci se retrouve dans des conditions défavorables à son développement.¹³⁴ Néanmoins, ce processus régulé par les kinases PI3K impliquées dans la survie, peut conduire à la destruction de la cellule et constituer une voie de mort programmée.¹³⁴ Le métabolisme lipidique et le processus d'autophagie semblent liés¹³⁵ et des perturbations indirectes peuvent être l'élément déclencheur de cette voie de mort cellulaire programmée. Entre autres, l'intervention de la périfosine dans le déclenchement de l'autophagie a été mentionnée pour la première fois en 2009,¹³⁶ et cette observation a également été faite avec l'érufosine.¹³⁷ Globalement, les dérégulations réalisées par les différents APLs au niveau des processus associés au cholestérol et aux phospholipides entraînent l'accumulation d'autophagosomes dans la cellule et l'arrêt cellulaire,^{138,139} une implication grandement étudié par l'équipe de Carrasco.⁹⁵ Toutefois, ce nouveau mécanisme d'action, bien qu'intéressant, nécessite d'être plus amplement étudié.

II.3. Sélectivité tumorale

Au-delà du pouvoir antitumoral que peut montrer un traitement, de quelque nature qu'il soit, la propriété la plus intéressante qu'il puisse montrer est une capacité à être sélectif pour les cellules cancéreuses, afin de limiter au mieux les effets secondaires, c'est à dire les effets sur les cellules saines, principale limitation de la chimiothérapie. En ce qui concerne les APLs, la littérature fait état de multiples exemples où l'activité des APLs présente une sélectivité pour les cellules tumorales. En plus de mécanismes d'action spécifiques différents de ceux des autres classes d'antitumoraux, ceci fait d'eux des composés particulièrement prometteurs pour les applications cliniques. Néanmoins, il convient de bien analyser cette perspective et il faut distinguer le cas des tumeurs hématologiques de celui des tumeurs solides.¹⁴⁰ Les équipes d'Andreesen en Allemagne,⁴¹ de Mollinedo en Espagne,¹⁴¹ et de Salmona en Italie,¹⁴² ont toutes démontré l'activité sélective de l'édelfosine dans le cas de cellules **cancéreuses du sang**. Le passage de la membrane plasmique de ces cellules semble être l'étape qui conditionne la sélectivité antitumorale. En effet la membrane des cellules sanguines normales est apparemment moins perméable aux APLs que celle des cellules cancéreuses. L'origine de cette sensibilité particulière des cellules sanguines cancéreuses aux APLs n'est pas comprise à ce jour. Par contre, à notre connaissance, dans le cas des **tumeurs solides**, aucune sélectivité des APLs pour les cellules cancéreuses vis-à-vis des cellules saines n'a jamais été rapportée.

II.4. APLs et combothérapie

Les études cliniques en phase II menées sur l'utilisation d'APLs en monothérapie se sont souvent avérées décevantes, principalement à cause de l'activité hémolytique et de la toxicité gastro-intestinale des composés. Premièrement, les propriétés hémolytiques observées *in vitro* et *in vivo* pour la plupart des APLs rendent leur administration intraveineuse impossible, limitant donc leur application clinique à la voie orale. Il faut toutefois distinguer le cas de l'érufosine qui ne présente pas cette toxicité du fait de sa longue chaîne insaturée à 22 atomes de carbone et qui fait l'objet, depuis quelques années, d'études cliniques encourageantes impliquant une administration par voie intraveineuse. Pour les autres composés, la toxicité gastro-intestinale relatée dans toutes les études cliniques menées jusqu'à présent limite les doses d'APLs administrées, ce qui a pour conséquence des effets thérapeutiques parfois peu intéressants. La conclusion de ces études est souvent la même : aux doses tolérées par les patients, les APLs ne présentent pas suffisamment d'activité pour être étudiés plus amplement dans le cadre de traitements en monothérapie. En revanche, il est à chaque fois mentionné qu'une combinaison des APLs avec d'autres traitements antitumoraux reste pertinente. Ainsi de nombreux APLs font actuellement l'objet d'études cliniques dans lesquelles ils sont combinés à la radiothérapie ou à d'autres molécules antitumorales dites de "chimiothérapie conventionnelle".

II.4.1. APLs et radiothérapie

L'utilisation des APLs en combinaison avec la radiothérapie résulte de l'observation de l'intervention de des composés dans de multiples voies de signalisation impliquées dans la radiosensibilité et la radorésistance.⁷⁴ La radiothérapie combinée aux APLs, tels que l'édelfosine, la miltéfosine, la périfosine, l'érufosine,¹⁴³ ou encore l'ErPC,¹⁴⁴ a démontré de bons résultats *in vitro*. La périfosine a spécifiquement prouvé son efficacité en combinaison avec la radiothérapie lors d'études cliniques en phase I sur des tumeurs solides,¹⁴⁵ puis en phase II.¹⁴⁶

II.4.2. APLs et chimiothérapie conventionnelle

À l'image de la combinaison avec la radiothérapie, les APLs présentent de meilleurs résultats en association avec d'autres agents antitumoraux qu'en monothérapie. Les APLs les plus étudiés dans ces applications sont à nouveau la périfosine et l'érufosine. Toutefois, il faut mentionner les résultats encourageants récemment obtenus avec une co-formulation de miltéfosine et de paclitaxel, l'APL jouant à la fois le rôle de principe actif et celui de vecteur du paclitaxel (piégé au sein des micelles d'APL).¹⁴⁷ Cela étant dit, compte tenu de ses propriétés inhibitrices d'Akt, la périfosine a été impliquée dans de nombreuses études cliniques en phase II, notamment en combinaison avec la capécitabine dans le cadre des thérapies de seconde ligne pour le cancer colorectal métastaté.¹⁴⁸ Plus intéressant encore, suite aux multiples études en phase II portant sur l'utilisation de la périfosine en combothérapie, la FDA (*Food and Drug Administration*) a attribué les labels « thérapie de pointe » et « Médicament Orphelin » à cet APL prometteur en 2010.¹⁴⁹ Ainsi, en combinaison avec la capécitabine il fait l'objet d'une étude de phase III depuis 2011 (NCT01097018). En combinaison avec le bortézomib et la dexaméthasone, il fait l'objet d'une autre étude de phase III (NCT01002248) pour le traitement de cas de multiples myélomes.¹⁵⁰ Malgré de nombreuses suggestions pour l'utilisation de l'érufosine en combothérapie, aucun résultat d'étude n'a été publié à ce jour.

II.4.3. Cancer, thérapie génique et APLs

La thérapie génique est une approche thérapeutique relativement récente qui consiste à modifier l'expression génétique d'une cellule. À ce titre, les cancers sont les cibles par excellence de cette stratégie. Même s'il existe à l'heure actuelle très peu de produits de la thérapie génique ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM), le pari peut être pris que, au cours des prochaines années, ces produits entreront en nombre dans l'arsenal des thérapeutes. Aussi nous a-t-il paru intéressant de développer des outils permettant la mise en œuvre d'une combothérapie impliquant les APLs et la thérapie génique. C'est ce qui fait l'objet de cette thèse mais, avant d'entrer dans le vif du sujet, il convient d'introduire les principes de la thérapie génique pour exposer les avantages d'une telle combothérapie.

III. La thérapie génique contre le cancer

III.1. Les acides nucléiques comme médicaments

Comme indiqué au début du chapitre, la thérapie génique consiste à moduler l'expression des gènes et des protéines fonctionnelles résultantes par le transport de matériel génétique au sein d'une cellule, dans le but de stopper ou inverser un processus pathologique. Ceci peut en principe être réalisé à travers la mise en œuvre de différentes stratégies qui se traduisent par l'insertion, la répression ou la correction d'un gène. En conséquence, le matériel à introduire dans la cellule à traiter peut-être de différentes natures, respectivement un plasmide d'ADN (pADN), un petit ARN interférent double brin (siARN) ou encore un oligonucléotide simple brin. Sur les 2600 essais cliniques réalisés en thérapie génique entre 1989 et 2017, une très large majorité (65 %) a porté sur des traitements du cancer (Figure 12).¹⁵¹ L'administration de matériel génétique peut s'effectuer de manière *ex vivo*, en prélevant des cellules (par exemple des cellules sanguines) pour les traiter avant de les réimplanter chez le patient, ou *in vivo*, en délivrant l'acide nucléique au patient par injection intratumorale ou par voie intraveineuse ou respiratoire.¹⁵²

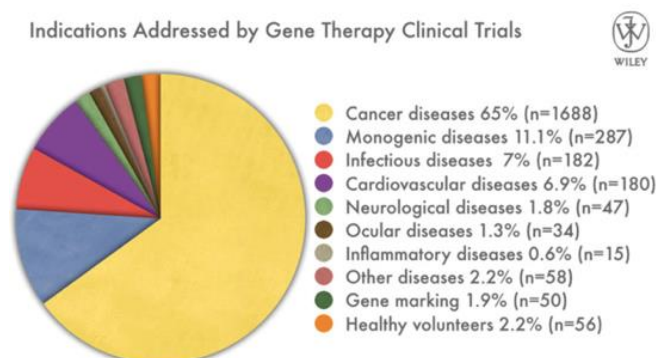


Figure 12. Les travaux de thérapie génique sont majoritairement explorés pour le traitement des cancers.¹⁵¹

III.1.1. Les plasmides d'ADN

III.1.1.1 Généralités

Les plasmides sont des molécules circulaires d'ADN double brin utilisées pour administrer un gène thérapeutique qui code une protéine donnée. Ils comportent des promoteurs pour réguler l'expression du gène thérapeutique, mais également une origine de répllication pour la production bactérienne (*i.e.* qui permet de faire produire le plasmide en grande quantité par des bactéries en culture) et un gène de résistance à un antibiotique qui permet de ne sélectionner que les bactéries productrices du plasmide. La vectorisation d'un plasmide d'ADN au sein d'une cellule, puis dans le noyau où il sera traité, implique le franchissement de diverses barrières, notamment la membrane plasmique, la membrane endosomale et la membrane nucléaire.

III.1.1.2 Des exemples d'applications cliniques

Les gènes les plus souvent transférés en essais cliniques pour le traitement du cancer sont p53 et BCRA, des gènes suppresseurs de tumeur. Le gène endostatine est également utilisé puisqu'il permet l'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse et est actuellement impliqué dans un essai clinique en phase III (NCT02630264) visant les carcinomes de la tête et du cou.^{153,154}

Les gènes suicide sont un autre type de gènes pertinents pour la clinique puisqu'ils induisent la production d'une enzyme qui peut transformer une prodrogue inactive en une molécule active cytotoxique. C'est le cas du gène de la thymidine kinase virale qui fait l'objet d'une étude de phase III (NCT01436968), pour le traitement de multiples cancers dont ceux du poumon et de la prostate. La thymidine kinase virale possède une affinité 200 fois supérieure à celle de l'enzyme endogène pour le valacyclovir, un médicament pris oralement qui sera métabolisé spécifiquement dans les cellules infectées en triphosphate d'acyclovir, un terminateur de chaîne qui inhibe l'ADN polymérase et entraîne l'apoptose.

Il est également possible d'utiliser un plasmide pour induire la synthèse intracellulaire d'un shARN (*short hairpin RNA*), qui est un précurseur synthétique de siARN. Ceci permet d'exploiter les caractéristiques des siARN qui seront présentées par la suite.

Dans le cadre de notre travail, nous avons sélectionné un plasmide qui contient le gène codant la protéine pro-apoptotique TRAIL (Figure 13).

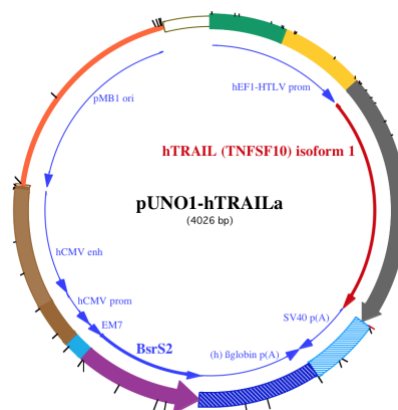


Figure 13. Carte de séquence du plasmide TRAIL utilisé dans le cadre de cette thèse.

III.1.2. L'utilisation thérapeutique d'un plasmide TRAIL

III.1.2.1 TRAIL comme messenger de mort cellulaire

Nous avons vu un peu plus tôt que la protéine TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*, ApoL/2) appartient à une famille de ligands impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 10). De manière plus précise, il s'agit de la superfamille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*) qui comprend environ 20 ligands et plus de 30 récepteurs intervenant dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, l'inflammation ou l'apoptose.¹⁵⁵

La protéine TRAIL, identifiée en 1995 sur la base de son homologie de séquence avec le domaine extracellulaire de FasL et du TNF,¹⁵⁶ est un ligand d'intérêt thérapeutique. En effet, l'administration *in vivo* de la protéine TRAIL induit la suppression de la croissance tumorale par un mécanisme épargnant les cellules saines.¹⁵⁷ Depuis, son potentiel a été étudié dans de nombreuses études cliniques,¹⁵⁸ prouvant que son administration est bien tolérée chez l'Homme. Il semble alors que l'utilisation d'un plasmide codant pour la protéine TRAIL pourrait être pertinent dans des applications cliniques en oncologie.

III.1.2.2 La résistance tumorale à TRAIL

Chez l'Homme, la protéine TRAIL peut se lier à 5 récepteurs différents, dont 2 récepteurs de mort qui peuvent induire l'apoptose, TRAIL-R1 (DR4, TNFRSF10A)¹⁵⁹ et TRAIL-R2 (DR5, TNFRSF10B) (Figure 14).¹⁶⁰ La liaison se fait au niveau d'un domaine de mort (*DD*) intracellulaire et conduit à la formation du complexe DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) et à l'activation de diverses caspases. Dans certains types de cellules cancéreuses (cellules de type I), l'activation de ces caspases par TRAIL et l'initiation de la voie extrinsèque sont suffisantes pour induire l'apoptose. Dans d'autres cas (cellules de type II), il est nécessaire d'initier également la voie intrinsèque.¹⁶¹

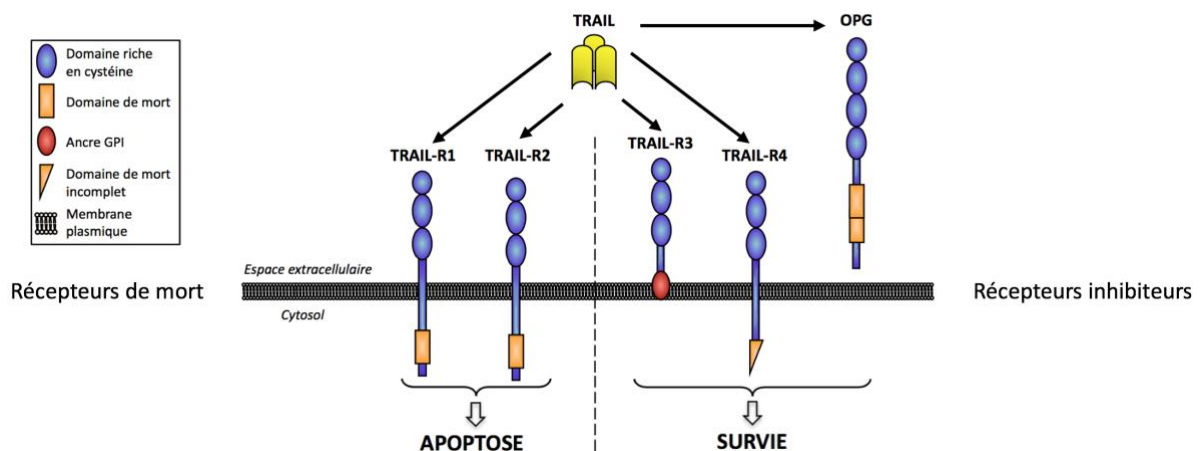


Figure 14. La présence de plusieurs récepteurs TRAIL peut induire l'apoptose mais également la survie cellulaire, rendant son utilisation délicate dans certaines cellules tumorales.¹⁶²

Malgré de nombreux travaux sur les récepteurs de TRAIL, aucune réelle différence n'a été identifiée à ce jour entre les 2 récepteurs actifs, si ce n'est que TRAIL-R1 semble principalement impliqué dans les leucémies chroniques,¹⁶³ tandis que TRAIL-R2 le serait dans les cancers du côlon et du sein.¹⁶⁴ Il convient également de noter que si certaines caractéristiques de TRAIL, notamment sa sélectivité, en font une cible thérapeutique prometteuse, certaines sont à l'origine de la résistance de nombreuses cellules tumorales. En effet, les 3 autres récepteurs de TRAIL, TRAIL-R3 (DcR1, TNFRSF10C),¹⁶⁵ TRAIL-R4 (DcR2, TNFRSF10D)¹⁶⁶ et ostéoprotégérine (OPG, TNFRSF11B)¹⁶⁷

sont dits inhibiteurs et présentent, respectivement, un domaine de mort inexistant, incomplet ou extracellulaire (Figure 14). Le récepteur TRAIL-R3 est lié à la membrane plasmique par une ancre GPI et la fixation de TRAIL à ce dernier n'induit donc pas la formation du complexe DISC. Le récepteur TRAIL-R4, lui, inhibe l'activation des caspases sans pour autant empêcher la formation du complexe DISC, probablement du fait de la structure originale de TRAIL-R4 qui présente un domaine de mort tronqué. Le rôle du récepteur OPG n'est pas encore bien établi mais il semble cependant que sa présence dans l'environnement tumoral bloquerait l'action de TRAIL. Enfin, la fixation de TRAIL à ses récepteurs peut également induire des voies de signalisation de la survie cellulaire, comme NF- κ B,¹⁶⁸ MAPK,¹⁶⁹ et PI3K/Akt.¹⁷⁰

L'équipe de Hymowitz a établie en 1999 une structure cristallographique de TRAIL liée à son récepteur TRAIL-R2 (Figure 15).¹⁷¹ Cette structure montre trois monomères de TRAIL-R2 liés à la protéine trimérique TRAIL, une configuration caractéristique des ligands des TNF. À l'image de CD95 et des autres ligands des TNF, la fixation de TRAIL au niveau des rafts lipidiques induit un regroupement de monomères et une trimérisation des récepteurs, ce qui constitue l'élément déclencheur de la formation du complexe DISC et de la cascade apoptotique.

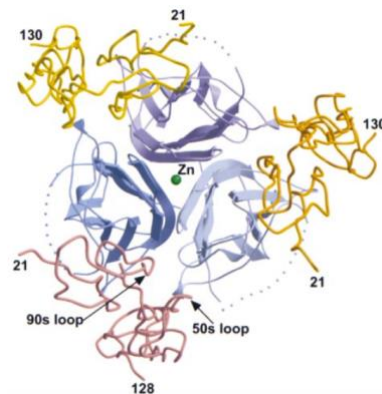


Figure 15. Structure cristalline de la protéine TRAIL en interaction avec son récepteur TRAIL-R2.¹⁷¹

Comme TRAIL a la possibilité de recruter différents récepteurs, le trimère de récepteurs formé peut être homotrimérique (recrutement de trois récepteurs identiques), mais également hétérotrimérique (recrutement d'une combinaison de récepteurs distincts). Si les récepteurs mis en jeu sont exclusivement les récepteurs de mort (DR4 ou DR5), alors le trimère évolue vers la formation du complexe DISC, ainsi que la cascade des caspases qui en découle (Figure 16). De nombreux recrutements de ces récepteurs constituent un DISC fort et une réponse importante. Par contre, si des récepteurs inhibiteurs (DcR1, DcR2 ou OPG) sont impliqués dans ces hétérotrimères, cela peut conduire à la formation d'un DISC faible, incapable de recruter les caspases initiateuses et constitue donc une voie d'inhibition. Les cellules tumorales présentant de forts taux d'expression des récepteurs inhibiteurs possèdent donc une résistance potentielle à l'induction de l'apoptose par TRAIL.

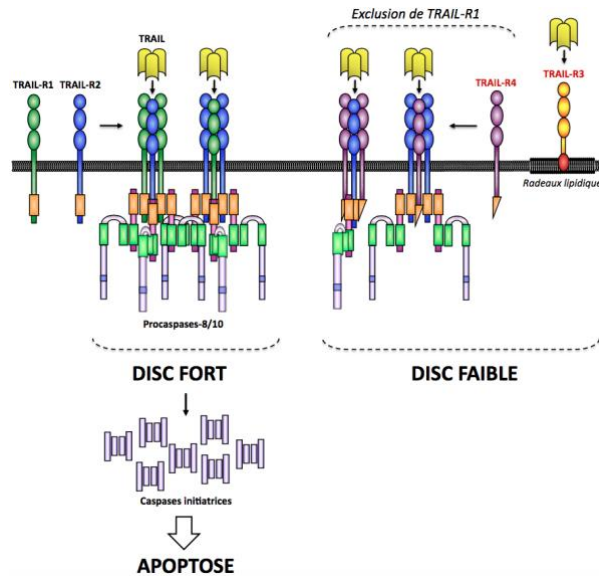


Figure 16. Principe de régulation des voies de signalisation de TRAIL et des phénomènes de résistance associée, par l'intervention des récepteurs inhibiteurs dans la formation des hétérotrimères de récepteurs.¹⁶²

III.1.2.3 L'utilisation de TRAIL en clinique

Si les mécanismes d'action du ligand TRAIL ne sont pas encore tous élucidés, la capacité de celui-ci à induire sélectivement l'apoptose de cellules tumorales a rapidement entraîné le développement, puis l'entrée en clinique, de protéines recombinantes et d'anticorps contre les récepteurs de mort. Ainsi, la protéine recombinante non taguée Dulanermin® (Apo2L.0 ou rhApo2L/TRAIL), développée par l'équipe d'Ashkenazi en 1999,¹⁷² fait actuellement l'objet d'études cliniques en phase III pour des applications en monothérapie,¹⁷³ ou en combothérapie.¹⁷⁴ Cependant, des limitations cliniques résultent de sa demi-vie courte (moins d'une heure)¹⁷⁵ et de résistances tumorales intrinsèques et acquises.¹⁷⁶ Des anticorps spécifiques contre les récepteurs de mort ont également été produits¹⁷⁷ et évalués en clinique.¹⁷⁸ Malgré une stabilité satisfaisante et une demi-vie de plusieurs jours, ces derniers se sont avérés décevants et n'ont pas fournis les résultats escomptés.

Diverses stratégies ont été développées pour améliorer la délivrance de protéines TRAIL recombinantes et de gènes codant TRAIL.¹⁵⁸ Par exemple, diverses formulations de nanoparticules ont été développées pour encapsuler ces protéines ou les intégrer dans la structure des particules sans altérer leur affinité pour les récepteurs.¹⁷⁹ La vectorisation d'un plasmide d'ADN codant TRAIL par des nanoparticules PEGylées conjuguées à l'albumine, quant à elle, a fourni de bons résultats lors de l'administration intraveineuse chez la souris, pour le traitement de gliomes.¹⁸⁰ La vectorisation de ce même plasmide au sein de fibroblastes résistants a permis d'établir un réservoir biologique de production de TRAIL pouvant induire l'apoptose des cellules environnantes non résistantes.¹⁸¹

III.1.2.4 Conclusion

L'utilisation de TRAIL à des fins thérapeutiques semble prometteuse, à la vue de son implication dans de multiples études, même si elle est délicate, notamment en raison d'un nombre important de cellules tumorales résistantes. C'est ce système que nous avons choisi pour développer une partie de notre étude (cf. *Chapitre 3 – IV. Les pro-APLs en combothérapie antitumorale*).

III.1.3. Les petits ARN interférents (siARN)

III.1.3.1 Généralités

En 1998, Fire et Mello ont mis en évidence le phénomène de répression spécifique d'un gène à la suite d'une injection d'un petit ARN double brin chez *C. elegans*.¹⁸² Ils recevront le Prix Nobel de Médecine en 2006 pour ces travaux pionniers dans le domaine de l'ARN interférence.¹⁸³

Les petits ARN interférents ou siARN (*small interfering RNA*) sont des séquences en duplex formées par un brin sens (passager) et un brin antisens (guide) de 21 à 23 paires de bases.¹⁸⁴ Un siARN se lie à un complexe protéique appelé RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), localisé dans le cytoplasme, par l'intermédiaire du brin antisens (Figure 17). Le complexe RISC et le brin apparié se fixent sur l'ARN messager cible et induisent son clivage, par complémentarité de séquence avec celui-ci. Ce dernier devient instable et est dégradé par les ribonucléases cellulaires, ce qui rend impossible toute transcription, puis traduction en protéine. Ce processus d'ARN interférence permet une inhibition prolongée du gène car la liaison du brin guide avec le complexe RISC est très stable et conduit à la dégradation de nombreuses molécules d'ARNm dans la cellule.

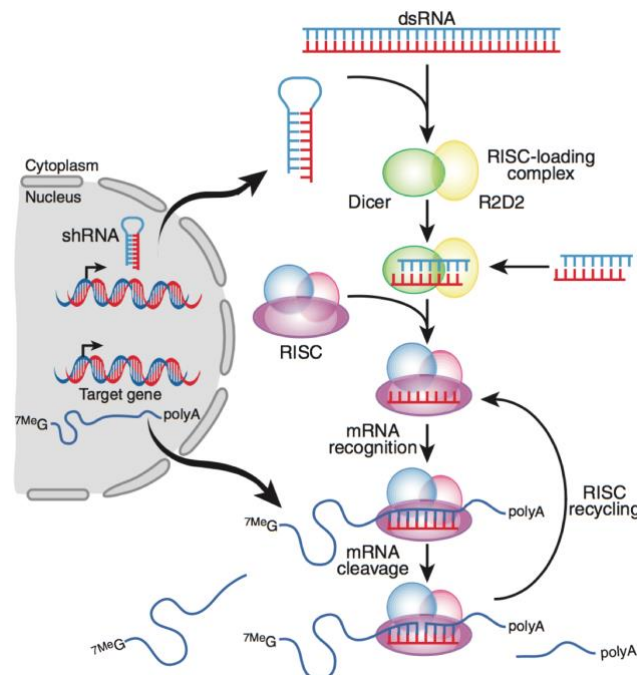


Figure 17. Mécanisme de l'ARN interférence.¹⁸⁴

III.1.3.2 Applications thérapeutiques de l'ARN interférence

D'un point de vue thérapeutique, l'ARN interférence constitue une approche prometteuse et est largement étudiée en oncologie.¹⁸⁵ Parmi le grand nombre de cibles qu'il est possible de viser, la famille des protéines inhibitrices d'apoptose occupe une place de choix.¹⁸⁶

La **survivine** appartient à cette famille.¹⁸⁷ Cette protéine est surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses, d'où l'intérêt d'éteindre le gène qui la code. Diverses stratégies ont été développées pour délivrer un siARN anti-survivine *in vitro* : à l'aide de vecteurs viraux,¹⁸⁸ de lipides cationiques,¹⁸⁹ de polymères cationiques,¹⁹⁰ de nanodiamant fonctionnalisées,¹⁹¹ ou de "carbon dots".¹⁹² Le groupe de Torchilin a même décrit la co-délivrance *in vitro* d'un siARN anti-survivine et d'une protéine recombinante de TRAIL par des micelles polymériques.¹⁹³ Enfin, plusieurs auteurs ont déjà rapporté l'utilisation de siARN anti-survivine *in vivo*.¹⁹⁴ Cependant, à ce jour, aucun essai clinique n'est basé sur l'utilisation d'un siARN anti-survivine.

Le ciblage de **PLK-1** constitue également une stratégie anti tumorale intéressante en raison de l'implication de cette protéine kinase dans la division cellulaire et de son expression accrue chez les patients atteints de leucémie aiguë.¹⁹⁵ La formulation lipidique d'un siARN ciblant PLK-1 (TKM-080301, Tekmira Pharmaceuticals Corporation) a fait l'objet d'études en phase I/II pour le traitement des tumeurs solides ou des lymphomes (NCT01262235).

L'oncogène **BORIS** (*Brother Of the Regulator of Imprinted Sites*), découvert en 2002, est une autre cible intéressante bien qu'encore mal comprise.¹⁹⁶ En effet, ce gène qui est sous le contrôle de la méthylation de l'ADN est exprimé lors de la spermatogenèse primaire et n'est normalement plus exprimé par la suite. Or, dans le cas de tumeurs comme celle de la prostate, du colon, du sein ou de l'endomètre, par exemple, il s'avère être exprimé à nouveau.¹⁹⁷ La répression du gène BORIS par ARN interférence a permis d'activer, de manière sélective, la cascade apoptotique de caspases dans des cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231) exprimant anormalement ce gène.¹⁹⁸

D'autres cibles potentielles de siARN sont à mentionner, comme le facteur de croissance **VEGF**, contre lequel Alnylam Pharmaceuticals développe une formulation non virale de siARN appelée ALN-VSPO2 et qui fait l'objet d'études cliniques prometteuses pour le traitement de tumeurs solides (NCT01158079). C'est cette même société qui a développé Onpatro® (ALN-TTR02),¹⁹⁹ un traitement qui cible le gène codant la **TTR** (transthyrétine) et qui est devenu en 2018 le premier produit de thérapie génique par ARN interférence autorisé sur le marché, avec une indication dans le traitement d'une maladie génétique rare, l'amylose héréditaire à transthyrétine qui touche 50 000 personnes dans le monde.²⁰⁰

III.1.3.3 Conclusion

L'ARN interférence présente un énorme potentiel dans les stratégies anticancéreuses, ce qui se traduit par de nombreux travaux et de multiples essais cliniques. La première autorisation de

mise sur le marché d'une formulation de siARN en 2018 laisse augurer une irruption prochaine de ces nouveaux agents thérapeutiques dans l'arsenal des oncologues.

III.1.4. Les autres types d'acides nucléiques

En plus de l'ADN plasmidique et des siARN, d'autres acides nucléiques peuvent encore être utilisés dans des approches de thérapie génique. Nous les mentionnerons très brièvement ci-dessous.

III.1.4.1 Les ARN messagers pour l'insertion de gènes

Dans le cadre de l'expression d'un gène, il est possible d'utiliser un ARN messager (ARNm) plutôt qu'un plasmide d'ADN.²⁰¹ La traduction d'un ARNm simple brin ayant lieu au niveau des ribosomes dans le cytoplasme, son introduction dans la cellule en lieu et place d'un plasmide présente l'avantage majeur de ne pas nécessiter de transport ultérieur dans le noyau, étape qui constitue un véritable obstacle lors de la transfection avec un plasmide. L'ARNm peut être rapidement traduit dans tous les types cellulaires et son utilisation permet d'éviter une dérégulation de l'expression génétique, comme ça peut être le cas lors de l'intégration d'un ADN dans le génome. La préparation d'un ARNm à partir d'un plasmide peut être réalisée par le principe d'amplification en chaîne par polymérase (*PCR*) mais nécessite des purifications qui peuvent s'avérer difficiles.²⁰² Par ailleurs, ces actifs sont plus fragiles et instables que les plasmides, en raison de leur structure simple brin qui les expose plus facilement à la dégradation.²⁰³ Cependant, certaines modifications chimiques peuvent être introduites dans la séquence pour augmenter la stabilité des brins. Comme pour les plasmides d'ADN, il est aussi possible qu'une réponse immunitaire soit observée à la suite d'une transfection d'ARNm mais, encore une fois, certaines modifications chimiques permettent de réduire ce phénomène.²⁰²

III.1.4.2 Les micro ARN pour la répression ou la restauration de gènes

Les micro ARN (miARN) sont une alternative aux siARN puisqu'ils jouent comme eux un rôle dans la régulation des ARNm en réprimant leur traduction ou en contrôlant leur dégradation. En effet, ces oligonucléotides antisens non-codants sont des modulateurs importants des voies de signalisation cellulaire et de l'angiogenèse, offrant de nouvelles perspectives pour le traitement des cancers.²⁰⁴ Des stratégies sont développées pour introduire des miARN pouvant compenser la sous-expression ou le manque d'expression dans les cellules cancéreuses de certains oligonucléotides régulateurs de la croissance tumorale, les oncomirs.²⁰⁵ D'autres approches consistent à cibler les miARN surexprimés à l'aide de miARN antisens, appelés antagomirs, qui vont s'hybrider à ces derniers pour restaurer l'expression de certains gènes.²⁰⁶

III.2. La vectorisation des acides nucléiques

Bien que le potentiel des acides nucléiques les prédestine à rejoindre notre arsenal thérapeutique à plus ou moins court terme, leurs propriétés intrinsèques imposent l'utilisation de vecteurs pour leur délivrance intracellulaire efficace, à l'image de certains actifs thérapeutiques que nous avons mentionnés précédemment (cf. *Chapitre 1 - I.4.6.7. Chimiothérapie et vectorisation*). En effet, les acides nucléiques présentent une charge négative qui rend impossible leur passage à travers la membrane cellulaire, elle-même chargée négativement. Le recours à un vecteur permet de masquer la charge du matériel génétique, soit en encapsulant ce dernier, soit en neutralisant cette charge par complexation avec des entités chargées positivement. Par ailleurs, les acides nucléiques présentent une stabilité métabolique faible et sont sujets à de nombreuses dégradations enzymatiques dans le milieu biologique, lesquelles peuvent être évitées en utilisant un vecteur qui protégera les acides nucléiques.

Les vecteurs de thérapie génique sont regroupés en trois familles qui font chacune appel à un grand domaine de la science, à savoir la biologie, la physique et la chimie, et leurs développements et applications historiques sont apparus en suivant cet ordre. Nous les présenterons donc en respectant cette chronologie.

III.2.1. Les vecteurs viraux

III.2.1.1 Généralités

Les vecteurs viraux correspondent au plus ancien système de vectorisation utilisé pour le transfert de gènes en raison de la capacité naturelle des virus à transférer leur patrimoine génétique aux cellules infectées. Les vecteurs impliqués dans les premiers essais cliniques réalisés en 1989 étaient des rétrovirus. Bien entendu, avant d'être utilisés comme vecteurs thérapeutiques, ces virus doivent subir des modifications dont la plus importante est le retrait d'une partie de leur génome, inhibant ainsi leurs propriétés infectieuses.

Il y a de nombreux types de vecteurs viraux mais les principaux acteurs de la thérapie génique sont les **adénovirus**, les **rétrovirus**, les **virus adéno-associés (AAV)** et les **lentivirus** (Figure 18). Les deux premiers possèdent la faculté d'intégrer leur patrimoine génétique au génome de l'hôte, ce qui induit une expression prolongée des gènes ; les deux autres n'en sont pas capables. Les vecteurs viraux sont très majoritairement impliqués dans les essais cliniques de thérapie génique réalisés depuis 1989 (>70 %). Depuis 2012, les AAV et les lentivirus prennent le pas sur les rétrovirus et les adénovirus dans ces essais.^{151,207} Le matériel génétique transféré peut être un ADN, un ARN ou encore un plasmide codant pour un shARN, qui peut induire *in situ* un siARN.

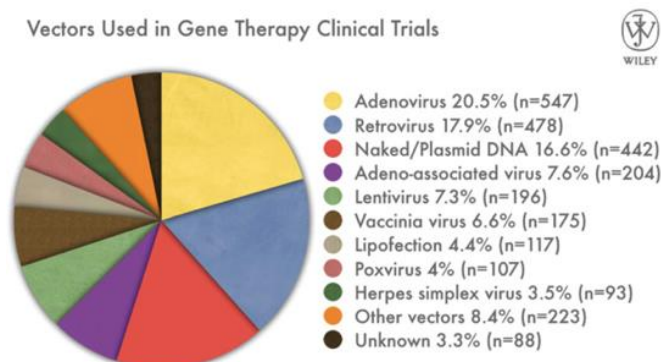


Figure 18. Les vecteurs viraux représentent une proportion majeure des vecteurs impliqués dans les essais cliniques de thérapie génique.¹⁵¹

III.2.1.2 Les virus comme base des produits de thérapie génique

À l'heure actuelle, on ne compte que 5 produits de thérapie génique ayant une autorisation de mise sur le marché en Europe ou aux États-Unis.¹⁵¹ Deux d'entre eux sont formulés avec des virus adéno-associés AAV, il s'agit du Glybera® et du Luxturna®, respectivement approuvés par l'EMA en 2012 et par la FDA en 2017. Le Glybera® fut le premier médicament de thérapie génique autorisé en Europe. Il est indiqué pour pallier une déficience en lipoprotéine lipase, une enzyme impliquée dans la métabolisation des graisses. Le traitement restaure l'activité de l'enzyme en insérant dans le génome des copies fonctionnelles du gène. Une seule patiente a été traitée, et guérie, depuis l'autorisation de ce traitement dont le coût par patient dépasse le million de dollar, ce qui constitue un échec commercial pour la société uniQure. Par ailleurs, on estime que le Luxturna de Spark Therapeutics, dernier traitement autorisé en date et indiqué contre une dystrophie rétinienne, coûtera 500 000 dollars pour chaque œil. Les autres produits mis sur le marché font appels aux cellules CAR-T, des lymphocytes T exprimant des Récepteurs Antigéniques Chimériques.¹⁵¹

III.2.1.3 Les inconvénients majeurs des vecteurs viraux

Comme déjà mentionné, les vecteurs viraux sont impliqués dans environ 70 % des essais cliniques. Cependant, certains inconvénients majeurs rendent leur utilisation très délicate. En effet, la **réponse immunitaire** du patient peut être un problème critique. L'organisme se défend naturellement contre les attaques virales en produisant des anticorps qui reconnaissent les particules virales et déclenchent leur élimination. Le même type de réponse peut donc être observée lors de l'administration des produits de thérapie génique formulés avec des vecteurs viraux, avec un caractère imprévisible et incontrôlable qui a déjà imposé l'abandon de plusieurs essais cliniques. Même si la forte réponse inflammatoire de Jesse Gelsinger au traitement dont il faisait l'objet en 1999 est un cas exceptionnel, entraînant sa mort, il n'en reste pas moins qu'un risque existe. Depuis, les précautions ont été multipliées dans les protocoles de validation des essais cliniques. L'**intégration génétique dans le génome** de l'hôte est un point délicat, car si celle-ci présente

l'avantage d'une expression prolongée du gène transféré, le caractère aléatoire de l'intégration peut entraîner de graves conséquences, comme l'induction de génotoxicité. Par ailleurs, la **capacité d'encapsulation** des virus peut être considérée comme un inconvénient à la transfection puisque seuls les adénovirus permettent le transport de matériel de plus de 4000 paires de bases, ce qui correspond environ à la taille du plasmide d'ADN TRAIL abordé précédemment. Enfin les vecteurs viraux souffrent de problèmes techniques liés à leur **production industrielle** et au contrôle de la reproductibilité des lots qui se traduisent par des **coûts** très élevés (*vide supra*).

III.2.1.4 Conclusion

Compte tenu des risques et des coûts associés à l'utilisation des vecteurs viraux, des alternatives ont été rapidement mises à l'étude, notamment avec le développement de méthodes physiques permettant d'optimiser la délivrance intracellulaire de gènes "nus", donc dépourvue des risques associés à l'utilisation d'un quelconque vecteur. Des stratégies chimiques ont également été mises en œuvre pour proposer des vecteurs dits synthétiques ou non-viraux, plus simples et moins onéreux à produire, mais également plus sûrs.

III.2.2. Les méthodes physiques pour le transfert de gènes

De nombreuses méthodes physiques ont été développées pour le transfert de gènes.²⁰⁸ Elles sont principalement mises en œuvre avec des plasmides d'ADN mais peuvent aussi être utilisées avec des siARN. Ces méthodes font intervenir divers stimuli physiques tels que les champs électriques (électroporation) et photoniques (irradiation laser), ou encore les ondes mécaniques (sonoporation). La finalité de ces méthodes est d'améliorer la pénétration des acides nucléiques dans les cellules suite à leur injection sous forme nue.

III.2.2.1 L'injection initiale des gènes

La première étape consiste à administrer au patient un plasmide d'ADN ou un siARN non protégé par un vecteur, de manière locale ou intraveineuse. Ce mode d'administration d'un matériel génétique nu est utilisé dans 16,5 % des essais cliniques en transfection (Figure 18).¹⁵¹ Bien qu'il ne soit pas nécessaire d'associer une "activation" physique à l'injection pour obtenir l'intégration du gène dans les cellules,²⁰⁹ celle-ci est néanmoins très insuffisante pour dégager un effet thérapeutique. En effet, l'ADN non condensé est une molécule naturellement linéaire et qui possède une charge négative à l'image des autres types d'acides nucléiques. Le passage de la membrane plasmique est à la fois compromis par la répulsion de charge mais aussi par l'incapacité de l'ADN à former une particule compacte ou discrète, une forme requise pour l'internalisation cellulaire. La quantité de matériel minimale qui pourrait éventuellement passer la membrane n'induirait qu'une expression faible et transitoire. Les méthodes physiques présentées ci-dessous permettent donc

d'améliorer l'internalisation cellulaire du matériel et d'atteindre des niveaux d'expression du transgène plus élevés, mais qui restent néanmoins inférieurs à ceux obtenus par transfection virale.²¹⁰

III.2.2.2 L'électroporation

L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique à travers un tissu pour faciliter l'entrée des acides nucléiques dans les cellules. Les impulsions électriques perméabilisent de manière transitoire les membranes plasmiques et le champ électrique provoque la migration électrophorétique de l'ADN à travers la membrane des cellules perméabilisées. Ce double effet conduit à un transfert de gènes efficace et reproductible. Toutefois, même si la technique n'induit pas d'expression de gènes liés au stress, le voltage appliqué doit rester assez faible afin de ne pas détruire les cellules.²¹¹ L'efficacité de l'électroporation pour l'administration *in vivo* de siARN a également été montrée.²¹² Cette méthode est la plus utilisée pour la transfection musculaire et est mise en œuvre dans un essai clinique pour le traitement du mélanome.²¹³

III.2.2.3 La sonoporation

La sonoporation est une technique dérivée de l'électroporation et repose sur l'utilisation conjointe de microbulles et d'ultrasons pour faire pénétrer dans les cellules un ADN préalablement injecté. Les microbulles sont de particules protéiques ou lipidiques remplies de gaz et qui réagissent sous l'action des ultrasons, par oscillation contrôlée à basse fréquence (cavitation stable) ou par implosion à haute fréquence (cavitation inertielle).²¹⁴ Dans certains cas, ces particules peuvent également servir en tant que vecteur de l'ADN, selon le concept du liposome cationique (*vide infra*). À l'image de l'électroporation, l'application clinique de cette technique reste principalement limitée aux tissus facilement accessibles, comme les muscles ou la peau, la plupart du temps pour le traitement des mélanomes.

III.2.2.4 L'irradiation laser

L'illumination de cellules sous lumière infrarouge permet également de faciliter l'internalisation cellulaire d'un plasmide. Développée par l'équipe de Galun en 2003, cette technique permet la délivrance *in vivo* d'un plasmide nu induisant une expression prolongée (>100 jours) du gène de l'érythropoïétine (*mEpo*), sans dommage pour les tissus ni effet secondaire.²¹⁵ Depuis, cette technique a été associée à l'utilisation de vecteurs et, par exemple, des particules d'or couvertes de lipides cationiques et complexées à de l'ADN ont permis d'atteindre des niveaux de transfection similaires à ceux obtenus avec des agents de transfection commerciaux comme la Lipofetamine 2000®, avec une toxicité moindre.²¹⁶

III.2.2.5 *La biolistique*

Initialement destinée à la création de plantes transgéniques, la biolistique, ou technique du pistolet à gènes, consiste à projeter à travers la peau des microparticules d'or ou de tungstène (1 à 3 µm de diamètre) recouvertes d'acides nucléiques, sous l'effet d'un gaz pressurisé.²¹⁷ La pénétration des billes, et donc de l'ADN, dans les tissus est limitée à des zones peu profondes, cantonnant cette technique au traitement cutané.

III.2.3. Les vecteurs non-viraux

III.2.3.1 *Généralités*

Les vecteurs viraux présentant plusieurs inconvénients et les méthodes physiques ne permettant pas d'améliorer suffisamment l'efficacité de gènes nus, les chercheurs se sont orientés vers la conception de vecteurs synthétiques plus simples et moins onéreux à produire, de capacité de transport plus importante, et plus sûrs dans les utilisations en clinique.²¹⁸ Les vecteurs non-viraux sont impliqués dans 4,5 % des essais cliniques à l'heure actuelle (Figure 18).¹⁵¹ Il existe une telle diversité de vecteurs non-viraux que nous ne présenterons ici que les plus représentatifs.²¹⁹

III.2.3.2 *Les lipides cationiques*

Les lipides cationiques permettent des interactions électrostatiques avec les acides nucléiques chargés négativement, contrairement aux lipides neutres comme la DOPC qui n'en autorisent qu'une encapsulation et les lipides négatifs qui nécessitent l'utilisation de contre ions polycationiques.²²⁰ L'association d'un acide nucléique et d'une formulation contenant un lipide cationique aboutit à la formation de complexes appelés lipoplexes.²²¹ En effet, les interactions électrostatiques favorisent la complexation de l'acide nucléique par la tête polaire des lipides cationiques, et les interactions hydrophobes entre les chaînes grasses de ces lipides induisent la condensation du matériel génétique en une particule compacte et discrète. L'efficacité de ces particules de transfection n'est pas seulement dépendante de la structure du lipide cationique mais aussi des propriétés de l'ensemble du système.²²²

Les lipoplexes peuvent se structurer selon deux formes principales, à savoir une structure multi-lamellaire,²²³ ou une phase hexagonale inversée,²²⁴ toutes deux décrites par Rädler (Figure 19). Les lipoplexes peuvent être préparés par différentes méthodes, incluant l'hydratation d'un film lipidique mince par une solution aqueuse d'acide nucléique et la complexation directe de liposomes cationiques (préformés) par un ADN en solution.²²⁵

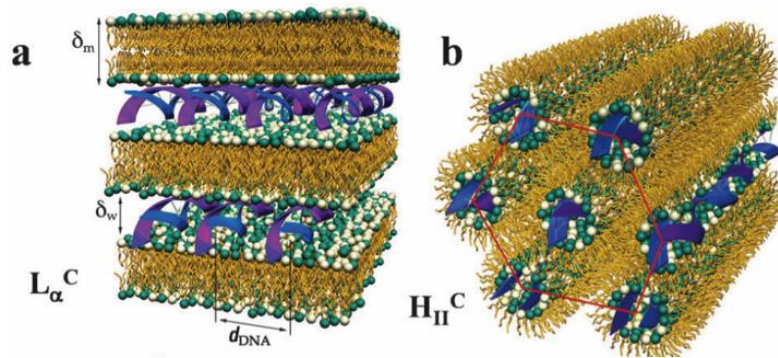


Figure 19. Les deux assemblages possibles pour les lipoplexes, décrites par Rädler.^{223,224}

Le premier représentant de la famille des **lipides monocationiques** utilisé en transfection est le DOTMA, dont les propriétés à l'origine de la formation de vésicules uni-lamellaires avec l'ADN ont été mises en évidence en 1987 par Felgner (Figure 20).²²⁶ Depuis, de nombreux lipides ont été développés selon des stratégies visant à modifier la tête polaire, la partie hydrophobe ou encore la longueur du motif espaceur entre ces deux parties. Le DOTAP est une version acylée du DOTMA alors que le DMRIE en est une version saturée.

Le DOSPA présente quant à lui une tête polaire plus élaborée que celle du DOTMA, à savoir une spermine, arborant plusieurs charges positives et donnant naissance à la famille des **lipides polycationiques**, comme le DOGS et le GL67 (Figure 20). Ces charges multiples permettent de complexer plus de matériel génétique pour une même quantité de matière lipidique et peuvent, en outre, donner lieu à un effet « éponge à protons » facilitant l'échappement endosomal (cf. *Chapitre 1 - III.2.3.3. Les polymères cationiques*).²²⁷

Les lipoplexes de siARN étudiés en clinique impliquent des formulations lipidiques particulièrement stables appelées SNALP (*Stable Nucleic Acid Lipid Particule*).²²⁸ Ces SNALPs font intervenir des lipides cationiques ionisables qui présentent un pK_a légèrement inférieur à 7 afin que les particules présentent une charge légèrement positive à pH physiologique, suffisante pour complexer l'acide nucléique, mais qui va augmenter au cours de la maturation de l'endosome et faciliter le relargage cytosolique.

Le traitement Onpatro[®], évoqué plus haut, est basé sur ce genre de formulation dont la composition fait intervenir,¹⁹⁹ entre autres, le lipide neutre DSPC et le lipide ionisable DLin-MC3-DMA,²²⁹ mais aussi du cholestérol et un dérivé lipidique de PEG₂₀₀₀.

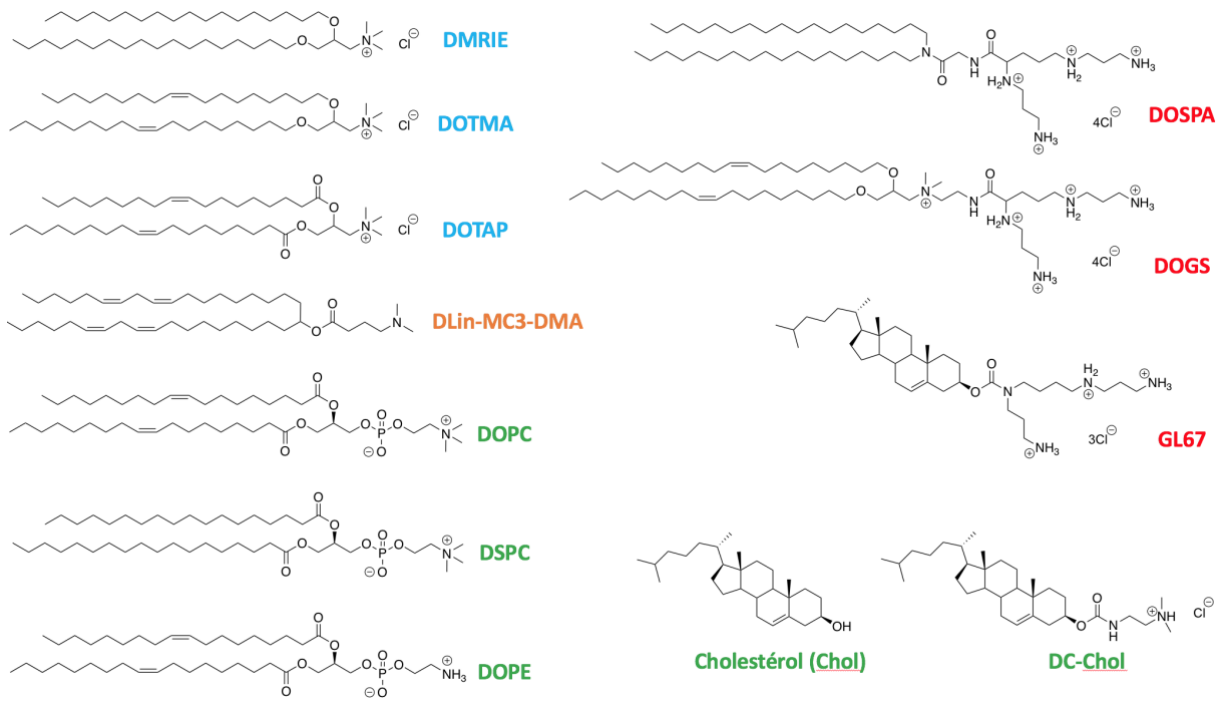


Figure 20. Structures de quelques lipides monocationiques (bleu), polycationiques (rouge), ionisables (orange) ou neutres (vert) impliqués dans des applications de transfert de gènes.

Par ailleurs, la littérature regorge de nombreux exemples d'utilisation de **lipides fusogènes** (*lipid helper*) pour améliorer l'efficacité de transfection des lipides cationiques.²³⁰ Il s'agit de lipides neutres, dont la structure chimique est caractérisée par de longues chaînes acyles et une petite tête polaire non chargée, présentant une géométrie en « cône inversé ». Insérés dans les liposomes cationiques, ils favorisent les interactions entre ceux-ci et les membranes endo-lysosomales *via* la phase hexagonale inversée (Figure 19). La 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE ; Figure 20)²³¹ est le lipide fusogène le plus couramment utilisé et apparaît dans la composition d'agents de transfection commerciaux comme la Lipofectin® ou la Lipofectamine®, contenant du DOTMA et du DOSPA, respectivement.²³¹ D'autres lipides peuvent être utilisés,²²⁹ comme la DSPC, des dérivés du cholestérol (DC-Chol), ou encore la DOPC qui peut moduler le comportement global du complexe dans la cellule par la formation de structures lamellaires stables (Figure 21).²³²

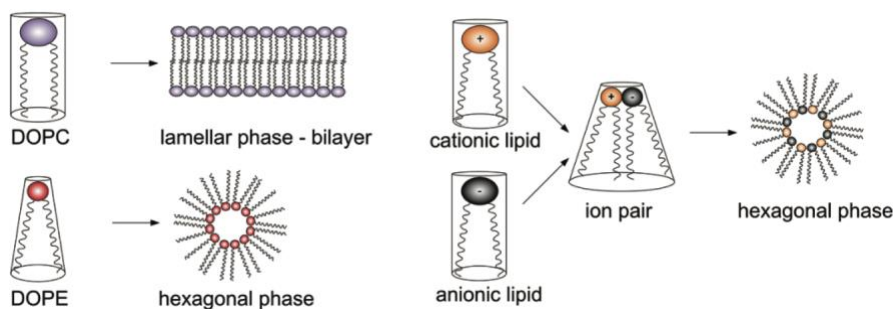


Figure 21. Influence des lipides fusogènes sur l'organisation structurale des lipoplexes.²³²

Malgré les nombreux développements dont ils font l'objet depuis près de trois décennies, les lipides cationiques offrent une efficacité de transfection plus faible que les vecteurs viraux. Ceci est principalement associée à une clairance plasmatique rapide des lipoplexes. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point plus loin dans ce mémoire. Dans tous les cas, le succès de l'Onpattro® est un signe fort en faveur d'un bel avenir en thérapie génique pour les vecteurs non-viraux.

III.2.3.3 Les polymères cationiques

Les polymères cationiques constituent une autre famille très importante de vecteurs d'acide nucléique. Le premier polymère utilisé pour une application en transfection est la poly-lysine (PLL).²³³ Cependant, compte tenu de la faible efficacité qu'elle offre, son utilisation fut rapidement cantonnée à des expériences visant à mieux comprendre les mécanismes de l'échappement endosomal. La polyéthylèneimine (PEI) est étudiée en transfert de gènes depuis 1995,²³⁴ principalement pour ses propriétés d'éponge à proton décrites dès 1997.²³⁵ Le pK_a de la PEI (~ 7), alors compris entre les pH physiologique et endosomal, respectivement 7,4 et 6,5, permet d'absorber les protons introduits dans l'endosome par les ATPases à protons et menant à un influx important de contre-ions chlorure dans le compartiment.²³⁶ La pression osmotique qui en résulte provoque une perméabilisation de la membrane de l'endosome qui laisse alors échapper des polyplexes dans le cytoplasme (Figure 22). Si la PEI peut être linéaire, c'est sous sa forme ramifiée (bPEI 25k) qu'elle est la plus efficace. Malheureusement ce polymère présente une toxicité assez importante, ce qui constitue un frein majeur à son application clinique comme agent de transfection. Diverses stratégies ont été mises en place pour améliorer ses propriétés comme, entre autres, l'acétylation d'une partie de ses amines primaires conduisant à une efficacité de transfection supérieure à celle du polymère initial.²³⁷ D'autres travaux, impliquant une conjugaison avec du PEG ou de l'acide hyaluronique (HA), ont conduit à une réduction de la toxicité du vecteur et permis son utilisation par injection intraveineuse.²³⁸

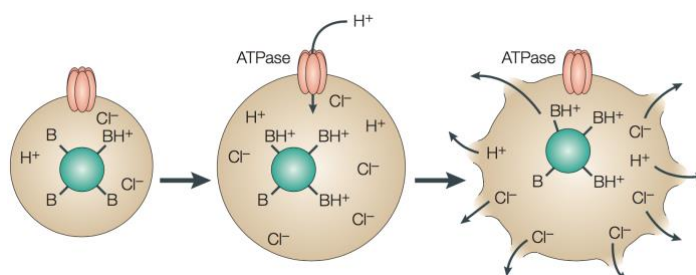


Figure 22. Représentation du principe de l'éponge à proton exploité, entre autres, par le polymère PEI.²³⁹

III.2.3.4 Autres nanoparticules organiques et inorganiques

Les **dendrimères cationiques**, comme les polyamidoamines (PAMAM), sont une classe de polymères élaborés à partir d'un cœur tri- ou polyfonctionnel sur lequel on a fait réagir, par étapes

successives, des "dendrons" qui conduisent à une croissance arborescente de l'édifice (Figure 23). La présence de nombreuses amines primaires dans le PAMAM lui confère des propriétés d'éponge à proton.²⁴⁰ Sa synthèse peut être précisément contrôlée afin d'obtenir une densité de charge donnée et optimiser ses interactions avec les acides nucléiques.²⁴¹ La modification du PAMAM à l'aide de triazine a conduit à un vecteur intéressant pour la délivrance du gène TRAIL *in vitro* 2D/3D et *in vivo*, avec d'excellents niveaux de transfection, une faible toxicité sur cellules MG-63 d'ostéosarcomes, et une inhibition significative de la croissance tumorale sur modèle murin.²⁴² Les **nanotubes de carbones** à paroi simple (*single-walled carbon nanotubes*) ou multiples (*multi-walled carbon nanotubes*) peuvent être fonctionnalisés de manière covalente ou non pour les rendre plus hydrosolubles et favoriser les interactions avec les acides nucléiques.²⁴³ Des nanotubes fonctionnalisés permettent la liaison à un siARN pour sa délivrance dans des lymphocytes.²⁴⁴

Les nanoparticules inorganiques représentent une alternative aux lipides et aux polymères, avec des propriétés de stabilité dans le temps, une faible toxicité ou une indifférence vis-à-vis du système immunitaire. Elles conduisent cependant à des efficacités de transfection peu importantes. Plusieurs catégories existent et les **nanoparticules métalliques** à base de métaux nobles en sont un exemple. Des complexes d'ADN avec des particules d'or cationiques photosensibles ont été développés afin d'induire une décomplexation intracellulaire par un stimuli lumineux.²⁴⁵ Les **nanoparticules magnétiques** d'oxydes de fer possèdent des propriétés ferromagnétiques qui leurs confèrent un potentiel de ciblage *via* l'utilisation d'un champ magnétique. Des particules préparées à partir de magnétite (Fe_3O_4) et de polyéthylèneimine (PEI) ou de silice et complexées à de l'ADN ont ainsi pu être guidées par un champ magnétique jusqu'à leurs cellules cibles pour être internalisées par endocytose et donner lieu à une expression du transgène plus importante qu'en l'absence de champ magnétique.²⁴⁶

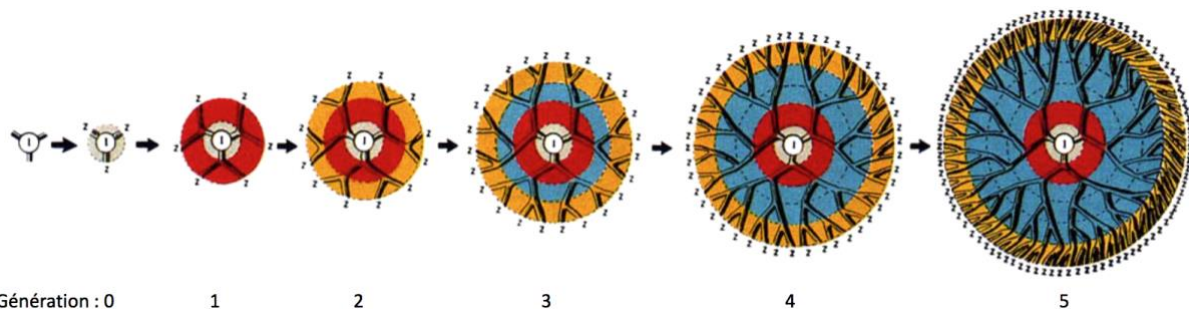


Figure 23. L'accumulation de dendrons génère de nombreuses amines disponibles pour la complexation d'acide nucléique et l'exploitation du principe de l'éponge à protons.²⁴¹

III.2.3.5 Conclusion

De très nombreux vecteurs synthétiques ont été développés tout au long de ces dernières années afin de proposer des alternatives plus sûres aux vecteurs viraux, malgré des niveaux de transfections souvent moins importants. La littérature démontre très largement que les recherches

avancent dans ce sens et le nombre des études en phase II, II/III et III est en augmentation constante ces dernières années, signe que de réels progrès ont été réalisés (Figure 24).^{151,207} Toutefois, la proportion des études en phases I et I/II reste extrêmement élevée, ce qui révèle que de nombreuses stratégies, qu'elles soient virales ou non-virales, se heurtent encore à des obstacles importants, obstacles que nous allons détailler ci-dessous.

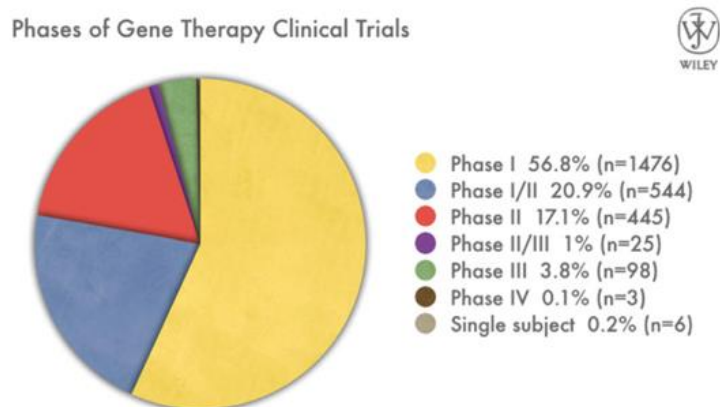


Figure 24. Distribution des essais cliniques dans les différentes phases.¹⁵¹

III.3. Les obstacles au transfert non-viral de gènes

Les différentes stratégies mises en place pour la délivrance de gènes doivent prendre en compte de nombreux paramètres lors de la conception d'un vecteur afin de permettre au couple vecteur-acide nucléique de franchir efficacement les multiples obstacles qui le séparent de leurs cibles.²⁴⁷ En effet, ces derniers doivent franchir diverses barrières tout au long de leur trajet dans le corps du patient,^{248,249} mais également aux abords des différentes tumeurs,²⁵⁰ ainsi qu'à proximité et à l'intérieur des cellules cibles.²⁵¹ Nous présenterons donc ces différents obstacles en suivant cet ordre, mais nous pouvons d'ores et déjà indiquer que les barrières extracellulaires sont en parties dépendantes de la voie d'administration choisie et des tumeurs ciblées et que les barrières cellulaires et intracellulaires sont fonctions de la particule de transfection considérée et de la nature de l'acide nucléique dont elle est constituée.²⁴⁹

III.3.1. À l'échelle du corps entier

La première étape de toute stratégie thérapeutique est l'administration de l'actif. Celle-ci peut être réalisée selon deux voies majeures, à savoir l'administration systémique et l'administration locale, aussi appelée pré-systémique.

La circulation sanguine constitue un excellent moyen pour un principe thérapeutique nanoparticulaire d'atteindre les diverses zones tumorales du corps à traiter. Par ailleurs, le ciblage des tumeurs hématologiques et des métastases impose une administration systémique de l'actif,

même si des stratégies *ex vivo* sont envisageables dans le premier cas (prélèvement sanguin, puis transfection des cellules sanguines et enfin réinjection de celles-ci au patient). Néanmoins, l'administration i.v. rencontre un certain nombre de difficultés, la première étant que de nombreux mécanismes de défense peuvent conduire à la neutralisation des particules et à leur élimination du flux sanguin, mécanismes qui font intervenir des enzymes de dégradation ou des interactions avec les protéines du sang.

L'administration locale, quant à elle, regroupe l'ensemble des voies de délivrance spécifiques, comme l'administration orale, topique, intranasale ou pulmonaire, oculaire, intracérébrale ou encore l'administration intratumorale. Les voies locales présentent divers avantages comme une plus importante biodisponibilité du traitement par rapport à sa cible tumorale, une toxicité réduite vis-à-vis des organes sains qui peuvent être atteints lors d'une administration systémique, ou encore un contrôle plus précis de la dose administrée limitant les phénomènes de toxicité. Les actifs administrés localement sont tout de même soumis à des interactions avec les protéines environnantes. Par ailleurs, ils peuvent être amenés à terme à rejoindre la circulation sanguine et, de fait, rencontrer les obstacles qui lui sont associés.

III.3.1.1 *Les diverses voies d'administration et les obstacles associés*²⁴⁹

De manière générale, les acides nucléiques nus sont sujets à des dégradations enzymatiques par des nucléases du milieu, quelle que soit la voie d'administration choisie. Le matériel génétique directement accessible à la surface des complexes vecteur/acide nucléique est également impacté par ces agressions enzymatiques.²⁵² Introduire des modifications chimiques sur ces acides nucléiques peut, dans certains cas, améliorer la stabilité et la biodisponibilité de ceux-ci mais un design pertinent du vecteur constitue une stratégie généralement plus simple à mettre en œuvre de protection de l'acide nucléique vectorisé.

La voie orale est une voie majeure d'administration d'agents thérapeutiques, dont certains APLs.^{63,66} Elle contraint toutefois les actifs à franchir de multiples obstacles, comme la barrière épithéliale du tube digestif constituée de membranes lipophiles peu perméables. Les vecteurs et leur transgène sont exposés à la forte acidité gastro-intestinale qui peut entraîner leur dégradation, à de multiples nucléases et autres protéines, comme les glycoprotéines P (*p-gp*) qui sont responsables des efflux de médicaments, réduisant ainsi l'effet thérapeutique. Il est possible de contourner ces barrières par le design de particules robustes ou pouvant tirer profit d'un stimuli acide, ou encore par l'utilisation d'inhibiteurs de *p-gp*.

L'application topique d'un agent thérapeutique comme la miltéfosine permet le traitement efficace de maladies infectieuses ou parasitaires cutanées et de cancers de la peau, mais aussi d'atteindre des cibles plus profondes, en diffusant à travers les différentes couches dermales et en passant dans la circulation sanguine.⁶¹

L'administration intranasale permet le ciblage des voies respiratoires mais aussi du système immunitaire car le nez est une zone très exposée aux agressions extérieures et contient de nombreuses cellules immunitaires. Les actifs thérapeutiques peuvent être déposés sous forme de gouttes ou d'aérosols à la surface de l'épithélium nasal qu'ils doivent traverser, celui-ci étant composé de cils et recouvert de mucus.²⁵³ Ce mucus, un biopolymère complexe, constitue un maillage efficace qui rend délicat l'adhérence et le transport par diffusion des composés.

L'administration pulmonaire, elle, peut être réalisée par le biais d'aérosols qui font intervenir le principe de nébulisation ou atomisation des particules sous forme de spray.²⁵⁴ Toutefois, cela suppose que les particules soient stables dans les conditions d'aérosolisation qui imposent généralement d'importantes contraintes de cisaillement.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la voie intraveineuse est une voie importante pour la délivrance de principes actifs. Cependant, les dégradations enzymatiques dans le milieu sanguin et des impératifs en terme de taille des particules constituent des obstacles dont il faut tenir compte.²⁴⁷ En effet, la taille des particules est un paramètre crucial qui conditionne en partie la durée de vie et de circulation de celles-ci. Des objets dont la taille est inférieure à 5 nm sont ainsi soumis à une très rapide clairance plasmatique et sont éliminés par les reins, comme le prouve la quantité d'acide nucléique nu détecté dans les urines seulement quelques minutes après l'injection intraveineuse de celui-ci.²⁵⁵ Par ailleurs, les particules plus grosses subissent une accumulation non spécifique au niveau de différents organes en fonction des jonctions cellulaires plus ou moins serrées de la paroi de l'endothélium vasculaire, barrière entre les vaisseaux sanguins et la matrice extracellulaire de ces organes. Ainsi, le foie et la rate présentent des discontinuités endothéliales allant de 50 à 500 nm qui donnent lieu à une séquestration des nanoparticules circulant dans le sang par simple effet de filtration mécanique. Il en va de même pour les particules qui avoisinent le micromètre et plus, pouvant provenir de l'agrégation de particules plus petites et qui se retrouvent piégées dans les capillaires pulmonaires (Figure 25).²⁵⁶

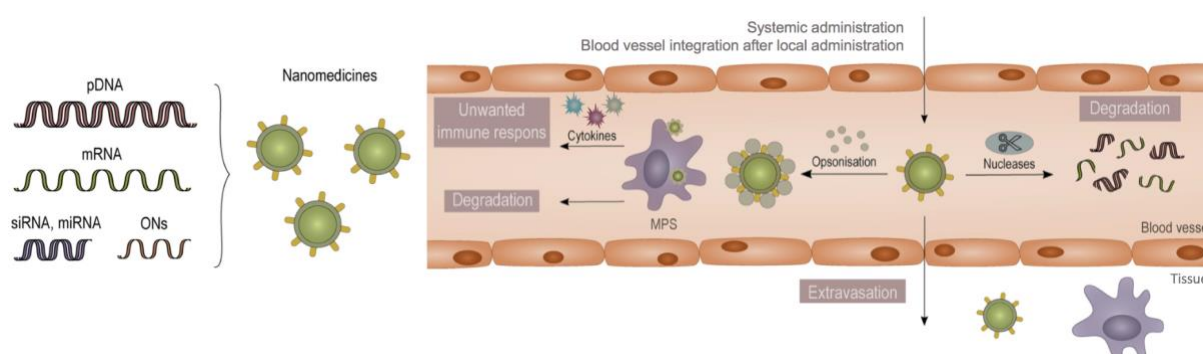


Figure 25. La dégradation des particules thérapeutiques au sein de la circulation sanguine (valable aussi dans les tissus) suite à l'intervention d'enzymes spécifiques ou du système des phagocytes mononucléaires (MPS).²⁵¹

1.1.1. L'opsonisation et la phagocytose dans le sang et les tissus

Comme indiqué ci-dessus, les actifs thérapeutiques introduits dans la circulation sanguine ou les tissus rencontrent des barrières mécaniques et sont soumis à des dégradations enzymatiques. Ils peuvent également interagir avec diverses protéines du sérum, les opsonines, qui vont les recouvrir et initier leur élimination (Figure 25). Cette étape dite d'opsonisation permet d'activer le processus d'élimination des particules exogènes, comme les bactéries ou les nanoparticules thérapeutiques, processus qui est contrôlé par le système réticulo-endothélial (*RES*), également désigné sous le nom de système réticulo-histocytaire (*RHS*) ou système phagocytaire mononucléaire (*MPS*).²⁵⁷ Après leur marquage par les opsonines, les particules vont être reconnues par les phagocytes et internalisées dans ces cellules (phagocytose) pour y être digérées et éliminées de la circulation sanguine (Figure 26).²⁵⁸

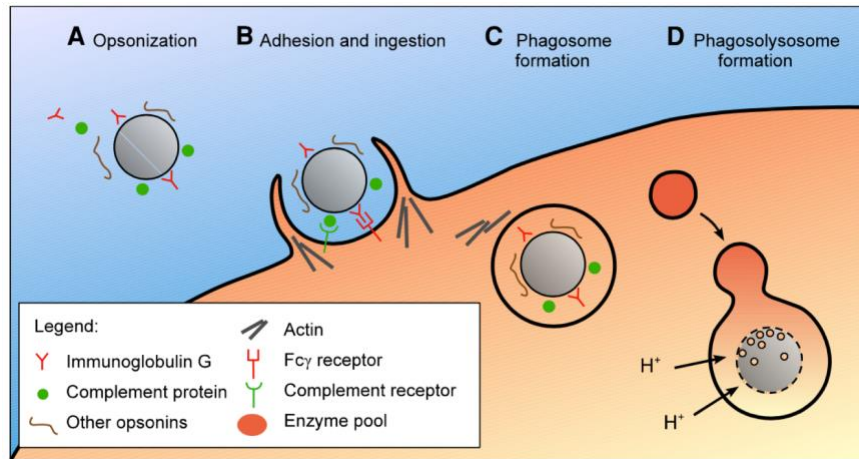


Figure 26. L'opsonisation, *via* divers constituants du sérum, permet la reconnaissance des particules par les divers phagocytes présents dans le sang et les tissus, et entraîne ainsi leur élimination par le MPS.²⁵⁹

Il est possible de contourner le MPS en administrant des "pré-doses" qui permettent la reconnaissance d'une certaine quantité de matériel et préservant l'intégrité de la dose suivante.²⁶⁰ Il est également envisageable de masquer les particules par fonctionnalisation avec des polymères d'exclusion stérique, comme les PEG,²⁶¹ ou avec des peptides furtifs tels que CD47.²⁶² Néanmoins, des anticorps spécifiques peuvent être produits à la suite de la première injection (IgM PEG-spécifiques) et provoquer l'élimination des particules porteuses de ces motifs lors de l'administration de doses ultérieures.²⁶³

III.3.2. À l'échelle de la tumeur

L'accumulation des particules dans les zones présentant des discontinuités de l'endothélium est un phénomène observé à proximité de certains organes comme nous l'avons relevé précédemment, mais également aux abords des tumeurs solides. La croissance rapide des tumeurs stimule l'angiogenèse avec la croissance de vaisseaux sanguins anormaux, hétérogènes et présentant

de manière irrégulière des interstices dans la paroi endothéliale d'environ 200-700 nm. Les particules peuvent franchir ces interstices et ainsi s'accumuler au niveau de la tumeur ; c'est l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*) décrit en 1986 par Maeda (Figure 27).

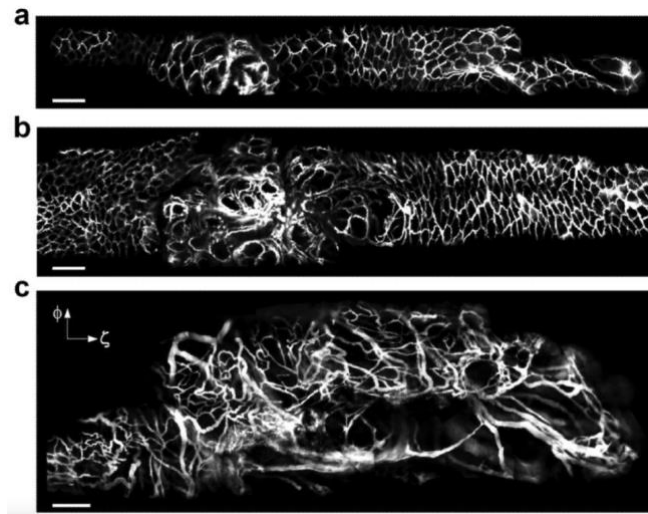


Figure 27. Évolution de la vascularisation au niveau du côlon d'une souris, respectivement 11 (a), 13 (b) et 17 semaines (c) après inoculation d'un adénocarcinome.²⁶⁴

L'effet EPR peut être vu comme une faiblesse des tumeurs et un moyen de concentrer les actifs thérapeutiques à leur niveau *via* un passage préférentiel de formulations nanoparticulaires par ces fenestrations et constituer un mode de ciblage passif (Figure 28).²⁶⁴

Ce concept révolutionnaire de ciblage tumoral et la compréhension mécanistique de ce dernier ont fait l'objet d'innombrables travaux. Entres autres, des études de biodistribution de liposomes fluorescents ont notamment démontré que les particules étaient plus rapidement accumulées dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains comme les yeux, les oreilles ou les pattes des animaux.²⁶⁵ De plus, la réalisation de plasmaphérèse permet d'éliminer des particules de la circulation sanguine et d'inhiber l'accumulation des particules dans les tissus sains, sans pour autant diminuer la quantité de matériel piégé dans les tumeurs. Ceci soutient diverses hypothèses selon lesquelles la vascularisation tumorale est un phénomène dynamique et non figé qui permet une rétention efficace et irréversible des particules au niveau des tumeurs.^{265,266} La doxorubicine formulée en solution liposomale (Doxil[®]/Caelyx[®]) et autres formulations d'albumine et de paclitaxel (Abraxane[®]) ont fait leur entrée en clinique dans les années 90 et permettent d'allonger la survie des patients.^{267,268}

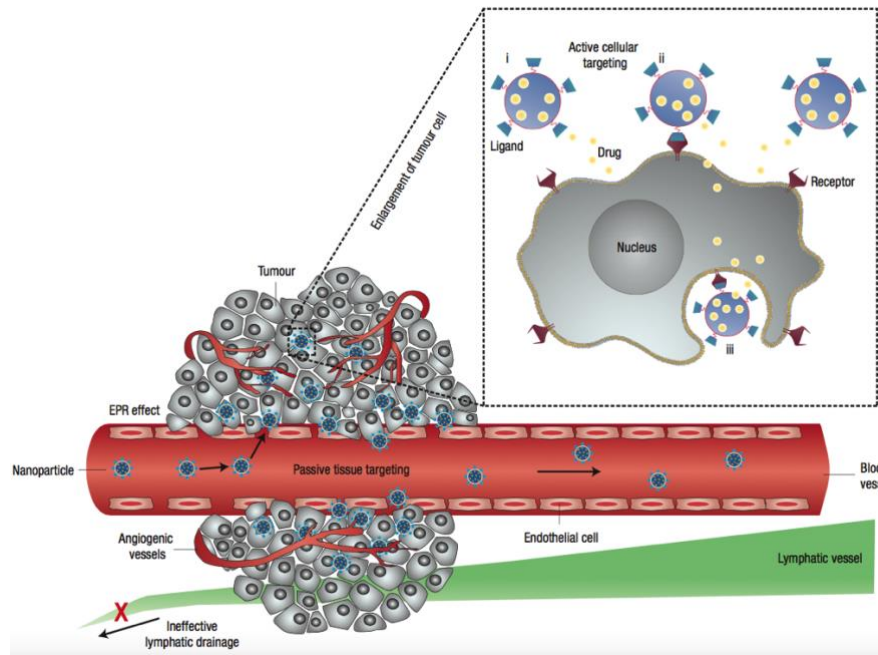


Figure 28. L'effet EPR et ses conséquences pour le matériel thérapeutique relèvent du ciblage passif alors que la fonctionnalisation des particules en vue de reconnaissances spécifiques constitue le ciblage actif.²⁶⁹

Cependant, il reste difficile d'attribuer le succès de certains essais cliniques à une implication directe de l'effet EPR et d'expliquer l'absence, plus régulièrement observée, d'un tel effet, comme c'est le cas, par exemple, dans l'étude en phase III de la formulation Doxil[®]/Caelyx[®] dans le traitement du cancer métastatique du sein. En effet, aucun effet significatif sur la survie des patients n'a été constaté dans ce cas, même si une réduction de la cardiotoxicité a pu être observée par rapport à un traitement à la doxorubicine seule.²⁷⁰

Ce décevant passage du modèle préclinique animal au modèle clinique chez l'Homme a permis d'identifier de grandes différences entre les deux modèles et de constater que l'effet EPR fonctionne chez la souris mais n'est pas aussi important chez l'Homme. Les modèles murins de tumeurs utilisés pour étudier l'effet EPR ont été réexaminés et des différences fondamentales avec les modèles humains ont été identifiées.²⁷¹ Par exemple, la vascularisation tumorale d'un même modèle diffère selon le type de tumeurs solides et semble dépendre de la vitesse de la croissance tumorale, avec des facteurs de vascularisation, comme le VEGF, qui peuvent être surexprimés dans certaines tumeurs.²⁴ Par ailleurs, les tumeurs se développent considérablement moins vite chez l'Homme que chez la souris où elles peuvent représenter jusqu'à 10 % du poids de l'animal. On comprend alors que le développement du microenvironnement tumorale chez la souris est plus favorable à la rétention de particules que chez l'Homme, où une tumeur à plus faible vascularisation n'autorise que de plus petites particules à s'accumuler,²⁷² ces dernières étant malheureusement éliminées par l'organisme comme nous l'avons vu précédemment.²⁴⁷

De manière générale, le microenvironnement tumoral dans les cancers humains se distingue de celui des tumeurs murines par une hétérogénéité ou un manque de fenestration dans

l'endothélium tumoral, ou par une hétérogénéité du flux sanguin dans certains tissus, ou encore par une densité supérieure et hétérogène de la matrice extracellulaire (ECM), rendant le ciblage par effet EPR plus subtil chez l'Homme (Figure 29).²⁷¹

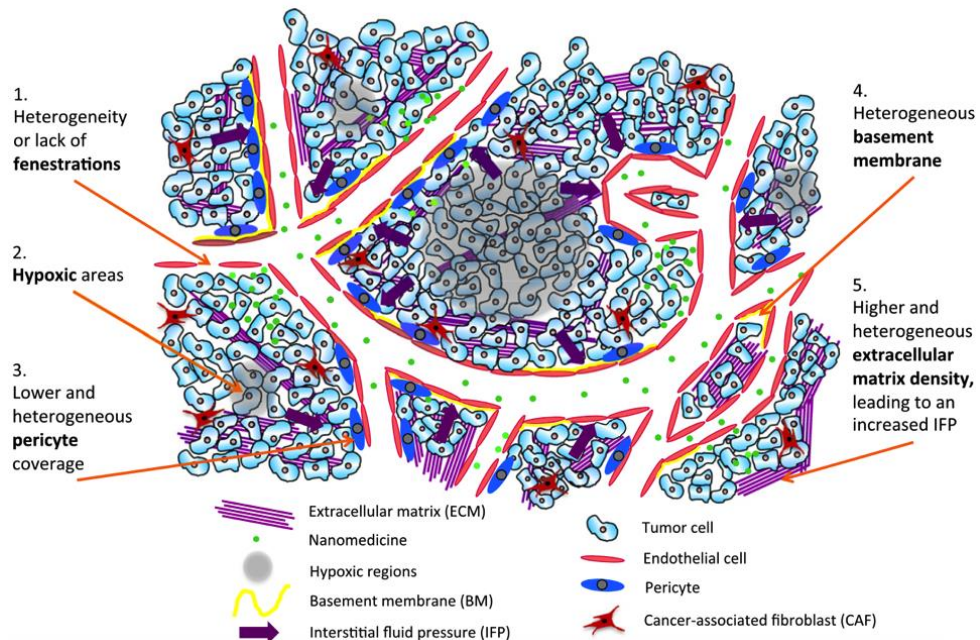


Figure 29. L'effet EPR est moins efficace chez l'Homme que chez l'animal en raison de différences entre les microenvironnement tumoraux.²⁷¹

Depuis la prise de conscience par la communauté scientifique de ce fait important, plusieurs stratégies sont étudiées pour mettre au point des modèles précliniques dans lesquels l'altération des jonctions épithéliales serrées, comme chez l'Homme, induit un effet EPR.²⁷³ Certaines approches sont basées sur la modulation du flux sanguin à l'aide d'agents vasoconstricteurs comme l'angiotensine II ou des vasodilatateurs tels que la nitroglycérine (Figure 30.A).²⁷⁴ La modification de la vascularisation tumorale ou du stroma en lui-même constitue une autre stratégie (Figure 30.B). En effet, la normalisation du réseau vasculaire et de la matrice extracellulaire à l'aide d'agents anti-angiogéniques ou qui dégradent la matrice (collagénase, hyaluronidase) peut induire l'accumulation de particules dans les tissus.²⁷⁴ Néanmoins, ces agents ne sont pas de ciblant.

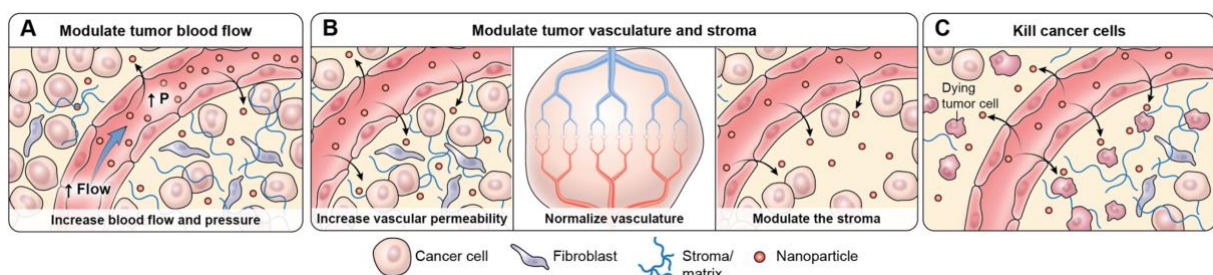


Figure 30. Diverses stratégies sont à l'étude pour mettre en place un effet EPR dans des modèles animaux qui soit transposable chez l'humain.²⁷³

Des équipes se sont également intéressées à l'impact d'autres techniques antitumorales sur la désorganisation de la zone tumorale pour tenter d'améliorer la perméabilité de l'épithélium vasculaire (Figure 30.C). L'une d'entre elle, la photo-immunothérapie dans le proche infrarouge (*NIR-PIT*), semble être une technique prometteuse pour induire un effet EPR plus satisfaisant. Elle consiste à injecter un anticorps monoclonal qui se lie à la membrane des cellules tumorales et qui est conjugué à un photoabsorbant (Figure 31.A).²⁷⁵ La tumeur est ensuite éclairée par un faisceau de lumière à une longueur d'onde absorbée par le colorant (690 nm), ce qui induit une mort cellulaire nécrotique et non apoptotique presque immédiate. Cette technique fait l'objet depuis 2015 d'un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou inopérables (NCT02422979) et qui porte sur les effets obtenus par traitement répété. En effet, des études précliniques ont montré que plusieurs cycles permettent une augmentation spectaculaire de la perméabilité aux nanoparticules, suivie de leur rétention dans les tumeurs traitées, donnant des résultats jusqu'à 24 fois supérieurs à ceux obtenus sur des tumeurs non traitées et dans lesquelles seul l'effet EPR est mis en jeu. Ce phénomène a été baptisé effet SUPR (*superenhanced permeability and retention effect*) en 2013²⁷⁶ et est depuis activement étudié pour une transposition à l'Homme (Figure 31.B).²⁷⁷

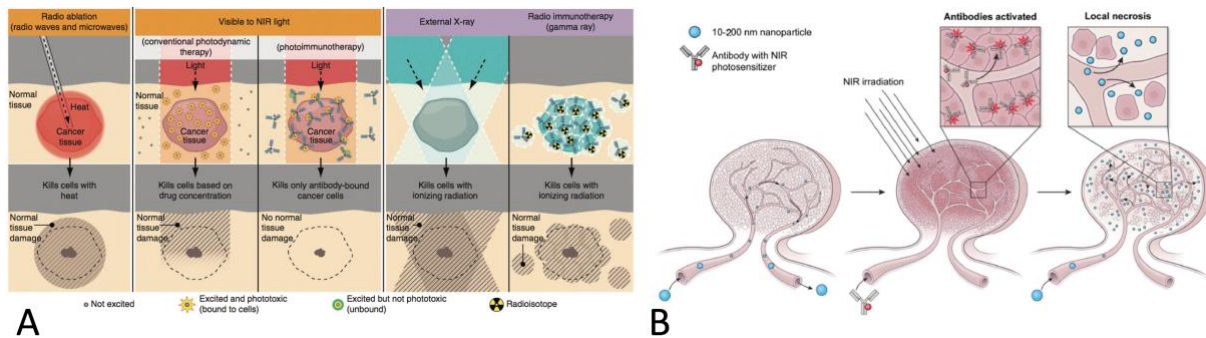


Figure 31. L'utilisation de la photo-immunothérapie dans le proche infrarouge (*NIR-PIT*)²⁷⁵ comme inducteur d'un effet EPR exacerbé, alors appelé effet SUPR.²⁷⁶

Le recours à un ciblage actif par fonctionnalisation de vecteurs avec des ligands spécifiques constitue une autre stratégie largement étudiée (Figure 28). En effet, ces constructions représentent une nouvelle génération de vecteurs puisqu'elles exploitent la reconnaissance d'un récepteur particulier exprimé par des cellules cancéreuses et qui va servir de médiateur dans l'internalisation de la particule à activité antitumorale.²⁵⁰ Parmi les ligands développés, on peut citer les anticorps cetuximab, ou trastuzumab,²² qui ciblent les récepteurs EGF ou HER-2, les peptides pénétrants TAT, des petites molécules comme l'acide folique, ou des protéines comme l'albumine²⁷⁸ ou la transferrine.

Lorsque cette stratégie est applicable, l'administration des traitements au sein des tumeurs solides (85 % des cancers) est une alternative particulièrement attractive puisque l'effet EPR n'est pas requis dans ce cas. Néanmoins, à ce jour et à notre connaissance, aucune autorisation de mise sur le marché n'a encore été accordée à une spécialité pharmaceutique de ce type.

III.3.3. À l'échelle de la cellule

Les actifs thérapeutiques qui atteignent la cellule cible ont franchi diverses barrières mais les obstacles cellulaires et intracellulaires sont nombreux. En effet, l'effet antitumoral escompté ne sera obtenu que lorsque les actifs se seront associés à la surface de la cellule, auront été internalisés, puis auront échappé à la dégradation endo-lysosomale et enfin auront rejoint l'organelle où leur activité intrinsèque pourra s'exprimer.

III.3.3.1 L'internalisation cellulaire

Nous avons vu précédemment que l'association des opsonines avec les nanoparticules peut engendrer l'élimination de ces dernières. Cependant, des interactions particules/protéines peuvent également être favorables à l'internalisation des complexes résultants par les cellules tumorales.²⁷⁹ En effet, le recouvrement des particules par ce qui est appelé la "protein corona" est un processus dynamique selon lequel les protéines les plus abondantes dans le milieu sont recrutées rapidement par la particule, puis sont déplacées lentement par des protéines présentes en moins grande quantité mais montrant une affinité plus élevée (Figure 32). Cette évolution, dont la vitesse est dépendante de l'environnement biologique, peut amener des particules à s'agglomérer entre elles pour stagner au niveau des cellules tumorales ou peut directement induire une interaction avec les membranes cellulaires et médier l'internalisation des complexes.²⁸⁰

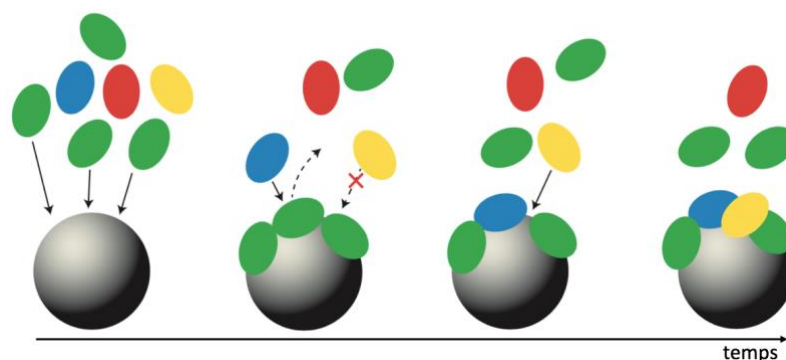


Figure 32. Illustration du système dynamique de "protein corona". Au début, les biomolécules les plus abondantes (vert) s'associent aux particules et forment la "soft corona". Elles sont ensuite graduellement déplacées par celles de plus haute affinité (bleu). La surface des particules peut alors devenir favorable à l'association de biomolécules initialement peu affines (jaune). Certaines biomolécules restent toutefois inertes (rouge).²⁸⁰

L'élimination des nanoparticules par le MPS fait intervenir les phagocytes et la phagocytose (Figure 33.A). En ce qui concerne les autres types cellulaires, les nanoparticules sont le plus souvent internalisées par voie d'endocytose.²⁵⁹ Les mécanismes d'endocytose sont multiples et peuvent faire intervenir des cathrines, des cavéoles, ou d'autres récepteurs tels que l'acide folique (Figure 33.B-E). Les vecteurs non-viraux et leur cargaison sont capables d'utiliser l'une ou l'autre de ces voies en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et de l'environnement.²⁸¹

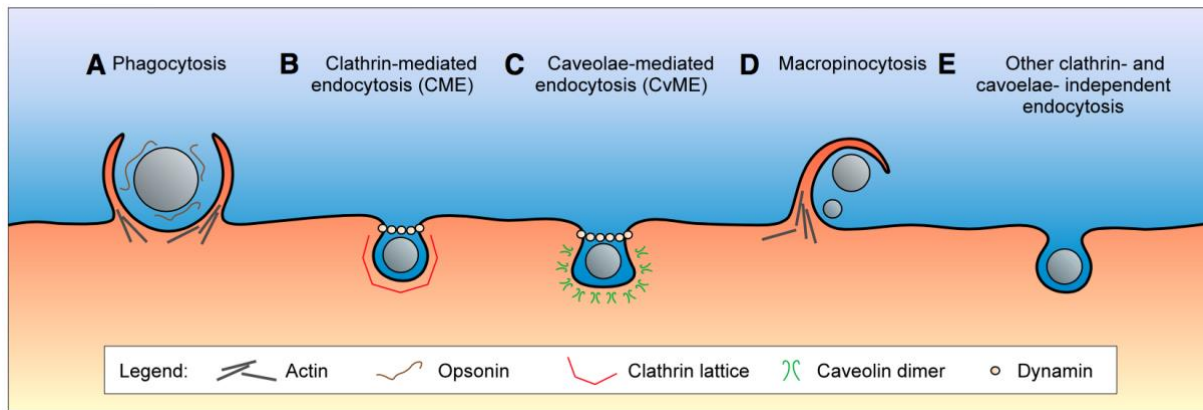


Figure 33. Les voies d'internalisation des particules sont multiples et l'endocytose en est une majeure.²⁵⁹

L'**endocytose médiée par les cathrines** (*clathrin-mediated endocytosis CME*)²⁵⁹ permet l'internalisation de nanoparticules *via* la formation d'une maille de cathrines englobant celles-ci, assistée par des récepteurs médiateurs ou par des interactions hydrophobes et des interactions électrostatiques non-spécifiques. On parle alors d'endocytose dépendante ou non des récepteurs (Figure 33.B). Quoiqu'il en soit, la formation d'une cage de cathrines autour du complexe thérapeutique induit une courbure de la paroi cellulaire formant une vacuole indépendante après fission de la membrane plasmique. La structure de cathrines peut alors se détacher pour un recyclage à la membrane, laissant ainsi la vésicule formée, un endosome précoce, évoluer et mûrir.

L'**endocytose médiée par les cavéoles** (*Caveolae-mediated endocytosis CvME*)²⁵⁹ est une autre voie importante de l'internalisation cellulaire qui fait intervenir de petites poches membranaires de moins de 100 nm, bordées d'une protéine dimérique, la cavéoline, et enrichies en cholestérol et en sphingolipides (Figure 33.C). Ces cavéoles sont principalement présentes sur les cellules musculaires ou endothéliales, mais absentes des cellules neuronales par exemple. Les particules proches des membranes migrent jusqu'à ces poches où elles vont être maintenues par des interactions ligand/récepteur associées à l'albumine, au cholestérol ou à l'acide folique, avant d'être piégées par la formation d'une vésicule inerte. Celle-ci peut évoluer vers un endosome précoce mais elle peut aussi fusionner avec des cavéosomes, des vésicules neutres et dépourvues d'enzymes, faisant alors de cette sous voie une alternative au passage par les endo-lysosomes.²⁵⁹

La **macropinocytose** est une autre voie d'internalisation utilisée par de nombreux types cellulaires, y compris les macrophages, et qui implique des protubérances induites par l'actine et les facteurs de croissance, sans assistance de récepteur (Figure 33.D).²⁵⁹ Contrairement à la phagocytose où les cellules englobent la particule à internaliser, ici c'est un effondrement d'excroissances plasmiques sur les particules, suivi d'une fusion avec la membrane, qui entraîne l'internalisation dans d'importantes vésicules appelées macropinosomes. Leur acidification et leur rétrécissement peuvent conduire à la fusion avec des lysosomes ou à un recyclage du contenu à la membrane.

D'autres voies existent bien sûr, plutôt guidées par divers composants des rafts lipidiques, riches en cholestérol. Cependant, leur implication dans l'internalisation des nanoparticules et les mécanismes sous-jacents sont moins décrits (Figure 33.E).

Globalement, les différentes voies d'internalisation des nanoparticules peuvent conduire à la formation d'un endosome précoce qui contient ces nanoparticules et qui va progressivement s'acidifier jusqu'à un pH d'environ 6 sous l'action de pompes à protons ATP-dépendantes (Figure 34).¹⁸⁴ Cette étape présente un premier risque de dégradation du contenu de l'endosome tout en permettant le recyclage des médiateurs impliqués dans la voie considérée. L'endosome précoce mature en endosome tardif avec une diminution du pH à environ 5 puis fusionne avec des vésicules lysosomales, riches en enzymes de dégradation, le pH du milieu s'établissant aux alentours de 4,5.

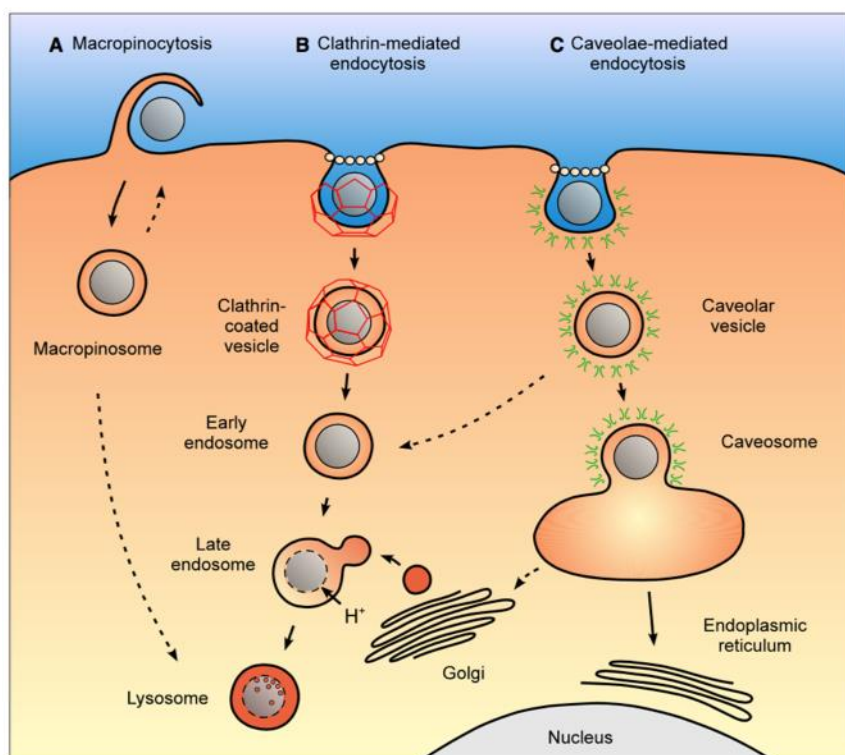


Figure 34. Après leur internalisation, les particules sont maintenues au sein de vésicules dont l'évolution en endosomes précoces, tardifs, puis en endo-lysosomes conduit à la dégradation complète des actifs.²⁵⁹

Par ailleurs, si les cellules procèdent à l'internalisation de particules, elles peuvent le faire de manière seulement transitoire en réexpédiant leur contenu à la membrane, selon un processus cellulaire naturel appelé **exocytose**.²⁵¹

On estime que trois modes d'externalisation existent, impliquant, par exemple, la fusion d'endosomes précoces avec des endosomes de recyclage, évitant ainsi la phase de maturation ou la fusion avec des lysosomes. Des corps multivésiculaires (*MVB*) peuvent aussi conduire la cargaison vers la membrane plasmique en vue de son recyclage par déroutement des endosomes tardifs et formation d'exosomes, ou par récupération, *via* des ectosomes membranaires, de matériel endocyté

ayant réalisé un échappement endosomal. Enfin une voie sécrétoire de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique constitue une exocytose plus conventionnelle.

Les voies d'excrétion des nanoparticules par les cellules sont moins étudiées que celles liées à leur internalisation mais elles jouent globalement un rôle néfaste dans le processus de délivrance de gènes par réduction de la quantité de matériel thérapeutique dans le compartiment intracellulaire (Figure 35). En revanche, elles peuvent être exploitées à bon escient pour le transport de principes actifs dont les mécanismes d'action sont ciblés au niveau de ladite membrane plasmique, à l'image des APLs présentés précédemment.

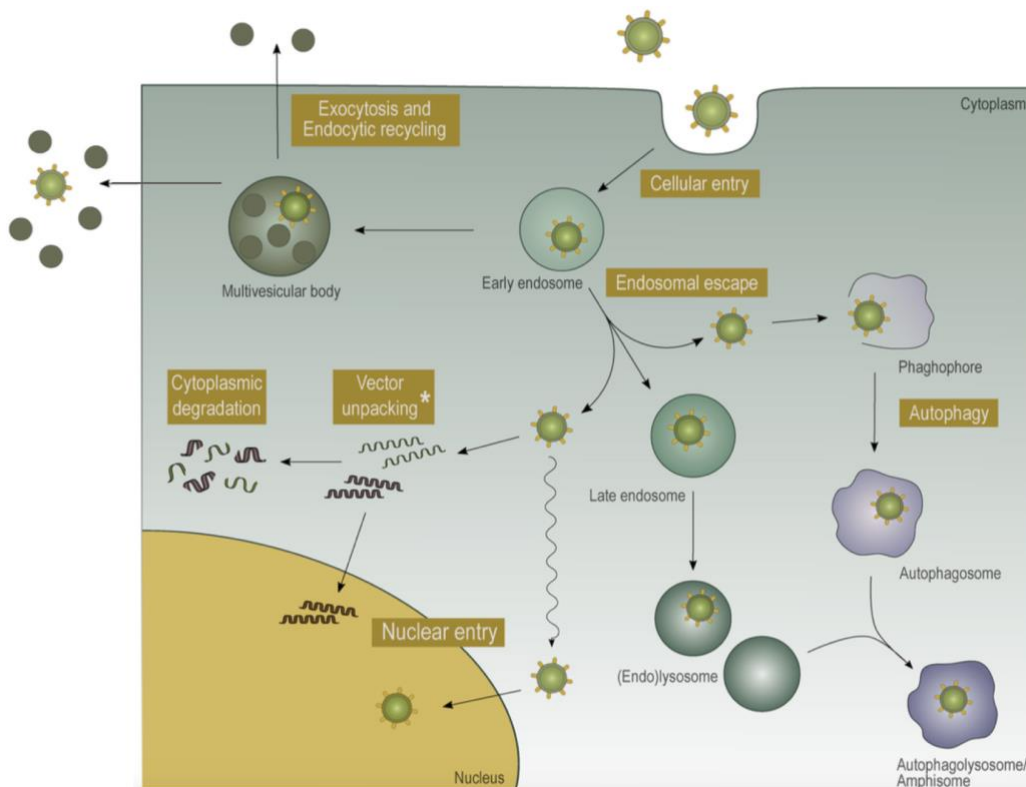


Figure 35. Différents scénarios possibles quant au devenir des nanoparticules une fois internalisées, comme la dégradation lysosomale, l'expulsion extracellulaire, le recyclage ou l'échappement dans le cytosol.²⁵¹

III.3.3.2 L'échappement endosomal

L'échappement endosomal constitue un événement important pour le devenir intracellulaire de l'acide nucléique internalisé,²⁸² puisqu'en cas de succès, il pourra rejoindre sa cible et induire son effet thérapeutique. À l'inverse, si le complexe reste séquestré au sein de l'endosome, il sera dégradé et ceci anéantira les efforts réalisés au cours de son long trajet du lieu d'administration jusqu'à la cellule. Ainsi, de multiples stratégies ont été développées pour élaborer des actifs thérapeutiques capables de présenter *in situ* des propriétés destabilisantes, fusogènes, détergentes, ou perforantes des membranes lipidiques dans le but de destabiliser la membrane de l'endosome et faciliter leur relargage dans le cytosol avant dégradation.²⁴⁹

Le stimulus acide rencontré lors de la maturation endo-lysosomale offre l'opportunité à des composés pH-sensibles d'induire la déstabilisation de la membrane du compartiment dans lequel ils sont séquestrés.¹⁸⁴ Nous avons vu auparavant que le polymère PEI et autres dendrimères de type PAMAM font intervenir un effet d'éponge à proton grâce aux nombreuses amines protonables qu'ils arborent et provoquent ainsi le gonflement osmotique du compartiment et son éclatement (Figure 22).²⁸³ Par ailleurs, certains lipides polycationiques (DOGS) sont également en mesure d'exhiber le même type d'effet.

Alternativement, les lipides cationiques entrant dans la composition des lipoplexes peuvent interagir avec les lipides membranaires (chargés négativement) des endosomes qui les séquestrent. Un mécanisme de « flip-flop »²⁸² peut s'opérer et conduire à une fusion entre les lipides membranaires et ceux du vecteur, ce qui déstabilise la paroi endosomale et favorise l'échappement de son contenu.

Des lipoplexes pH sensibles ont également été conçus de façon à relarguer des espèces détergentes susceptibles de déstabiliser la membrane endosomale et permettre le relargage d'entités sujettes à dégradation telles que des acides nucléiques,²⁵³ ou certains médicaments.¹⁹⁰ Les lipides ionisables utilisés dans les formulations SNALPs sont un autre exemple de systèmes conçus pour favoriser l'échappement endosomal (cf. *Chapitre 1 - III.2.3.2. Les lipides cationiques*).²²⁸

Il a également été mentionné que des lipides fusogènes (*lipid helper*) favorisent la déstabilisation de la membrane de l'endosome ou de l'endo-lysosome en induisant une transition de phase des lipides dans la phase hexagonale inverse.^{224,230} De manière assez similaire, des protéines aux propriétés fusogènes et des peptides pénétrants tels que le peptide GALA ont été utilisés.¹⁸⁴

L'utilisation de peptides dont la conformation est pH-dépendante permet également d'induire des interactions déstabilisantes avec la membrane de l'endosome, par exemple à travers la formation d'une structure en hélice- α .²⁸⁴ Le recours à des entités photosensibles et à un déclencheur photochimique extérieur peut permettre de provoquer la déstabilisation de la membrane endosomale,²⁸² par génération d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la membrane où se sont accumulées les entités photosensibles.²⁸⁵

Ainsi, les interactions entre des nanoparticules et le milieu cellulaire peuvent être modulées de diverses manières pour mettre en place un effet spécifique sur la membrane des endosomes et déclencher un relargage cytosolique au moment opportun. De telles approches permettent en outre d'étudier de manière plus précise le trafic intracellulaire et d'améliorer le rendement du relargage de l'acide nucléique dans le cytosol, une des étapes fortement limitante de la transfection par les vecteurs non-viraux.²⁵¹

III.3.3.3 Le devenir de l'acide nucléique

Selon la nature de l'acide nucléique vectorisé, le transport de celui-ci dans le cytoplasme le conduit vers différentes zones et organelles de la cellule (Figure 36). La plupart des acides nucléiques mentionnés précédemment trouvent leur cible dans le cytoplasme et n'ont plus à franchir de nouvelle barrière intracellulaire. En effet, les siARN et les miARN migrent vers le complexe RISC tandis que les mARN évoluent au niveau des ribosomes.²¹⁸ Ils n'en doivent pas moins diffuser dans le gel que constitue le cytoplasme pour atteindre leur cible, ce qui est, semble-t-il, sous le contrôle de certaines protéines motrices et de leur interaction avec des éléments du cytosquelette.^{286,287}

Les plasmides d'ADN, quant à eux, sont destinés à intégrer le noyau et doivent ainsi franchir une dernière barrière intracellulaire qu'est la membrane nucléaire. Même si quelques cas ont été décrits,²⁸⁸ les complexes d'ADN ne sont généralement pas en mesure de traverser cette barrière, la taille des pores nucléaires étant le plus souvent nettement inférieure à celle des particules de transfection. Le franchissement de ce dernier obstacle par le plasmide nu, dissocié du vecteur, semble également très hypothétique. En effet, les tentatives d'expression d'une thymidine kinase dans des cellules déficientes, *via* microinjection intra-cytoplasmique d'un plasmide codant la protéine, se sont révélées infructueuses alors que l'injection intra-nucléaire du même plasmide conduit à l'expression de la kinase.²⁸⁹ Ceci suggère que l'internalisation nucléaire d'un transgène associé à son vecteur est un mécanisme subtil. Elle profite probablement grandement de la déstabilisation du noyau qui a lieu lors de certaines phases de la division cellulaire, particulièrement lors des expériences de transfection *in vitro*, mais cette seule explication ne suffit pas à rendre compte de la transfection, certes plus difficile, de cellules qui ne sont pas en phase de division. Par ailleurs, des études ont montré qu'après internalisation et passage par des endosomes, des complexes de PEI et d'ADN sont guidés jusqu'au noyau *via* un transport vésiculaire le long des microtubules.^{286,287} Ceci indique que le matériel génétique ne semble pas subir une décomplexation complète dans cytosol pour ensuite migrer jusqu'au noyau mais plutôt que le processus est progressif, des endosomes au noyau.

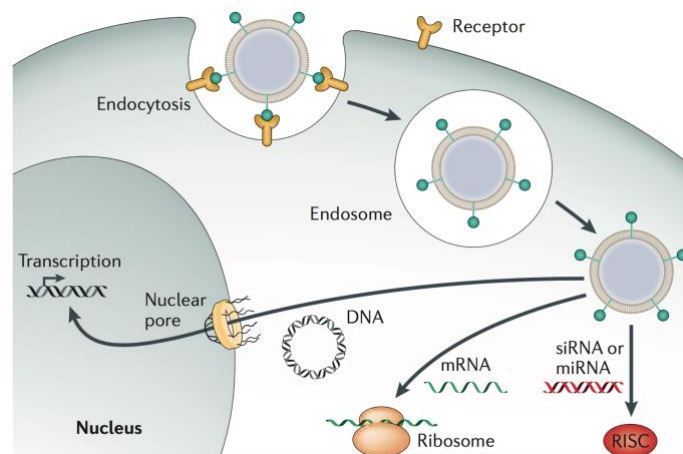


Figure 36. Les diverses cibles intracellulaires des acides nucléiques étudiés dans le cadre de la thérapie génique.²¹⁸

IV. Conclusion et objectifs de la thèse

Au cours de cette partie introductive (cf. *Chapitre 1 - I. Le cancer*), nous avons rappelé que la lutte contre des maladies telles que le cancer a énormément progressé mais qu'elle requiert encore des efforts pour développer de nouvelles stratégies, plus efficaces, avec moins d'effets secondaires, et permettant de juguler l'émergence des phénomènes de résistance et de réduire l'échappement thérapeutique. Les bons résultats obtenus avec la combinaison de différents types de traitements ont prouvé l'importance d'adapter les thérapies à la diversité tumorale et de maîtriser les résistances développées par les tumeurs.

De manière indéniable, les APLs constituent une nouvelle classe d'agents chimiothérapeutiques prometteurs puisque, contrairement aux autres classes de drogues antitumorales, ils agissent au niveau des membranes cellulaires et développent des mécanismes d'action sélectifs vis-à-vis de certains types cellulaires (cf. *Chapitre 1 - II. Les alkylphospholipides contre le cancer*).

La thérapie génique, quant à elle, est une stratégie thérapeutique antitumorale excessivement prometteuse et intensément étudiée depuis plusieurs décennies, avec le développement de vecteurs de plus en plus efficaces. L'intérêt thérapeutique que représente la protéine TRAIL dans le traitement des cancers, par sa capacité à induire spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales, motive les nombreux efforts qui sont développés pour son utilisation dans des protocoles thérapeutiques de transfert de gènes et qui font l'objet de diverses études cliniques (cf. *Chapitre 1 - III. La thérapie génique contre le cancer*).

Tenant compte de ces différentes observations et des similitudes entre la structure des APLs et celle de nombreux lipides cationiques développés en tant que vecteurs pour la thérapie génique, le développement d'une combothérapie associant la thérapie génique et les phospholipides anticancéreux nous a semblé pertinent. Ainsi, des prodrogues cationiques d'APLs, que nous nommerons pro-APLs, pourraient assurer la vectorisation d'un gène thérapeutique (un plasmide TRAIL ou un siARN anti-survivine) et conduire au relargage *in situ* des APLs parents. L'expression du transgène à activité pro-apoptotique et l'action intrinsèque de l'APL pourraient mener à des synergies antitumorales.

La stratégie que nous avons souhaité développer au cours de ce travail de doctorat repose donc sur la conception de nouveaux vecteurs de transfection basés sur la structure chimique de trois APLs, à savoir la miltéfosine, la périfosine et l'érufosine. Les structures de ces APLs sont semblables mais leurs profils toxicologiques sont différents, ce qui nous a incité à concevoir trois catégories différentes de prodrogues. Les variations structurales de chaque pro-APLs devraient permettre de mener une étude de relation structure-activité et d'optimiser la structure des pro-APLs pour les applications de transfert de gènes.

En 2016, le groupe de Huang a développé une combothérapie qui implique le lipide DOBP,²⁹⁰ un conjugué du DOTAP et de la metformine,²⁹¹ une molécule antidiabétique et antitumorale (Figure 37). Les nanoparticules produites (DOBP-LPD-TRAIL) permettent de vectoriser *in vivo* un plasmide codant TRAIL avec une efficacité supérieure au système DOTAP-LPD-TRAIL sur des tumeurs pulmonaires inoculées chez la souris. L'activité antitumorale des liposomes à base de metformine cumulée à l'apoptose induite par TRAIL illustrent le potentiel d'une combothérapie telle que celle que nous avons envisagée avec nos pro-APLs et que nous allons développer en détail dans ce qui suit.

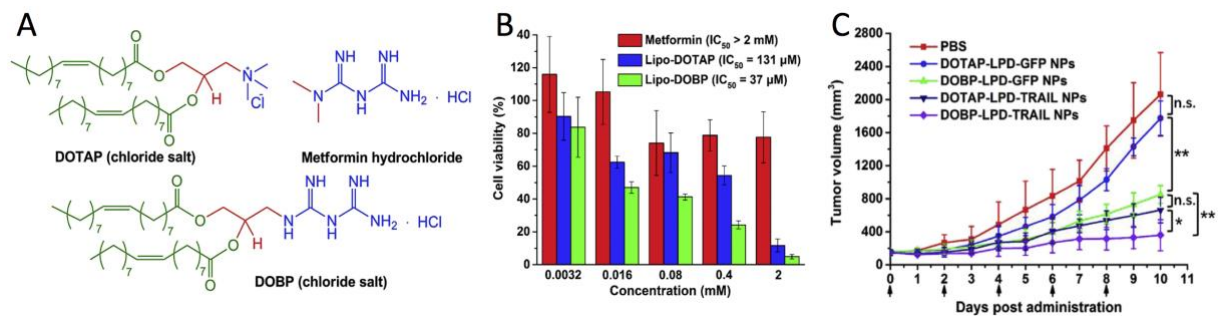


Figure 37. Structure du lipide cationique DOBP, un dérivé du DOTAP et de la metformine (A). Les liposomes de DOBP valorisent *in vitro* les effets de la metformine (B). La vectorisation d'un plasmide TRAIL et les effets antitumoraux du dérivé de metformine offrent d'excellents résultats *in vivo*, par rapports aux contrôles (C).²⁹⁰

Chapitre 2

-

Conception de prodrogues cationiques d'alkylphospholipides (pro-APLs)

I. Des APLs aux pro-APLs

Comme nous l'avons indiqué en fin de chapitre précédent, ce travail de doctorat est centré sur la conception de vecteurs de transfection de type lipides cationiques, biolabiles et construits à partir de la structure chimique des APLs. De tels composés qui constitueraient des prodrogues d'APLs (pro-APLs) devraient être susceptibles, à la fois, de vectoriser un acide nucléique thérapeutique (ADN codant TRAIL ou siARN anti survivine) et, sous l'action d'un stimulus hydrolytique, de démasquer les APLs parents qui pourraient alors exercer leur activité anti tumorale intrinsèque (Figure 38). L'approche que nous proposons de développer permettrait donc d'allier thérapie génique et chimiothérapie en utilisant une seule et même construction moléculaire. Celle-ci doit satisfaire certains critères qui sont essentiels au bon fonctionnement de la stratégie anti tumorale que nous envisageons. Ainsi, nous allons, dans un premier temps, définir un cahier des charges et présenter les différents éléments fondamentaux à considérer pour la conception de ces nouveaux actifs thérapeutiques. Nous passerons ensuite en revue les différentes options envisageables, puis nous discuterons en détail le design des cibles à synthétiser.

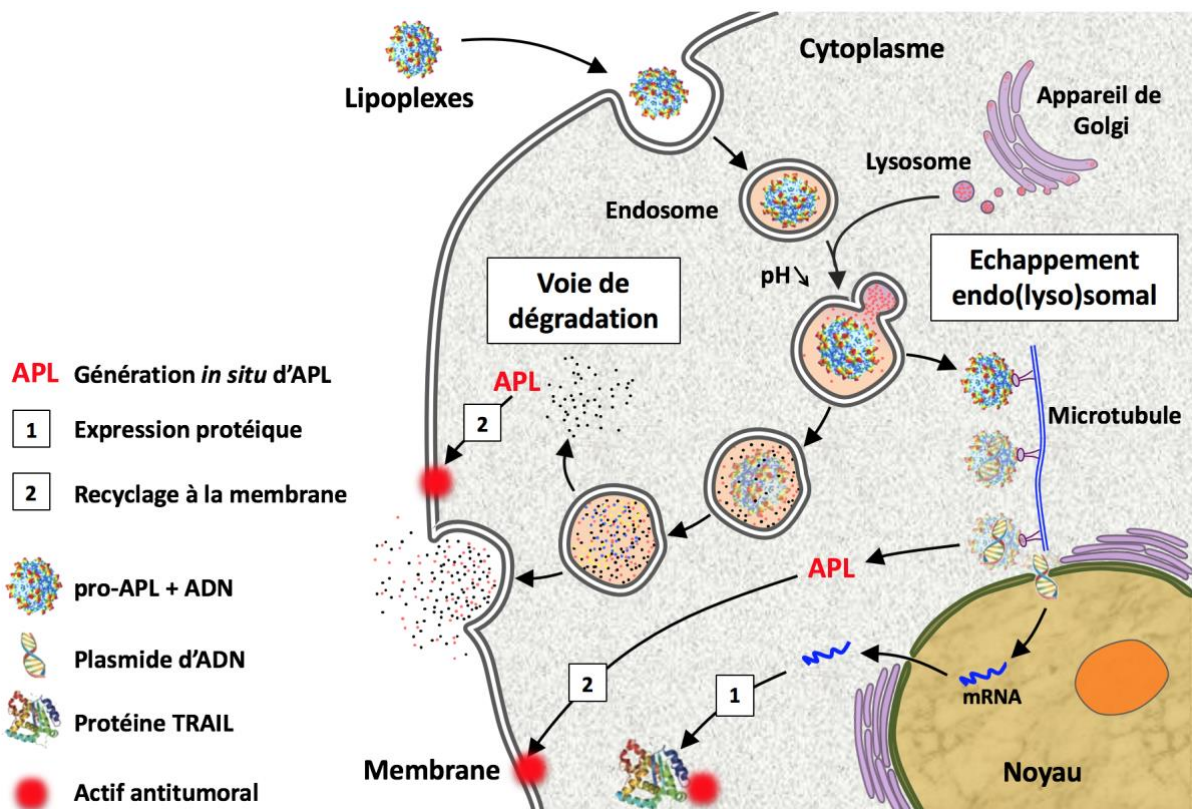


Figure 38. Illustration de la thérapie combinée envisagée à partir des pro-APLs, où ces derniers jouent à la fois le rôle de vecteur de gènes (ici un plasmide d'ADN) et de prodrogues d'APLs, ces derniers exerçant leur activité anti tumorale intrinsèque après leur recyclage à la membrane.

I.1. Cahier des charges

I.1.1. Caractère cationique des pro-APLs

Compte tenu de l'application visée, les composés pro-APLs doivent, en premier lieu, présenter la capacité de complexer et condenser les acides nucléiques, afin de permettre leur vectorisation. Ceci requiert donc que la structure chimique des pro-APLs soit cationique. En effet, nous avons vu dans la première partie de ce mémoire que les lipides cationiques sont de bons agents de transfert de gènes du fait de l'interaction électrostatique qui peut s'établir entre leur tête polaire chargée positivement et les phosphates anioniques des acides nucléiques. De plus, le caractère amphiphile des lipides cationiques leur confère des propriétés d'auto-assemblage qui sont de nature à induire la condensation de ces acides nucléiques en particules discrètes, *via* les interactions hydrophobes qui s'établissent entre les chaînes grasses présentes dans leur structure (cf. *Chapitre 1 - III.2.3.2 Les lipides cationiques*).

Afin de générer une structure cationique à partir d'un APL, il convient de neutraliser la charge anionique portée par le groupement phosphate et de casser ainsi le caractère zwitterionique de la molécule. Les structures pro-APLs seront donc du type phosphotriester (Figure 39). Cette modification chimique apportée aux APLs va avoir un impact sur leurs propriétés d'auto-assemblage et, notamment, sur leur CMC qui pourra être modulée en faisant varier la nature du groupement hydrophobe R.

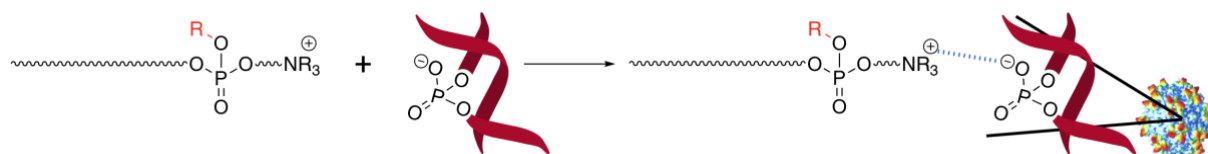


Figure 39. Les interactions électrostatiques entre le pro-APL et l'acide nucléique permettent la complexation de ce dernier, et les interactions hydrophobes entre les chaînes du lipide provoquent la condensation des complexes en particules discrètes (lipoplexes).

I.1.2. Caractère biolabile des pro-APLs

Selon notre hypothèse de travail, le design des pro-APLs doit être tel que le relargage des APLs parents pourra être déclenché lorsque les particules de transfection auront atteint leur cible cellulaire et seront soumises à un stimulus acide ou enzymatique, dans l'endosome ou le lyso-endosome. En conséquence, si plusieurs types de modifications chimiques peuvent être envisagées pour transformer des APLs en lipides cationiques, celles-ci doivent être réversibles pour rendre possible le relargage intracellulaire des APLs parents. Le clivage des pro-APLs constitue ainsi le signal déclencheur de deux événements importants et intimement liés, à savoir, le relargage des APLs parents et l'initiation de la décomplexation/décondensation de l'acide nucléique (Figure 40). Sous l'action de stimuli chimiques et/ou enzymatiques comme ceux rencontrés lors de la maturation endo-lysosomale, la prodrogue doit donc pouvoir être spécifiquement hydrolysée au niveau du lien phosphoester qui a

servi à modifier l'APL initial, de façon à conduire au relargage de ce dernier. Compte tenu de ses propriétés tensioactives intrinsèques, l'APL généré *in situ* pourrait, dans un premier temps, interagir avec la membrane de l'endosome et la déstabiliser, favorisant ainsi l'échappement endosomale du matériel endocyté. Dans un second temps, les mécanismes de recyclage des lipides à la membrane pourraient permettre à l'APL d'exercer son activité antitumorale intrinsèque, au niveau de la membrane plasmique (Figure 38). L'amplitude de ces différents effets devrait être *a priori* sous le contrôle de la cinétique d'hydrolyse des prodrogues, cinétique qui peut être modulée en fonction de la nature du lien phosphoester installé sur l'APL.

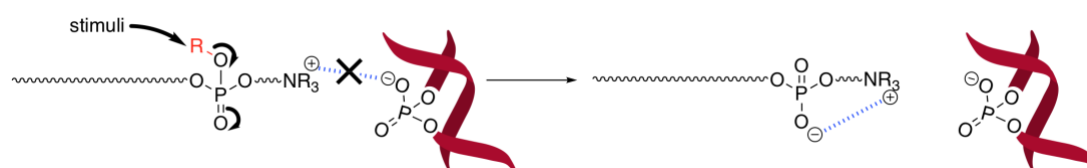


Figure 40. L'introduction de divers motifs clivables dans la structure des pro-APLs peut moduler la cinétique de libération des APLs et de décomplexation/décondensation de l'acide nucléique.

I.1.3. Caractère biocompatible des pro-APLs

Nous avons vu précédemment que les APLs sont des composés actifs qui présentent une toxicité gastro-intestinale importante et un caractère hémolytique marqué, rendant délicate leur utilisation pour des administrations par voie orale ou systémique (cf. *Chapitre 1 - II.1 APLs : de leur découverte aux applications cliniques*). Ces effets délétères pourraient être imputables, pour une partie au moins, à la CMC élevée des composés et à leur pouvoir de déstabilisation vis-à-vis des membranes. Le design des pro-APLs doit donc aussi viser à fournir, si possible, des composés qui pourront offrir une meilleure biocompatibilité que les APLs, en respectant mieux l'intégrité des membranes.

L'introduction d'une chaîne alkyle supplémentaire sur le squelette d'un APL va augmenter le caractère hydrophobe global de la molécule et doit, logiquement, conduire à un abaissement de sa CMC. En conséquence, outre le fait que le masquage transitoire de la charge négative d'un APL par introduction d'un motif hydrophobe permet de former un composé capable de complexer l'acide nucléique, il devrait également conduire à une molécule moins agressive pour les membranes et donc mieux tolérée par les cellules et l'organisme en général.

I.2. Prodrogues de phosphodiesters

Pour concevoir des prodrogues d'APLs qui respectent l'ensemble des critères évoqués ci-dessus, diverses stratégies sont envisageables et impliquent toutes des modifications visant à générer spécifiquement des phosphotriesters labiles (Figure 41).²⁹²⁻²⁹⁶

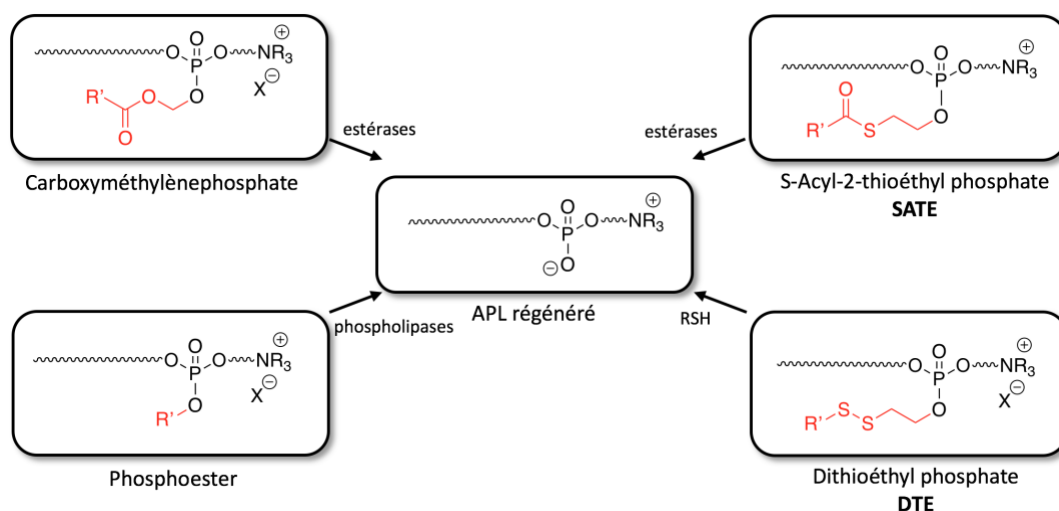


Figure 41. Les prodrogues de phosphate peuvent être conçues pour répondre à différents stimuli.

La stratégie impliquant des **carbonyloxyméthylènephosphates** constitue une première méthode dans le domaine des prodrogues de phosphates, car l'utilisation du motif phosphoacétal permet la régénération du phosphate initial sous l'action d'estérases (Figure 42). La fonction carbonyle impliquée dans cette stratégie peut faire partie d'un groupement ester ou carbonate, permettant d'introduire facilement divers groupes alkyles.^{297,298} La réaction de *O*-alkylation des phosphodiester par un ester de chloroalkyle ou un carbonate de chloroalkyle permet d'accéder à ce type de prodrogues.²⁹⁹ Les groupes oxyméthylpivaloyl (POM)³⁰⁰ et oxyméthyl isopropyl carbonate (POC) ont ainsi tous deux été employés pour préparer de nombreuses prodrogues de nucléosides et de nucléotides monophosphate utilisées pour le traitement des hépatites B et C par exemple.²⁹³

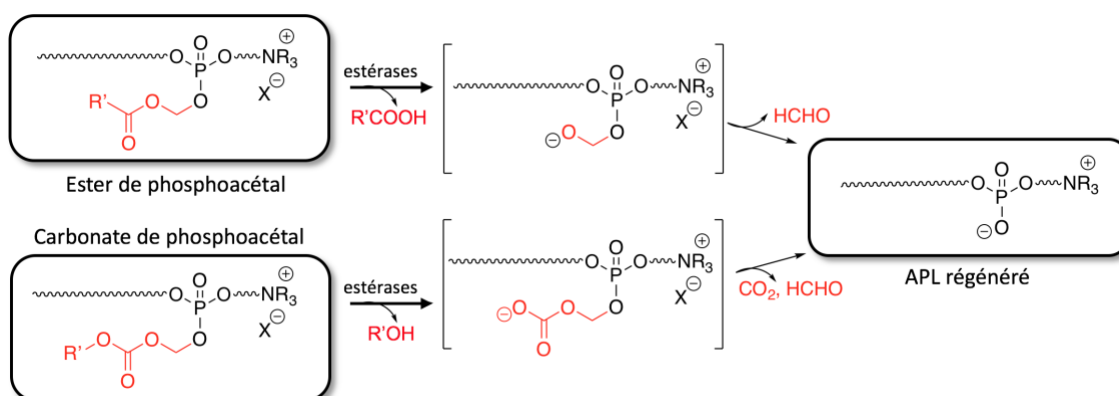


Figure 42. Quelle que soit la nature du motif carbonyle dans les carboxyméthylènephosphates, l'action d'estérases conduit au phosphodiester parent.

Notre équipe a acquis une certaine expérience dans la synthèse des phosphoacétals et a développé de nombreux phosphotriesters cationiques à partir de DOPC, un des constituants majeurs des membranes cellulaires. Ceux-ci ont justement été obtenus par attaque nucléophile du phosphate

de la DOPC sur un électrophile de type ester ou carbonate de 1-chloroalkyle. Ils constituent des "pro-DOPC" cationiques, clivables en milieu biologique, avec des propriétés en transfert de gènes tout à fait intéressantes, et ont fait l'objets d'un dépôt de brevet et de plusieurs publications.^{253,301–305}

Il est aussi envisageable de recourir à l'emploi de phosphotriesters comme prodrogues, par l'intermédiaire d'une liaison phosphoester additionnelle, comme dans le cas de prodrogues de phosphocholines.^{306,307} Hostetler décrit dans les années 1990 des phosphoesters d'hexadécyloxypropyle (HDP) ou d'octadécyloxyéthyle (ODE) comme prodrogues de phosphodiesters.³⁰⁸ Elles peuvent être obtenues par addition nucléophile d'une multitude d'alcools sur un chlorophosphate, ou par déplacement nucléophile d'halogénures^{309,310} ou de triflates par un phosphodiester.³¹¹ Cependant, la dégradation de cette liaison additionnelle est assurée par des phospholipases, au même titre que les autres liaisons phosphoesters présentes dans le composé, ce qui ne permet souvent pas de favoriser un clivage spécifique de la prodrogue (Figure 43).

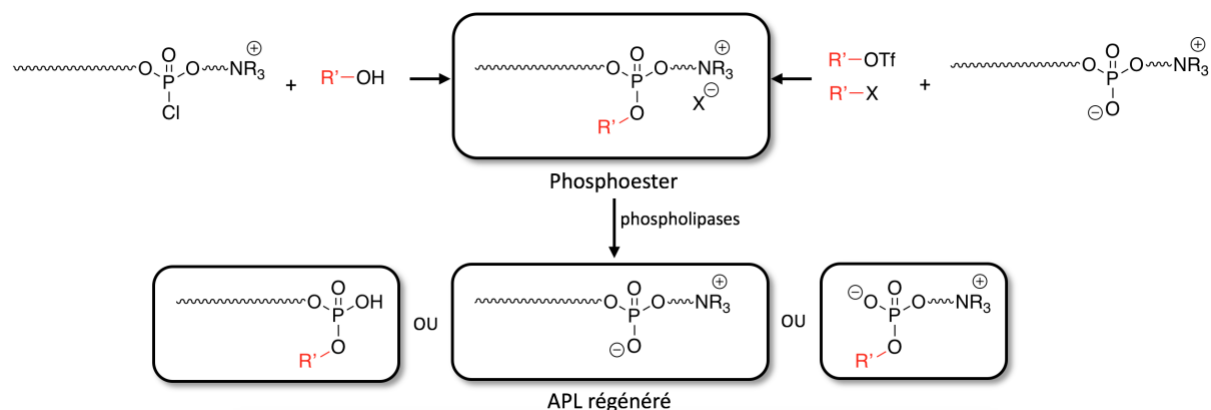


Figure 43. Les phosphotriesters sont une classe de prodrogues pouvant arborer toutes sortes de chaînes alkyles.

L'utilisation de substituants soufrés dans l'élaboration de prodrogues de phosphodiesters a été largement étudiée dans le domaine des nucléotides et oligonucléotides, notamment dans le cadre des stratégies **SATE** (*S-Acyl-2-ThioEthyl*) et **DTE** (*DiThioEthyl*) (Figure 44). Ces deux stratégies ont vu le jour au sein d'une équipe française dans les années 1990³¹² et font toutes deux intervenir la formation du motif 2-mercaptoéthylphosphotriester. En effet, la stratégie **SATE** implique les estérases du milieu biologique pour démasquer, dans un premier temps, un groupement thiol qui, par réaction intramoléculaire, conduit à une élimination d'épissulfure avec régénération du phosphodiester initial. En ce qui concerne la stratégie **DTE**, c'est la rupture d'un pont disulfure dans le milieu intracellulaire réducteur qui entraîne la formation d'un thiol qui conduit à l'élimination de la molécule d'épissulfure.³¹³ Toutefois, le relargage de ce sous-produit passablement toxique constitue un frein au développement clinique de ce type de prodrogues. Du point de vue synthétique, celles-ci peuvent être obtenues, par exemple, par addition nucléophile d'alcools sur un chlorophosphate, ces alcools incorporant le motif dithioéthanol ou *S*-acylthioéthanol.^{314,315}

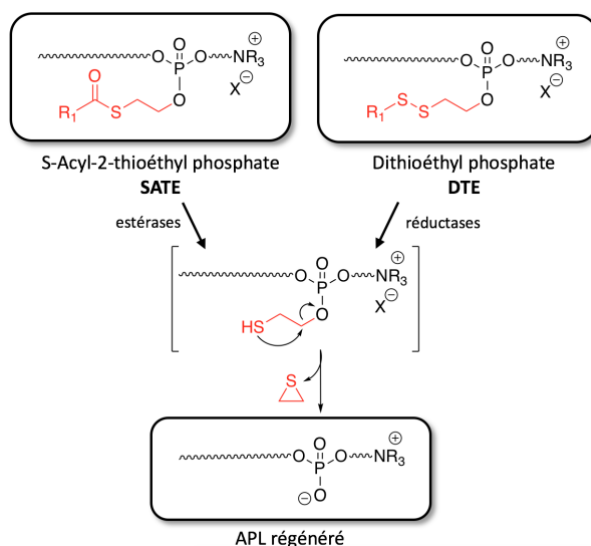


Figure 44. Le démasquage d'un thiol par des estérasés ou des réductases mène au phosphodiester parent dans les stratégies SATE et DTE.

I.3. Design des pro-APLs

I.3.1. Stratégie générale

Compte tenu des propriétés recherchées pour les pro-APLs (*vide supra*), nous avons décidé d'élaborer ces composés par *O*-alkylation des APLs, en capitalisant sur les travaux menés précédemment au laboratoire.^{253,301–305}

Les structures qui ont été envisagées sont donc des phosphoacétals mixtes d'esters et de carbonates (Figure 45). Les liens ester et carbonate ont été sélectionnés afin de permettre une modulation de la stabilité hydrolytique des pro-APLs. C'est également l'objectif de l'introduction d'un substituant R' sur le pont acétal, dont la lipophilie résultante pourra moduler l'approche des espèces hydrophiles (H⁺, OH⁻, H₂O) impliquées dans l'hydrolyse. Enfin, la variation du groupement R est censée moduler la balance hydrophile/hydrophobe des composés et avoir un impact sur leurs propriétés d'auto-assemblage et, par voie de conséquence, sur la valeur de leur CMC et sur leur toxicité. Afin d'introduire de la diversité dans les composés, ce substituant R peut être une chaîne alkyle plus ou moins longue, avec ou non présence d'une insaturation. La modification de ces trois paramètres permet de générer aisément un échantillon large de composés. Par ailleurs, les différentes combinaisons possibles peuvent être déclinées pour tous les APLs et nous allons tout de suite détailler les composés que nous avons sélectionnés pour notre travail.

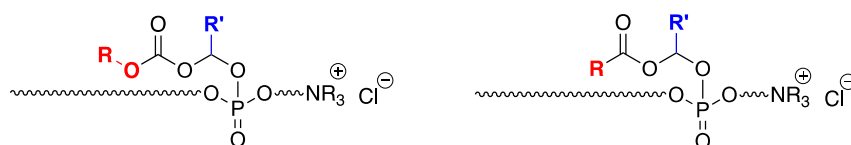


Figure 45. Structure générale des pro-APLs en série phosphoacétal de carbonate et phosphoacétal d'ester.

I.3.2. Choix des APLs

Parmi les différents APLs qui ont été introduits dans le précédent chapitre, nous en avons sélectionné trois pour évaluer nos hypothèses de travail : la miltéfosine **1**, la périfosine **2** et l'érufosine **3** (Figure 46). Ces APLs ont été choisis car ils présentent une certaine diversité de structure et sont les plus prometteurs à ce jour, en termes d'utilisation en clinique (cf. *Chapitre 1 - II.1 APLs : de leur découverte aux applications cliniques*).

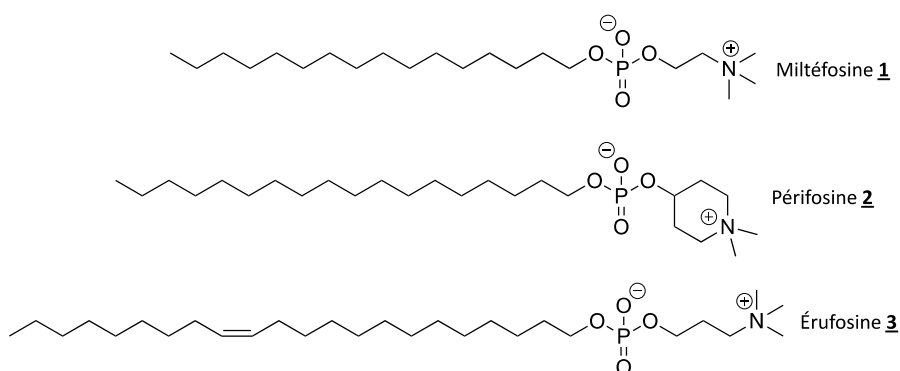


Figure 46. Structure des trois APLs sélectionnés pour élaborer les pro-APLs.

La miltéfosine et l'érufosine possèdent une tête polaire aliphatique linéaire tandis que la périfosine arbore une tête polaire cyclique plus contrainte. Par ailleurs, si les deux premiers APLs portent le même groupement triméthylammonium (NMe_3^+), ils se distinguent par la distance qui sépare celui-ci du phosphate. Dans le cas de la miltéfosine, 2 atomes de carbones séparent le phosphate de l'ammonium, c'est une choline, alors que dans le cas de l'érufosine, nous avons une homocholine avec trois atomes de carbone. En outre, les chaînes grasses des trois APLs sont différentes, puisque la miltéfosine et la périfosine possèdent toutes deux une chaîne saturée en C_{16} et C_{18} , respectivement, alors que l'érufosine possède une chaîne plus longue, comprenant 22 atomes de carbone et une insaturation en son milieu (13-*cis*). Celle-ci confère à la molécule une certaine flexibilité par rapport aux APLs à chaîne saturée et qui peut se traduire par des propriétés d'auto-assemblage particulières (CMC plus faible).

I.4. Cibles, nomenclature et rétrosynthèse

Compte tenu de ce qui précède, nous avons déterminé trois familles de cibles, qui seront nommées pro-miltéfosines, pro-érufosines et pro-périfosines (Figure 47). Nous avons, dans un premier temps, envisagé deux substituants R distincts, une chaîne dodécyle ($n\text{C}_{12}$) et une chaîne oléyle ($\text{C}_{18:1}$), et la présence ou non d'un groupe méthyle sur l'acétal ($\text{R}' = \text{H}$ ou Me), ainsi qu'une connexion par un lien ester ou carbonate d'acétal. Considérant ces trois paramètres, il y a huit combinaisons structurales possibles pour chaque série de pro-APL. Un neuvième composé résulte de l'introduction directe d'une chaîne dodécyle sur le phosphate de l'APL, sans motif biolabile

(acétal d'ester ou de carbonate) intermédiaire, ce qui conduit à un phosphotriester simple, *a priori* plus robuste. Ceci devrait donc nous fournir 27 pro-APLs. Cependant, pour des raisons qui seront exposées plus loin, seuls cinq pro-pérfosines sur les neuf initialement prévues ont pu être préparées.

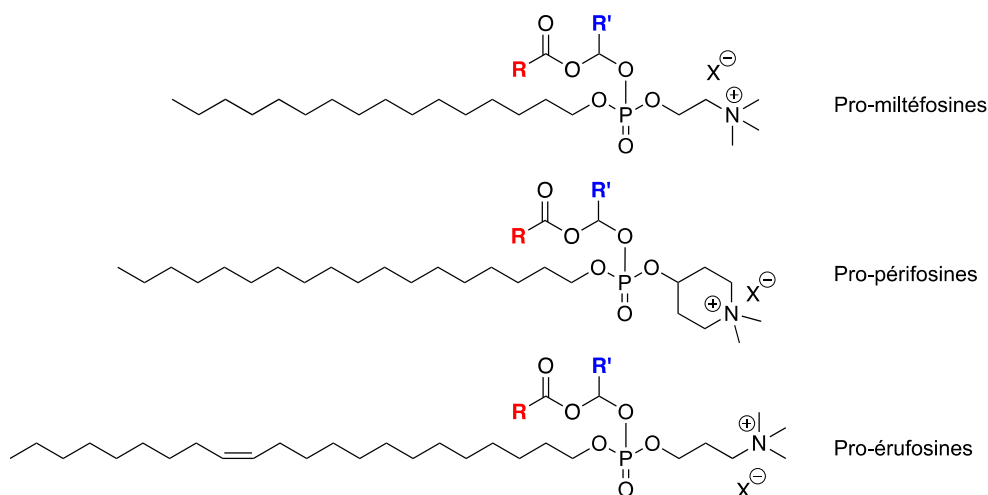


Figure 47. Structure générale des pro-APLs, où les deux groupement R et R' permettent d'introduire de la diversité structurale et de moduler ainsi les propriétés d'auto-assemblage et la stabilité hydrolytique ou métabolique des vecteurs. (R = $n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$, $n\text{-cis-C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CHC}_7\text{H}_{14}$, $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}$, $n\text{-cis-C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CHC}_8\text{H}_{16}\text{O}$; R' = H, Me)

Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, nous avons mis en place une nomenclature spécifique qui permet d'identifier rapidement les structures dont il est question dans le texte (Figure 48). La dénomination des composés pro-APLs développés ici est ainsi codée sous la forme X_{Yn} où :

- X se réfère à l'APL parent : miltéfossine (X = M), érufossine (X = E) et pérfossine (X = P) ;
- Y indique la présence d'un lien ester (Y = E ou E') ou carbonate (Y = C ou C') d'acétal entre la chaîne grasse et le phosphate, l'altération (') indiquant, quant à elle, la présence d'un substituant méthyl (R' = Me) sur le pont acétal ;
- n précise la longueur de la chaîne grasse introduite sur le phosphate (n = 12, chaîne *n*-docécyle ; n = 18:1, chaîne oléyle).

Quelques exemples sont donnés ci-dessous pour que le lecteur se familiarise avec cette notation.

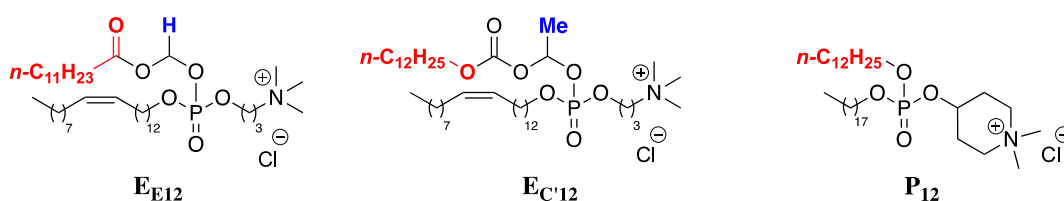


Figure 48. Nomenclature simplifiée des pro-APLs avec trois exemples en série "érufossine" et "pérfossine".

Les composés pro-APLs **4** à **26** ont été obtenus en utilisant une voie de synthèse commune impliquant une attaque nucléophile de l'APL parent sur un agent électrophile de type 1-chloroalkyl ester (**27** à **30**), 1-chloroalkyl carbonate (**31** à **34**), ou 1-alkyl triflate **35** (Figure 49 et Tableau 1).³⁰²

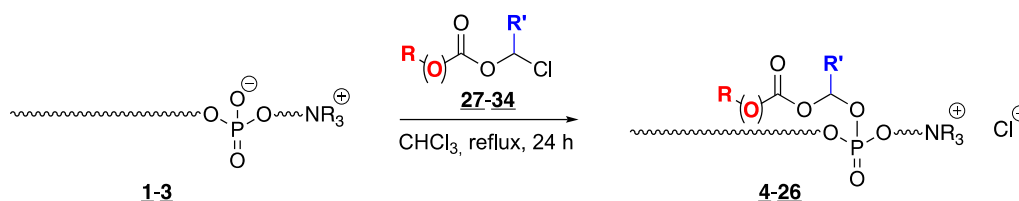


Figure 49. Voie de synthèse commune pour la formation de pro-APLs en série phosphoacétal d'ester et de carbonate, d'après les travaux antérieurs menés au laboratoire sur la réaction de *O*-alkylation de phosphates.

Tableau 1. Récapitulatif de la première série de pro-APLs synthétisés.

Pro-APL		Structure		Électrophile utilisé
Nomenclature	Référence	R	R'	
Pro-miltéfosines				
M _E 12	4	C ₁₁ H ₂₃	H	27
M _{E'} 12	5	C ₁₁ H ₂₃	Me	28
M _C 12	6	C ₁₂ H ₂₅ O	H	31
M _{C'} 12	7	C ₁₂ H ₂₅ O	Me	32
M _E 18:1	8	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	H	29
M _{E'} 18:1	9	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	Me	30
M _C 18:1	10	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆ O	H	33
M _{C'} 18:1	11	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆ O	Me	34
M ₁₂ *	12	C ₁₂ H ₂₅	–	35
Pro-pérfosines				
P _E 12	13	C ₁₁ H ₂₃	H	27
P _C 12	14	C ₁₂ H ₂₅ O	H	31
P _{C'} 12	15	C ₁₂ H ₂₅ O	Me	32
P _C 18:1	16	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆ O	H	33
P ₁₂ *	17	C ₁₂ H ₂₅	–	35
Pro-érufosines				
E _E 12	18	C ₁₁ H ₂₃	H	27
E _{E'} 12	19	C ₁₁ H ₂₃	Me	28
E _C 12	20	C ₁₂ H ₂₅ O	H	31
E _{C'} 12	21	C ₁₂ H ₂₅ O	Me	32
E _E 18:1	22	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	H	29
E _{E'} 18:1	23	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	Me	30
E _C 18:1	24	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆ O	H	33
E _{C'} 18:1	25	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆ O	Me	34
E ₁₂ *	26	C ₁₂ H ₂₅	–	35

* Phosphotriester simple obtenu à partir du triflate de *n*-dodécyle **35**.

Après évaluation des premiers composés décrits ci-dessus dans des expériences de transfection (cf. *Chapitre 3 – II. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection d'ADN*), nous avons retenu les constructions offrant les meilleurs résultats (les esters de phosphoacétal avec un pont non substitué) pour tenter d'optimiser les propriétés des pro-APLs et, notamment, étudier de façon plus fine l'influence du groupe R sur celles-ci. Nous avons donc préparé une nouvelle série de pro-APLs

dans laquelle le substituant R a été modulé de façon plus large, comportant de 2 à 18 atomes de carbone, avec ou non présence d'une insaturation. Pour des raisons de commodité de synthèse, ces modifications ont été étudiées uniquement en série pro-érufosine, cet APL ayant présenté la plus forte réactivité dans la réaction de *O*-alkylation du phosphate.

En complément des composés E_{E12} (**18**) et E_{E18:1} (**22**), nous avons donc généré une série de sept nouveaux composés : E_{E2} (**36**), E_{E6} (**37**), E_{E8} (**38**), E_{E10} (**39**), E_{E14} (**40**), E_{E16} (**41**), et E_{E18} (**42**). Ces composés ont été obtenus selon la même méthode que précédemment, à partir des esters de 1-chloroalkyle **43** à **49** (Tableau 2).

Tableau 2. Récapitulatif de la seconde série de pro-APLs synthétisés.

Pro-APL		Structure		Électrophile utilisé
Nomenclature	Référence	R	R'	
Pro-érufosines				
E _{E2}	36	CH ₃	H	43
E _{E6}	37	C ₅ H ₁₁	H	44
E _{E8}	38	C ₇ H ₁₅	H	45
E _{E10}	39	C ₉ H ₁₉	H	46
E _{E14}	40	C ₁₃ H ₂₇	H	47
E _{E16}	41	C ₁₅ H ₃₁	H	48
E _{E18}	42	C ₁₈ H ₃₇	H	49

I.5. Pro-APLs de II^{ème} génération

Au cours de notre travail et au fur et à mesure des évaluations biologiques des pro-APLs, notre curiosité nous a amenés à développer des structures pro-APLs plus élaborées, plus spécifiquement en série pro-érufosine, pour tester diverses hypothèses quant à leur action *in vitro* et tenter d'obtenir un gain en termes d'efficacité de transfection. En particulier, nous avons développé des conjugués de l'érufosine avec le détergent dodécyltétraglycol (DTG, tétraéthylèneglycol monododécyl éther ou C₁₂E₄), des pro-érufosines tricaténaires, ainsi que des structures bolaphiles.

I.5.1. Conjugués érufosine-DTG

L'intérêt particulier que nous voyions dans ce type de composés est qu'ils sont en mesure de relarguer *in situ* une molécule de détergent lorsqu'ils sont soumis à des conditions d'hydrolyse, chimique ou enzymatique. Le DTG est un détergent non ionique capable de déstabiliser les membranes et, donc, susceptible de favoriser l'échappement endosomal et d'améliorer l'efficacité de transfection. Son utilisation dans l'élaboration de vecteurs de transfert de gènes a déjà été rapportée par le laboratoire.^{304,305} Nous avons donc développé deux pro-érufosines qui intègrent le motif DTG (Figure 50). Le premier composé, E_{C-DTG} (**50**), est un phosphoacétal de carbonate et le second, E_{DTG} (**51**), est un phosphotriester simple qui ne présente pas de site spécifique de clivage.

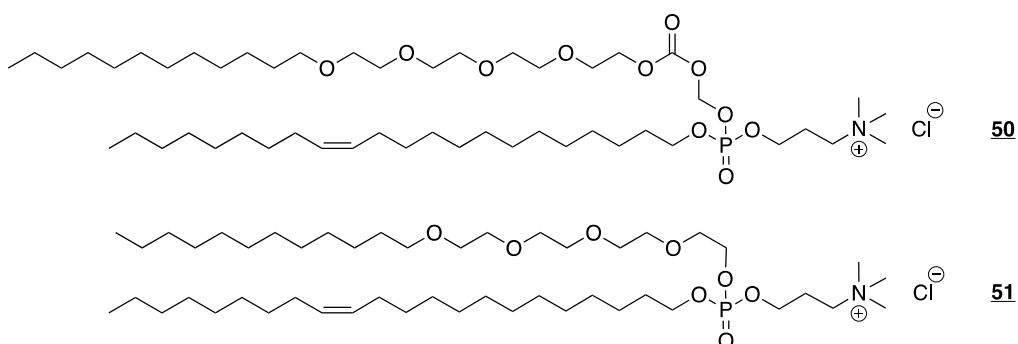


Figure 50. Structure chimique des deux pro-érufosine incorporant le motif DTG, E_{C-DTG} (**50**) et E_{DTG} (**51**).

Ces deux composés ont été respectivement obtenus par réaction de l'érufosine sur le chlorométhyle carbonate de DTG **52** et sur le triflate de DTG **53** (Figure 51).

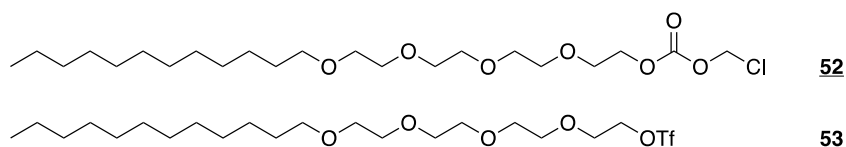


Figure 51. Structure chimique des électrophiles utilisés pour préparer les pro-érufosines incorporant le motif DTG.

I.5.2. Pro-érufosines « tricaténaires »

Tous les vecteurs de transfert de gènes préalablement développés au laboratoire et incorporant un lien phosphoacétal étaient construits par *O*-alkylation du phosphate libre de la DOPC. Leur structure comporte ainsi trois chaînes grasses –ils sont dits tricaténaires– ce qui conditionne des propriétés d'auto assemblage particulières qui se sont avérées particulièrement bénéfiques dans le cadre d'applications en transfection d'ADN ou de siARN.³⁰² Face aux problèmes rencontrés dans nos expériences de vectorisation de siARN (cf. *Chapitre 3 – I. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection de siARN*), nous avons été amenés à envisager le développement d'un pro-APL tricaténaire (Figure 52).

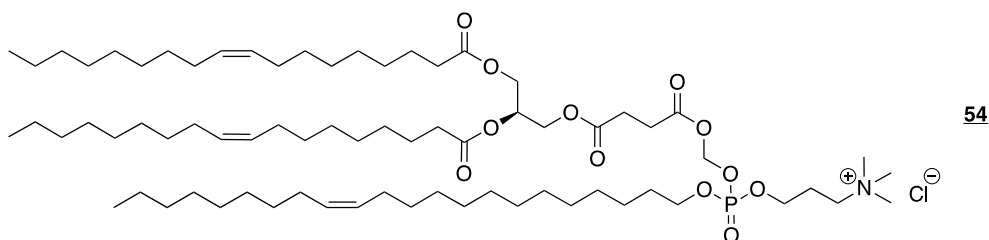


Figure 52. Structure du pro-érufosine tricaténaire E_{Tri} (**54**).

Ce pro-APL tricaténaire a été développé en série pro-érufosine uniquement, par réaction de l'APL avec un chlorométhyl succinate de diglycéride **55** (Figure 53).

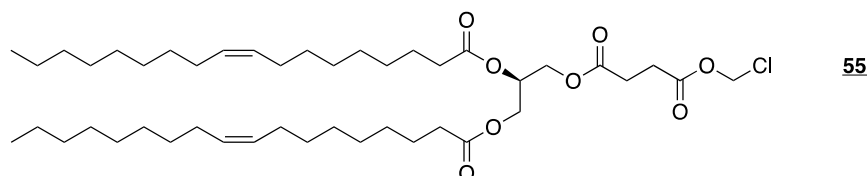


Figure 53. L'électrophile **55**, utilisé pour la préparation du pro-érufosine E_{Tri} (**54**), intègre le motif glycérol comme point d'ancrage des deux chaînes oléyles et du bras espaceur succinate de chlorométhyle.

I.5.3. Pro-APLs geminis

Les composés pro-APLs que nous avons présentés jusqu'ici sont tous bi- ou tricaténaires, une de nos hypothèses de travail étant que l'introduction d'un motif hydrophobe sur le groupe phosphate d'un APL a pour conséquence de diminuer la CMC de la molécule et, donc, sa toxicité. Il est également possible de travailler sur le même concept en envisageant la dimérisation des APLs. De telles structures tombent sous l'appellation de détergents geminis ou bolaamphiphiles (bolaphiles).^{316,317} Dans cet ordre d'idée, nous avons donc imaginé trois nouvelles structures de pro-érufosine, **56**, **57** et **58**, en préservant la présence d'un lien biolabile de type phosphoacétal d'ester (Figure 54).

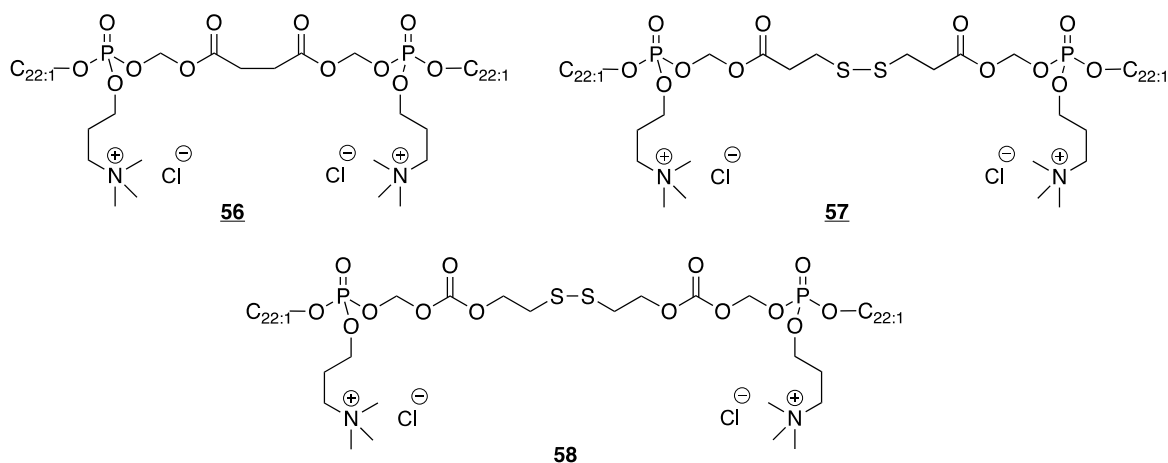


Figure 54. Structures des diverses pro-érufosines geminis envisagées dans le cadre de ce travail de thèse.

Afin d'augmenter la biodégradabilité du vecteur et moduler la cinétique de décomplexation/décondensation de l'acide nucléique, nous avons également introduit, dans deux de ces constructions (**57** et **58**), un pont disulfure susceptible d'être clivé par le milieu réducteur intracellulaire. Dans ces deux cas, la réduction du disulfure peut donner lieu à une attaque du thiol formé sur un des centres électrophiles de la molécule, conduisant à la formation de 1,3-oxathian-6-one, d'épisulfure, de 1,3-oxathiolan-2-one, ou de 1,3,5-dioxathiepan-2-one, avec relargage d'érufosine (Figure 55). Ce mécanisme rappelle, dans une certaine mesure, ceux mis en œuvre dans la métabolisation des prodrogues de type SATE et DTE, présentés au début de ce chapitre.

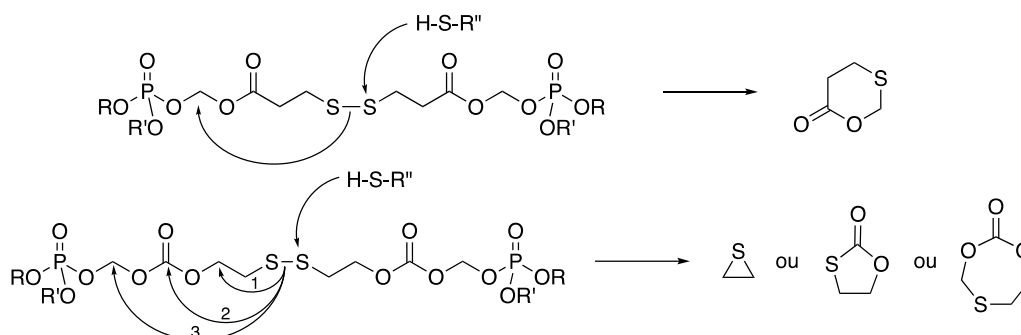


Figure 55. Diverses voies de dégradation possibles, toutes induites par la rupture du pont disulfure.

La synthèse de ces composés geminis a nécessité la préparation des électrophiles homobifonctionnels **59**, **60** et **61** (Figure 56). Ceux-ci ont été obtenus par les mêmes méthodes que celles utilisées pour accéder aux électrophiles monofonctionnels.

Cependant, compte tenu 1-du rendement généralement modeste de l'attaque d'un APL sur un ester de chlorométhyle ou un carbonate de chlorométhyle et 2-de la formation de nombreux produits secondaires, il a été très difficile d'isoler, voire d'identifier, les composés geminis attendus. Ainsi, seul le composé **58**, noté E_{Gem}, a pu être obtenu de façon satisfaisante (cf. *Chapitre 2 - II.3.4.1 Cas des pro-érufosines geminis*).

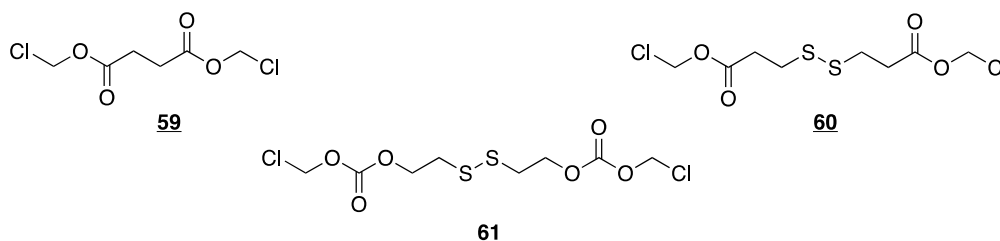


Figure 56. Structure des électrophiles homobifonctionnels synthétisés pour la préparation des pro-APLs geminis.

II. Synthèse des vecteurs

Après avoir présenté les différentes cibles envisagées, nous allons maintenant décrire leur synthèse. Tout d'abord, nous détaillerons la synthèse des trois APLs qui sont au cœur du projet. Ensuite, nous présenterons la synthèse des différents réactifs électrophiles nécessaires à la fabrication des pro-APLs et nous terminerons par la réaction d'*O*-alkylation des APLs qui mène aux pro-APLs.

II.1. Synthèse des APLs

La préparation des trois APLs (miltéfosine, périfosine et érufosine) constitue la première étape de notre stratégie de synthèse de pro-APLs. Ces composés sont obtenus à partir de divers produits commerciaux facilement accessibles.

II.1.1. Miltéfosine

La synthèse de la miltéfosine peut être mise en œuvre en utilisant diverses stratégies décrites dans la littérature impliquant la *N*-méthylation de l'hexadécyle phosphoéthanolamine,⁴⁹ la réaction successive de l'hexadécanol et de la choline avec l'oxychlorure de phosphore,³¹⁸ celle de l'hexadécanol et du bromoéthanol avec l'oxychlorure de phosphore, suivi du déplacement nucléophile de l'halogène par la triméthylamine,³¹⁹ ou encore l'ouverture d'un dioxaphospholane cyclique par la triméthylamine.³²⁰ Nous avons choisi de la préparer en deux étapes (Figure 57). La première correspond à la réaction successive de l'hexadécanol, puis du bromoéthanol, avec l'oxychlorure de phosphore en conditions basiques. Une chromatographie sur gel de silice permet d'isoler l'intermédiaire bromé **62**. Ensuite, le déplacement nucléophile de l'atome de brome est efficacement réalisé par la triméthylamine en solution aqueuse, dans un mélange CHCl₃/CH₃CN/*i*PrOH,³¹⁹ et conduit à la miltéfosine **1**.

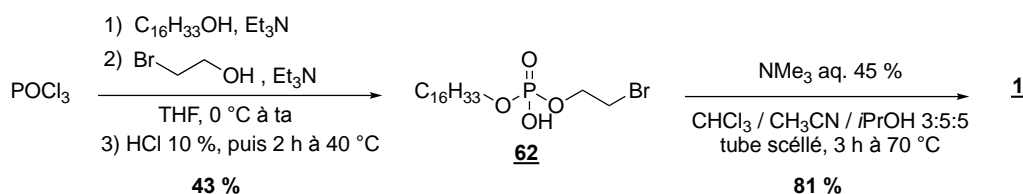


Figure 57. Voie de synthèse employée pour la préparation de la miltéfosine **1**.

II.1.2. Périfosine

Bien que la périfosine soit mentionnée dans de très nombreuses publications, nous n'avons trouvé aucune description détaillée de sa synthèse. Nous avons donc, dans un premier temps, envisagé de la préparer par additions nucléophiles de 1-octadécanol et de *N*-méthylpiperidin-4-ol sur l'oxychlorure de phosphore, suivies d'une méthylation de l'amine tertiaire.³²¹ Toutefois, le produit désiré n'a jamais pu être convenablement séparé des sous-produits et produits secondaires formés. Une autre voie de synthèse a donc été utilisée, passant par la préparation préalable du tosylate de *N,N*-diméthyl-4-hydroxypiperidinium **63**, obtenu par réaction de la *N*-méthyl-4-hydroxypiperidine avec le tosylate de méthyle (Figure 58). L'addition d'octadécanol sur le trichlorure de phosphoryle en présence de triéthylamine, puis celle de l'alcool **63**, fournit la périfosine **2**, après décomposition du milieu réactionnel par l'eau en condition acide et purification sur gel de silice (CHCl₃/MeOH/NH₄OH 10:6:1), avec un rendement global de 16 %.

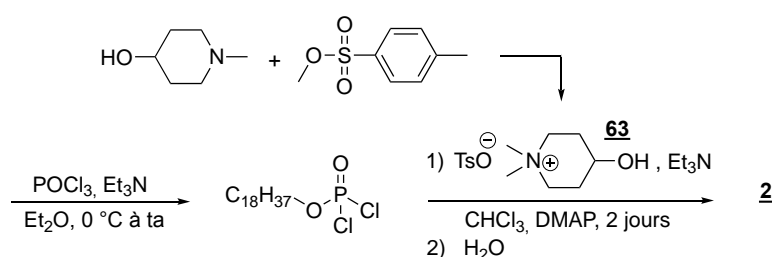


Figure 58. Voie de synthèse utilisée pour la préparation de la périfosine **2**.

II.1.3. Érufosine

L'érufosine présentant une structure chimique similaire à celle de la miltéfosine, sa synthèse a initialement été tentée de la même manière, à savoir par substitutions nucléophiles successives d'alcool érucique et de 3-bromopropan-1-ol sur l'oxychlorure de phosphore, suivies du déplacement du bromure par la triméthylamine. Mais le rendement médiocre et les problèmes de purifications rencontrés lors de la préparation de l'intermédiaire bromé nous ont orientés vers une autre voie, impliquant la formation d'un intermédiaire phosphodiester cyclique (Figure 59).³²² Cette synthèse débute donc par la réduction de l'acide érucique en alcool correspondant **64**.³²³ Elle a été réalisée par l'hydruure d'aluminium et de lithium, à l'échelle d'une dizaine de grammes. L'alcool est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile sur le trichlorure de phosphoryle dans des conditions similaires à celles précédemment décrites, suivi de propane-1,3-diol, pour conduire au phosphotriester cyclique **65**, dont la polarité facilite l'étape de purification par rapport à la précédente tentative de synthèse. L'utilisation de la triméthylamine en solution aqueuse assure l'ouverture du cycle et mène à l'érufosine **3**.³²⁰ Le rendement global est de 29 % sur les 3 étapes.

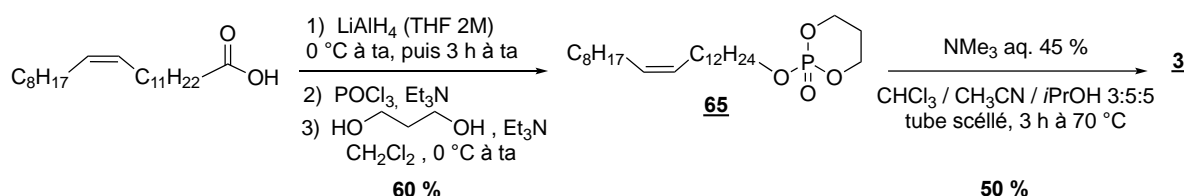


Figure 59. Voie de synthèse employée pour préparer l'érufosine **3**.

De manière générale, et bien que leurs synthèses ne soient pas inédites, les trois APLs se sont révélés relativement difficiles d'accès, avec des étapes de purification délicates, ce qui justifie probablement en partie les prix élevés pratiqués par les fournisseurs (miltéfosine : 160 € les 100 mg ; périfosine : 400 € les 50 mg). Nous avons néanmoins pu les préparer en suffisamment grande quantité (> 3 g) pour permettre la préparation des différents pro-APLs envisagés.

II.2. Synthèse des électrophiles

II.2.1. Esters de 1-chloroalkyle

La littérature rapporte de nombreuses voies de préparation d'esters, un peu moins pour les esters 1-chloroalkyle. En ce qui nous concerne, nous souhaitons utiliser une méthode qui permette d'introduire aisément une certaine diversité structurale, au niveau de la longueur de la chaîne alkyle et de la substitution au pied du chlorure (Figure 60).

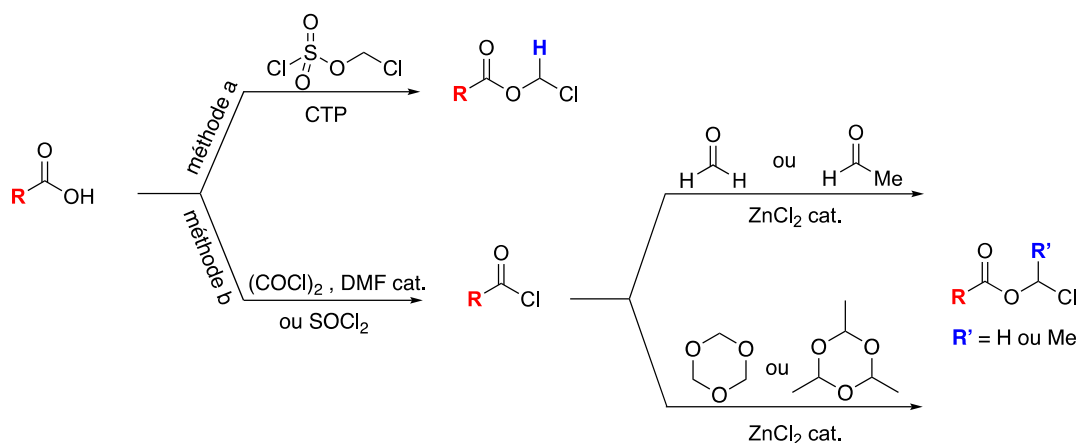


Figure 60. Les esters de chloroalkyle peuvent être obtenus par alkylation de carboxylates ou par condensation d'un aldéhyde avec un chlorure d'acide.

La condensation d'un acide carboxylique et d'un alcool est sans doute la méthode la plus employée pour former des esters. Cependant, pour accéder aux esters de 1-chloroalkyle, l'utilisation de réactifs comme le chlorométhanol ou le 1-chloroéthanol est difficilement envisageable car les halohydrines de départ sont des composés instables et difficiles à préparer.³²⁴

La conversion directe d'un acide en ester de 1-chlorométhyle peut, par contre, être facilement réalisée à l'aide de chlorosulfate de chlorométhyle,³²⁵ selon une réaction décrite par Hansen en 1984 (Figure 60, méthode a).³²⁶ En plus d'une cinétique de réaction assez rapide, le recours à cette réaction permet habituellement de se passer d'une étape de purification fastidieuse, en réalisant un simple lavage à l'eau du milieu réactionnel pour éliminer le catalyseur de transfert de phase (CTP). Cependant, le chlorosulfate de chlorométhyle est un réactif relativement onéreux (environ 50 € le gramme) et ses homologues supérieurs (chlorosulfates de 1-chloroalkyle) sont difficiles d'accès.

D'autres méthodes ont été développées qui permettent d'accéder indifféremment à des esters de 1-chlorométhyle et à leurs homologues supérieurs, notamment aux esters de 1-chloroéthyle que nous recherchons (Figure 60, méthode b). La condensation des chlorures d'acyle avec les aldéhydes, réaction étudiée de longue date, constitue une bonne alternative pour la préparation de nos électrophiles. En effet, l'emploi de formaldéhyde ou d'acétaldéhyde dans cette réaction conduit à la formation des esters de 1-chloroéthyle et de 1-chloroéthyle, respectivement. Par ailleurs, Adams relate dans les années 1920 l'utilisation de quantités catalytiques de chlorure de zinc pour améliorer cette réaction.³²⁷ Depuis, cette réaction de condensation a été mise en œuvre à de très nombreuses reprises, avec différents acides de Lewis (ZnCl₂, Zn(OTf)₂, SnCl₄...) pour préparer des esters de 1-chloroalkyle, offrant de bons rendements et la possibilité de travailler à l'échelle de plusieurs grammes.²⁹⁸ Elle a également été développée avec des équivalents synthétiques des aldéhydes inférieurs, trioxane ou de triméthyltrioxane (paraformaldéhyde).³²⁸

Les esters de chloroalkyle **27** à **30** et **43** à **49** ont donc été obtenus à partir de divers chlorures d'acide et de formaldéhyde ou d'acétaldéhyde, à basse température et en présence d'une quantité catalytique de chlorure de zinc. Cette méthode robuste nous a permis de préparer onze produits, avec de bons rendements (de 27 % à 90 %) et à l'échelle de plusieurs grammes (Tableau 3). Ces composés ont tous été purifiés par chromatographie sur gel de silice.

Tableau 3. Préparation des électrophiles de type ester de 1-chloroalkyle.

Nomenclature	Référence	R	R'	Rendement (%)
E12-Cl	27	C ₁₁ H ₂₃	H	71
E'12-Cl	28	C ₁₁ H ₂₃	Me	42
E18:1-Cl	29	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	H	58
E'18:1-Cl	30	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₇ H ₁₄	Me	27
E2-Cl	43	C ₁ H ₃	H	90
E6-Cl	44	C ₅ H ₁₁	H	71
E8-Cl	45	C ₇ H ₁₅	H	82
E10-Cl	46	C ₉ H ₁₉	H	80
E14-Cl	47	C ₁₃ H ₂₇	H	68
E16-Cl	48	C ₁₅ H ₃₁	H	71
E18-Cl	49	C ₁₇ H ₃₅	H	76

II.2.2. Carbonates de 1-chloroalkyle

Dans le même esprit que pour la synthèse des esters de chloroalkyle, les carbonates de chloroalkyle doivent pouvoir être préparés par une méthode modulable et les stratégies disponibles sont similaires aux précédentes (Figure 61).

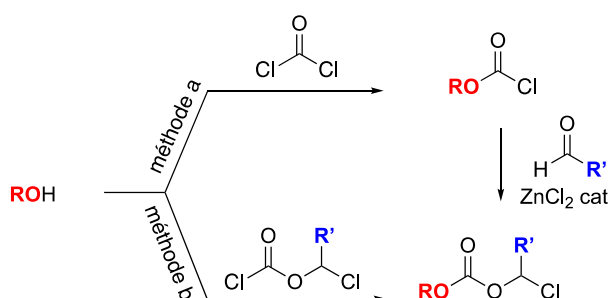


Figure 61. Les carbonates de 1-chloroalkyle peuvent être obtenus à partir d'alcools de manière directe ou indirecte.

La réaction de chloroformates, et non plus des chlorures d'acides, avec le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde permet d'accéder aux carbonates de chloroalkyle correspondants (Figure 61, méthode a).³²⁹ Toutefois ceci nécessite la préparation des chloroformates d'alkyle intermédiaires. Ils peuvent être synthétisés par réaction d'un alcool avec le phosgène ou un dérivé, ce qui peut être contraignant. Une autre possibilité consiste à réaliser l'acylation directe de l'alcool par le chloroformate de chlorométhyle ou de 1-chloroéthyle, tous deux commerciaux (Figure 61, méthode b).³³⁰

Ainsi, les différents carbonates de chloroalkyle nécessaires à nos synthèses de pro-APLs (**31**-**34** et **52**) ont été préparés par acylation d'alcools commerciaux par des chloroformates de chloroalkyle, en conditions basiques, avec des rendements allant de 56 % à 97 %, après purification par chromatographie sur silice (Tableau 4).³³⁰

Tableau 4. Préparation des électrophiles de type carbonate de 1-chloroalkyle.

Nomenclature	Référence	R	R'	Rendement (%)
C12-Cl	31	C ₁₂ H ₂₅	H	58
C'12-Cl	32	C ₁₂ H ₂₅	Me	97
C18:1-Cl	33	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆	H	80
C'18:1-Cl	34	C ₈ H ₁₇ CH=CHC ₈ H ₁₆	Me	85
C-DTG-Cl	52	C ₁₂ E ₄	H	56

II.2.3. Triflates d'alkyle

Les électrophiles de type triflate, dédiés à la préparation de composés pro-APLs qui présentent un lien phosphate simple, ont été synthétisés à partir du dodécanol ou du tétra(éthylène glycol)-monododécyl éther (C₁₂E₄) et de l'anhydride triflique, en présence de pyridine (Tableau 5). Compte tenu de leur instabilité, les triflates d'alkyles sont rapidement engagés dans la réaction suivante, sans purification préalable.

Tableau 5. Préparation des électrophiles de type triflate d'alkyle.

Nomenclature	Référence	R	Rendement (%)
12-Cl	35	C ₁₂ H ₂₅	69
DTG-Cl	53	C ₁₂ H ₂₅ (OC ₂ H ₄) ₄	97

II.2.4. Électrophiles bicaténaires et homobifonctionnels

II.2.4.1 Chloroalkyle bicaténaire

La préparation de l'électrophile bicaténaire **55**, nécessaire à la préparation du pro-APL tricaténaire E_{Ti} (**54**), requiert plus d'étapes de synthèse que les précédents précurseurs de pro-APLs (Figure 62).³³¹

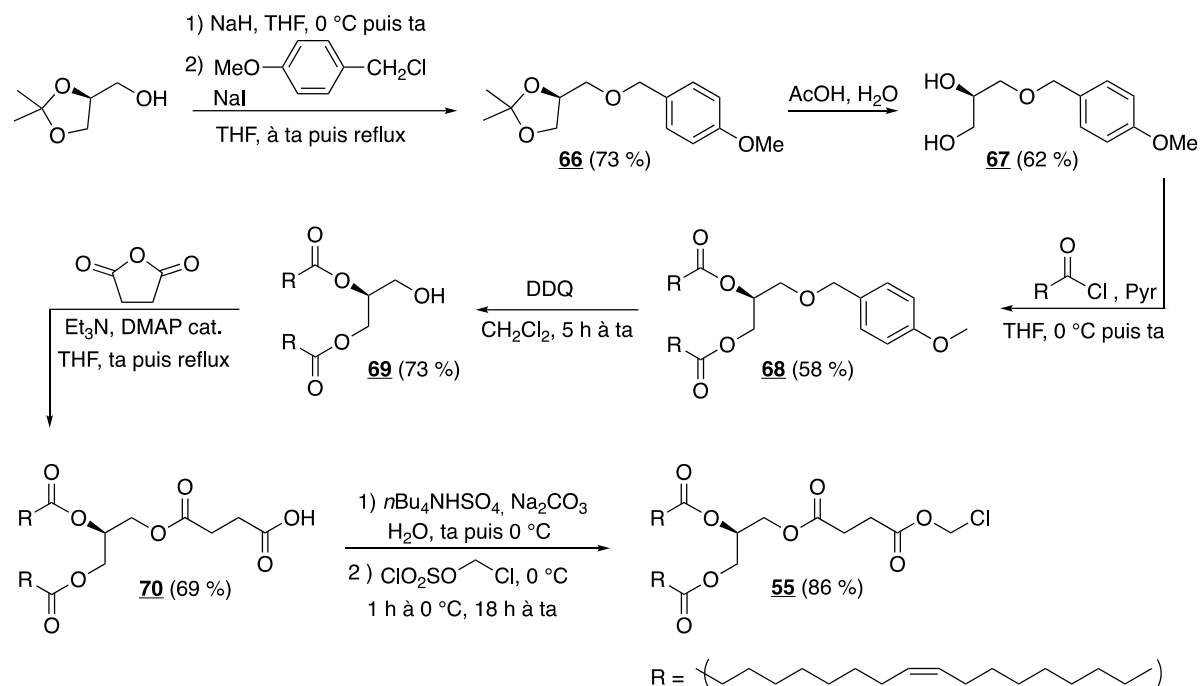


Figure 62. Voie de synthèse de l'électrophile **55**, nécessaire à la préparation du pro-APLs tricaténaire E_{Tri} (**54**).

Après protection de l'alcool primaire du (S)-(-)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane-4-méthanol par le groupement PMB (73 %), conduisant au composé **66**, l'hydrolyse de l'acétal en conditions acides fournit le diol **67** (62 %), qui est soumis à une double acylation par le chlorure d'oléyle (58 %) pour conduire au diglycéride protégé **68**. La déprotection du groupement PMB par la DDQ (**69**, 73 %) est rapidement suivie d'une acylation par l'anhydride succinique pour former **70**, en présence de Et_3N et d'une quantité catalytique de DMAP dans CH_2Cl_2 . Enfin, l'hémisuccinate **70** est mis à réagir avec le chlorosulfate de chlorométhyle en présence d'un agent de transfert de phase,³²⁶ pour conduire à l'électrophile **55** avec un rendement de 86 %, soit un rendement global de 11 % sur les 6 étapes.

La nécessité d'engager rapidement le *sn*-1,2-dioléylglycérol **69** dans la réaction de succinylation est dictée par la facilité de transposition de la chaîne acyle de la position 2 vers la position 3, qui mène alors au *rac*-1,3-dioléylglycérol symétrique (Figure 63). Cette transposition est favorisée par le gain d'énergie correspondant à la transformation de l'ester secondaire en ester primaire.³³² Malgré nos précautions, une isomérisation très partielle s'est produite après déprotection du composé **68** et l'élimination totale du produit secondaire *rac*-1,3-diglycéride n'a pu être effectuée lors de la purification du brut réactionnel. La réaction de succinylation réalisée sur le mélange de diglycérides a donc conduit à la formation d'un produit secondaire (acide *sn*-1,2-dioléylglycérosuccinique) en accompagnement du produit désiré **70**. C'est à l'issue de l'étape de chlorométhylation que nous avons pu éliminer de façon satisfaisante l'isomère non désiré **71**. La présence de celui-ci aurait introduit des complications lors de la réaction de *O*-alkylation de l'érufosine, avec la formation de deux diastéréomères supplémentaires. Des précisions sont

disponibles dans la partie expérimentale quant à l'analyse des composés d'isomérisation. (cf. *Chapitre 5 – Synthèse des composés 71 à 73*).

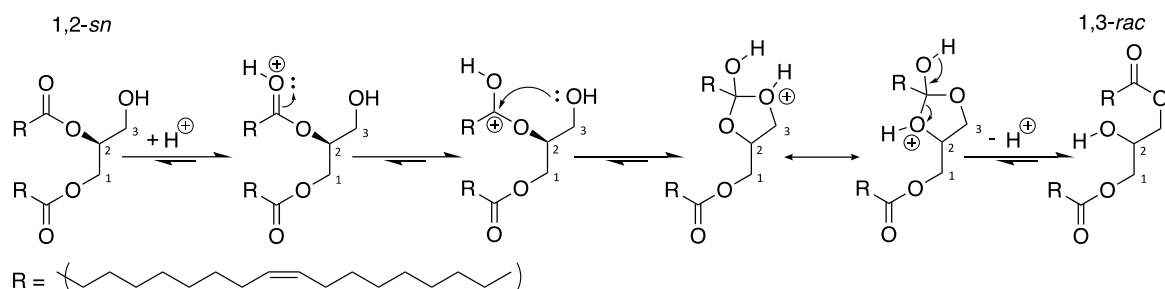


Figure 63. Mécanisme de formation de l'isomère racémique minoritaire à partir du diglycéride **69**.

II.2.4.2 Électrophiles homobifonctionnels

La synthèse des trois électrophiles homobifonctionnels **59**, **60** et **61** a été réalisée à partir de l'acide succinique, de l'acide 3,3'-dithiobis-propionique et du 3,3'-dithiobis-propan-1-ol (Figure 64).

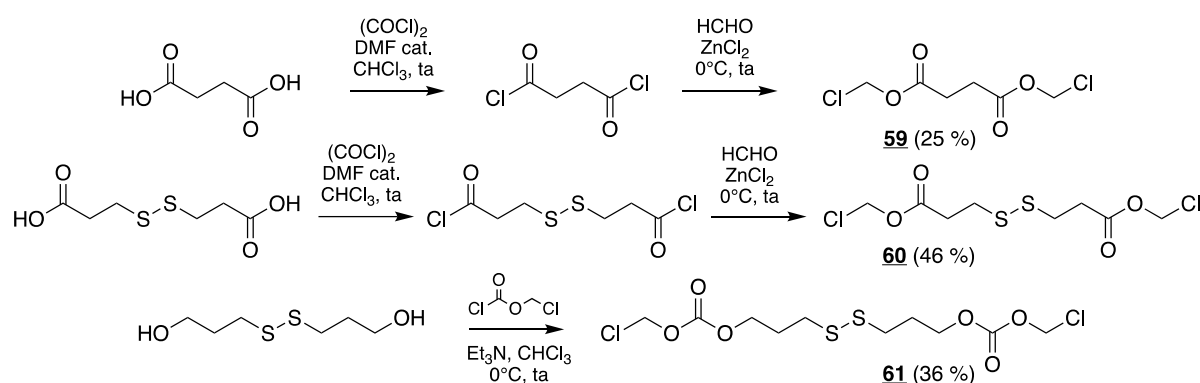


Figure 64. Synthèse des électrophiles homobifonctionnels.

Pour les électrophiles **59** et **60**, nous avons initialement envisagé la réaction de bis-chlorométhylation directe des diacides par réaction avec le chlorosulfate de chlorométhyle, comme dans le cas précédent.³²⁶ En effet, cette réaction permettrait d'obtenir en une seule étape les bis-esters de chlorométhyle souhaités, contre deux étapes en procédant de manière classique (formation des chlorures d'acide correspondants, puis réaction de chlorométhylation avec le formaldéhyde et le chlorure de zinc). De plus, le recours à cette réaction permet habituellement de se passer d'étape de purification par chromatographie, en réalisant seulement un traitement du milieu réactionnel pour éliminer l'agent de transfert de phase. Toutefois, cette tentative n'a été concluante que pour la préparation du composé **60** et, qui plus est, avec un rendement faible de 25 %. Nous avons pu obtenir de meilleurs résultats en procédant en deux étapes. Les composés **59** et **60** ont ainsi été obtenus avec un rendement de 25 % et 46 %, respectivement, après conversion des acides succinique et 3,3'-dithiobis-propionique en chlorures d'acide par le chlorure d'oxalyle, puis par réaction avec le formaldéhyde en présence de chlorure de zinc catalytique.^{302,327}

Le bis-carbonate de chlorométhyle **61** a, quant à lui, été préparé avec un rendement de 36 %, dans les conditions précédemment décrite pour la préparation des carbonates d'alkyle, soit par réaction du 3,3'-dithiobis-propan-1-ol avec le chloroformate de chlorométhyle en présence de pyridine.

II.3. Synthèse des pro-APLs

II.3.1. Procédure générale

Une procédure a été précédemment développée au laboratoire qui permet d'accéder aux phosphoacétals et, donc, potentiellement aux pro-APLs, par *O*-alkylation de phosphodiester (Figure 49).³⁰² Cette réaction souffre néanmoins d'un rendement souvent modeste et inférieur à 30-40 %. En effet, si le lipide zwitterionique et l'agent électrophile sont mis à réagir pendant 24 h au reflux de CHCl_3 , la conversion n'est que très partielle et d'importantes quantités de phosphodiester (> 50 %) sont habituellement récupérées lors de la purification du brut réactionnel.

Les tentatives d'optimisation de cette réaction ont impliqué de nombreuses modifications des conditions réactionnelles (nature du solvant, température, mode d'activation, temps de réaction, nature de l'électrophile) mais n'ont pas permis d'améliorer le taux de conversion et ont souvent rendu les étapes de purification plus compliquées. Seul le recours à un large d'excès d'électrophile (8 équivalents) a permis d'augmenter significativement le taux de conversion du phosphodiester. Par ailleurs, dans ces conditions, l'électrophile en excès et le phosphodiester n'ayant pas réagi peuvent être facilement récupérés au cours de l'étape de purification par chromatographie. Nous avons donc utilisé ces conditions réactionnelles pour préparer nos pro-APLs (Figure 49). Ceux-ci sont ainsi obtenus en chauffant l'APL avec 8 équivalents d'électrophile au reflux du chloroforme pendant 24 h. Le brut réactionnel est ensuite réduit sous vide et chromatographié sans autre traitement préalable.

II.3.2. Pro-miltéfosines

Les neuf composés pro-miltéfosines $\text{M}_{\text{E}12}$ (**4**), $\text{M}_{\text{E}'12}$ (**5**), $\text{M}_{\text{C}12}$ (**6**), $\text{M}_{\text{C}'12}$ (**7**), $\text{M}_{\text{E}18:1}$ (**8**), $\text{M}_{\text{E}'18:1}$ (**9**), $\text{M}_{\text{C}18:1}$ (**10**), $\text{M}_{\text{C}'18:1}$ (**11**) et M_{12} (**12**) ont été obtenus avec des rendements, pour la seule étape de *O*-alkylation, compris entre 16 % et 84 %. Les pro-APLs présentent un ou deux centres asymétriques. Le premier se situe au niveau de l'atome de phosphore, le phosphotriester étant chiral. Le second est porté par le pont acétalique lorsque celui-ci est substitué par un groupe méthyle. Les pro-APLs correspondants sont donc obtenus sous forme d'un couple de diastéréomères. Dans certains cas, nous avons pu séparer les deux diastéréomères et les avons évalués séparément dans les expériences de transfection. Nous n'avons alors jamais pu mettre en évidence une quelconque différence entre des isomères, que ce soit en termes d'efficacité de transfection ou de toxicité *in vitro*.

II.3.3. Pro-périfosines

La série des pro-périfosines est la plus petite série de pro-APLs que nous avons obtenue. Elle comprend cinq composés, dont quatre présentent un lien phosphoacétal : P_{E12} (**13**), P_{C12} (**14**), P_{C'12} (**15**) et P_{C18:1} (**16**). Le cinquième élément de cette série arbore un simple lien phosphate : P₁₂ (**17**). Cette série incomplète par rapport à nos ambitions initiales s'explique principalement par la faible réactivité de la périfosine dans la réaction de *O*-alkylation, ce qui se traduit par un rendement en produits isolés qui se situe autour de 20 % en moyenne. L'alkylation de la périfosine par le triflate de dodécanol **35** n'a elle-même permis d'obtenir le composé phosphotriester correspondant P₁₂ (**17**) qu'avec un rendement de 48 %, ce qui est très nettement inférieur au rendement observé pour les homologues en série pro-miltéfosine (84 %) et pro-érufosine (97 %). Ces résultats suggèrent que la nucléophilie du phosphate de la périfosine est atténuée par rapport à celle des autres APLs et, donc, que l'interaction au sein du zwitterion est plus forte dans ce cas-ci.

II.3.4. Pro-érufosines

Les pro-érufosines constituent la plus grande famille de pro-APLs préparée durant ce travail, avec un total de 20 membres (**18** à **26**, **36** à **42**, **50**, **51**, **54** et **58**). Ces différents composés ont été obtenus avec des rendements en général un peu plus élevés que dans les autres séries, la cinétique de la réaction de *O*-alkylation étant visiblement plus rapide.

II.3.4.1 Cas des pro-érufosines geminis

La synthèse des composés geminis mérite une attention particulière puisque, comme nous l'avons indiqué plus haut (cf. *Chapitre 2 - I.5.3 Pro-APLs geminis*), seul un composé gemini sur les trois initialement prévus a pu être obtenu. Il s'agit du composé E_{Gem} (**58**) construit à partir du bis-chlorométhyle carbonate **61** (Figure 54). Ce résultat trouve son explication dans les conditions expérimentales qui doivent être utilisées pour atteindre une conversion significative des phosphodiester en phosphotriesters. En effet, il est nécessaire d'utiliser un large excès d'électrophile par rapport au diester ce qui, statistiquement, rend peu probable la double fonctionnalisation dans le cas d'un électrophile homobifonctionnel. Comme on l'a vu plus haut, une stœchiométrie plus favorable à la double fonctionnalisation se traduit par un taux de conversion qui chute très rapidement. Un compromis a pu être trouvé dans un seul cas et nous a donc permis d'obtenir le composé E_{Gem} (**58**) avec un rendement de 7 %. La présence de nombreux sous-produits dans le milieu réactionnel a rendu l'étape de purification de ce composé par chromatographie relativement délicate. Parmi les produits secondaires que nous sommes parvenus à isoler, nous avons identifié le produit intermédiaire **72** qui résulte d'une seule attaque de l'érufosine sur l'électrophile (Figure 65). Obtenu avec un rendement de 14 %, nous ne sommes néanmoins pas parvenus à le convertir en homobisphosphoacétal, même en utilisant un large excès d'érufosine, les

réactions de dégradation étant apparemment plus rapides que la *O*-alkylation de l'érufosine et conduisant, en particulier, au produit **73** qui a pu être isolé.

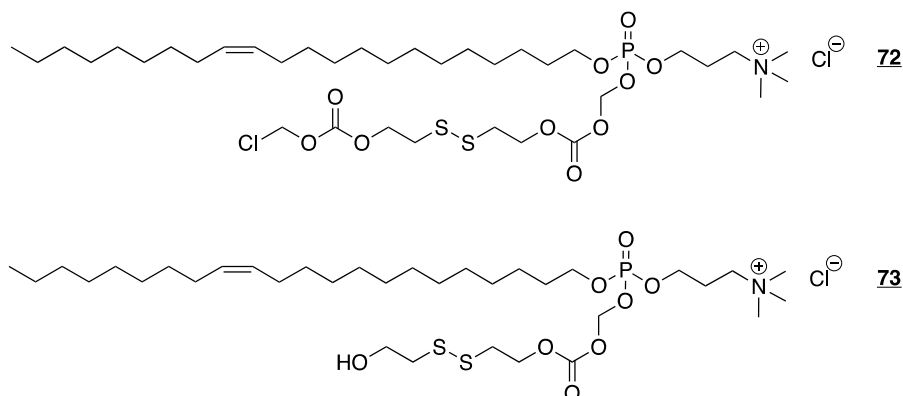


Figure 65. Structure des sous-produits **72** et **73** obtenus lors de la préparation du pro-APL E_{Gem} (**58**).

En ce qui concerne la synthèse des deux autres composés geminis, **56** et **57**, des produits secondaires similaires à ceux observés pour la synthèse du précédent pro-APL sont formés (monophosphoacétals, monophosphoacétals dégradés, produits de double *O*-alkylation mais ayant perdu une chaîne alkyle ou une tête polaire). Comme pour le cas précédent, les tentatives de conversion des intermédiaires monophosphoacétal en homobisphosphoacétal n'ont conduit qu'à des produits de dégradation.

III. Conformité au cahier des charges

Le cahier des charges de la physico-chimie des pro-APLs, présenté en début de chapitre, fait référence à trois points majeurs que sont 1-la capacité à complexer l'acide nucléique pour permettre sa vectorisation, 2-le caractère biolabile assurant une production *in situ* de l'APL parent, et 3-le caractère biocompatible permettant d'améliorer la tolérance des patients vis-à-vis des APLs. Avant d'engager nos composés dans des expériences en transfert de gènes, nous avons donc souhaité vérifier si nos pro-APLs satisfaisaient effectivement ces différents critères.

III.1. Interaction entre pro-APLs et acide nucléique

Des expériences de complexation d'acide nucléique ont été menées pour étudier la capacité des pro-APLs à complexer et condenser le matériel génétique. Ces expériences seront détaillées dans le prochain chapitre qui est axé sur la formulation des acides nucléiques avec les pro-APLs, mais nous pouvons annoncer ici que ce premier critère s'avère bien être respecté.

III.2. Dégradabilité des pro-APLs

Le caractère dégradable des pro-APLs doit en principe découler de l'implantation d'un lien phosphoacétal biolabile sur les APLs. Afin de le vérifier, nous avons mis en place une étude de la stabilité hydrolytique des pro-APLs à pH physiologique (pH 7,4) ou acide (pH 4,5, proche de celui du lyso-endosome), par RMN du ^{31}P . En effet, entre phosphotriesters et phosphodiesters, les déplacements chimiques du phosphore varient d'environ 5 ppm, ce qui permet de distinguer aisément les deux espèces en solution et d'en réaliser le dosage au cours du temps. Il convient cependant de noter que ce type d'étude ne donne aucune information quant à la stabilité hydrolytique des composés dans un milieu biologique complexe, milieu où ils peuvent être soumis à une hydrolyse médiée par des enzymes dont l'activité peut être extrêmement élevée et bien supérieure à celle d'une simple catalyse acido-basique.

Pour cette étude, les pro-APLs ont été solubilisés dans l'*iso*-propanol, puis injectés dans une solution tampon (pH 7,4 ou 4,5), sous agitation et en présence de 30 % molaire de Triton X-100. Le recours à ce détergent permet de fractionner les liposomes formés et d'obtenir des particules plus petites, une solution plus homogène et, par voie de conséquence, une meilleure résolution des signaux de RMN. Après formulation dans le tampon, des mesures régulières sont réalisées afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'hydrolyse ($t_{1/2}$). Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 6. Lorsque le processus d'hydrolyse est très lent et ne permet pas de calculer le $t_{1/2}$, c'est le taux d'hydrolyse à 5 jours qui est indiqué. À l'exception de quatre composés disponibles en trop faibles quantités ($\text{P}_{\text{C}12}$, $\text{P}_{\text{C}18:1}$, $\text{E}_{\text{E}2}$, et E_{Gem}), tous nos composés ont été incorporés dans cette étude. Pour des raisons pratiques (calibration du spectromètre de RMN en température), la stabilité des pro-APLs a été déterminée à 25 °C et non à la température physiologique. Lorsqu'elle a été possible, l'incubation de quelques pro-APLs à 37 °C a révélé, comme attendu, une accélération de la cinétique d'hydrolyse par rapport à 25 °C.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que les pro-APLs sont effectivement des espèces hydrolysables, que le produit d'hydrolyse est bien l'APL parent, mais que l'hydrolyse est plus lente à pH acide, contrairement à ce qu'on pourrait attendre compte tenu de la présence du groupe acétal. Ils suggèrent également, comme cela avait déjà été montré en série pro-DOPC, que la stabilité des composés ne peut être directement déduite de la présence de tel ou tel groupement fonctionnel (acido)labile dans la molécule (acétal, ester, carbonate, phosphate...).³⁰² En effet, cette stabilité dépend plutôt de l'environnement global du lien phosphoacétal et, résulte d'un équilibre subtil entre son encombrement, son hydrophilie ou sa lipophilie et, donc, son état de solvation par les molécules d'eau avoisinantes. Tous ces paramètres vont, *in fine*, conditionner l'efficacité de la réaction d'hydrolyse qui peut indifféremment être catalysée par un proton (catalyse acide spécifique), un ion hydroxyle (catalyse basique spécifique) ou une molécule d'eau (catalyse par le solvant).^{333,334}

Tableau 6. Temps de demi-vie $t_{1/2}$ (h) des pro-APLs à pH physiologique (Hepes 10 mM, pH 7,4) et acide (AcOK/AcOH 10 mM, pH 4,5), à 25 °C.

Pro-miltéfosines						Pro-érufosines					
Produit		Demi-vie (h)		Hydrolyse à 5 jours (%)		Produit		Demi-vie (h)		Hydrolyse à 5 jours (%)	
		7,4	4,5	7,4	4,5			7,4	4,5	7,4	4,5
<u>4</u>	M_{E12}			20	10	<u>18</u>	E_{E12}			14	2
<u>5</u>	$M_{E'12}$	17	17			<u>19</u>	$E_{E'12}$	96	104		
<u>6</u>	M_{C12}			11	3	<u>20</u>	E_{C12}			8	1
<u>7</u>	$M_{C'12}$			14	13	<u>21</u>	$E_{C'12}$			6	5
<u>8</u>	$M_{E18:1}$			18	2	<u>22</u>	$E_{E18:1}$			23	18
<u>9</u>	$M_{E'18:1}$	19	19			<u>23</u>	$E_{E'18:1}$	96	100		
<u>10</u>	$M_{C18:1}$			15	2	<u>24</u>	$E_{C18:1}$			10	0
<u>11</u>	$M_{C'18:1}$			13	13	<u>25</u>	$E_{C'18:1}$			4	6
<u>12</u>	M_{12}^*			0	0	<u>26</u>	E_{12}^*			0	0
						<u>37</u>	E_{E6}			18	8
						<u>38</u>	E_{E8}			16	1
Pro-pérfosines											
Produit		Demi-vie (h)		Hydrolyse à 5 jours (%)		<u>39</u>	E_{E10}			16	2
		7,4	4,5	7,4	4,5	<u>40</u>	E_{E14}			14	2
<u>13</u>	P_{E12}			14	6	<u>41</u>	E_{E16}			16	2
<u>14</u>	P_{C12}			6	6	<u>42</u>	E_{E18}			14	3
						<u>50</u>	E_{C-DTG}			13	4
						<u>54</u>	E_{Tri}			10	1
<u>17</u>	P_{12}^*			0	0	<u>51</u>	E_{DTG}^*			0	0

* Mesure après 31 jours d'incubation à 25 °C.

L'analyse des résultats présentés dans le tableau ci-dessus fait ressortir trois catégories de pro-APLs, en fonction de leur stabilité hydrolytique. La première catégorie regroupe la majeure partie des composés (22 sur un total de 30) qui ne sont que partiellement hydrolysés après 5 jours d'incubation. Dans la seconde, on trouve quatre composés qui ont une demi-vie de l'ordre de quelques heures (< 4 jours). Enfin, la dernière catégorie est constituée des composés qui résistent parfaitement à l'hydrolyse après un mois d'incubation. Dans cette catégorie, on trouve, comme on pouvait s'y attendre, les phosphotriesters simples : M_{12} (12), P_{12} (17), E_{12} (26) et E_{DTG} (51). Autres points qui ressortent du Tableau 6, la stabilité des esters est plus faible que celle des carbonates et la longueur du motif hydrophobe introduit sur l'APL ne se semble pas influencer de manière significative la cinétique d'hydrolyse du pro-APL. On notera également que l'introduction d'un groupe méthyle sur le carbone acétalique conduit à une accélération du processus d'hydrolyse des carbonates en conditions acides par un facteur de 4 à 5 (mesuré à 5 jours). Cette même modification impacte encore plus amplement les esters, puisque les 50 % d'hydrolyse sont régulièrement atteints dans ce cas. Ainsi, les deux pro-miltéfosine $M_{E'12}$ (5) et $M_{E'18:1}$ (9) ont une demi-vie d'environ 18 heures et celle des deux pro-érufosine $E_{E'12}$ (19) et $E_{E'18:1}$ (23) est d'environ 96 heures. Toutefois, si ces composés se dégradent plus rapidement que les autres, leur cinétique d'hydrolyse n'est pas pH-dépendante puisqu'aucune différence significative n'est observée aux deux pH considérés.

En conclusion de cette étude, il faut garder à l'esprit que c'est la stabilité des composés « nus » que nous avons déterminés. Si elle peut donner une idée de la susceptibilité hydrolytique respective des différents pro-APLs, elle ne permet certainement pas d'en déduire les propriétés de formulations à plusieurs composants (pro-APL, lipide "helper", acide nucléique) comme celles sur lesquelles nous allons nous focaliser dans le chapitre 3 dédié aux évaluations biologiques.

III.3. CMC/CAC des pro-APLs et biocompatibilité

Comme nous l'avons exposé plus haut, les APLs sont des composés globalement mal tolérés par l'organisme et, parmi les trois que nous avons choisi d'étudier, l'érufosine semble être le seul dont la biocompatibilité n'est pas un frein absolu à son utilisation en clinique. La principale explication apportée à la toxicité des APLs réside dans leur concentration micellaire critique (CMC) élevée qui se traduit par un fort pouvoir de déstabilisation des membranes cellulaires. Ainsi, il nous a semblé pertinent de caractériser la CMC des pro-APLs développés dans ce travail.

Mais dans le cas de ces pro-APLs, la présence de la seconde chaîne alkyle, par rapport à l'APL initial, peut modifier l'organisation structurale en solution aqueuse. Les pro-APLs étant alors plus susceptibles de former des phases lamellaires que des micelles,²³² il est plus judicieux de parler de concentration d'agrégation critique (CAC) pour les pro-APLs, du moins tant qu'aucune preuve n'est apportée pour attester de la formation de micelles avec ces composés.

La mesure de la CMC/CAC d'un composé amphiphile peut être effectuée par différentes méthodes,³³⁵ impliquant, par exemple, des mesures de conductivité,³³⁵ de tensiométrie,^{321,336} ou encore de fluorescence. C'est une technique de fluorescence que nous avons choisie pour caractériser nos composés. Plusieurs approches expérimentales ont été décrites,³³⁷⁻³⁴⁰ et nous en avons sélectionné une qui est robuste et facile à mettre en œuvre, et qui implique l'utilisation du pyrène comme "révélateur" d'agrégation.³⁴¹⁻³⁴³

Le pyrène est une molécule hydrophobe fluorescente et l'intensité de son émission est donc exacerbée par la lipophilie de son environnement direct. Le spectre d'émission du pyrène comporte 5 bandes caractéristiques mais seules deux d'entre elles reflètent les changements environnementaux de la molécule, à savoir la bande I (375 nm), la plus intense, et la bande III (385 nm) (Figure 66).³⁴² Dans un environnement hydrophobe, comme celui d'une micelle ou d'une agrégat de manière plus générale, l'intensité du spectre d'émission est fortement exacerbée au niveau des bandes I et III, avec un très léger décalage vers le rouge (376 nm pour la bande I, 387 nm pour la bande III).³⁴³ La variation du rapport d'intensité I_{375}/I_{387} peut donc être utilisée pour détecter le passage du pyrène d'un environnement hydrophile à un environnement plus hydrophobe.

Lorsque la concentration de l'amphiphile étudié est inférieure à la CMC/CAC, le ratio I_{375}/I_{387} est constant. Au-delà de cette valeur, l'amphiphile s'auto assemble et offre aux molécules de pyrène

un environnement hydrophobe plus favorable. L'incorporation du pyrène dans les micelles/agrégats se traduit alors par une forte augmentation du rapport I_{375}/I_{387} . L'expression de ce dernier en fonction du logarithme de la concentration de l'amphiphile permet de déterminer la CMC/CAC de l'amphiphile, cette concentration se traduisant par la rupture de linéarité dans la courbe.

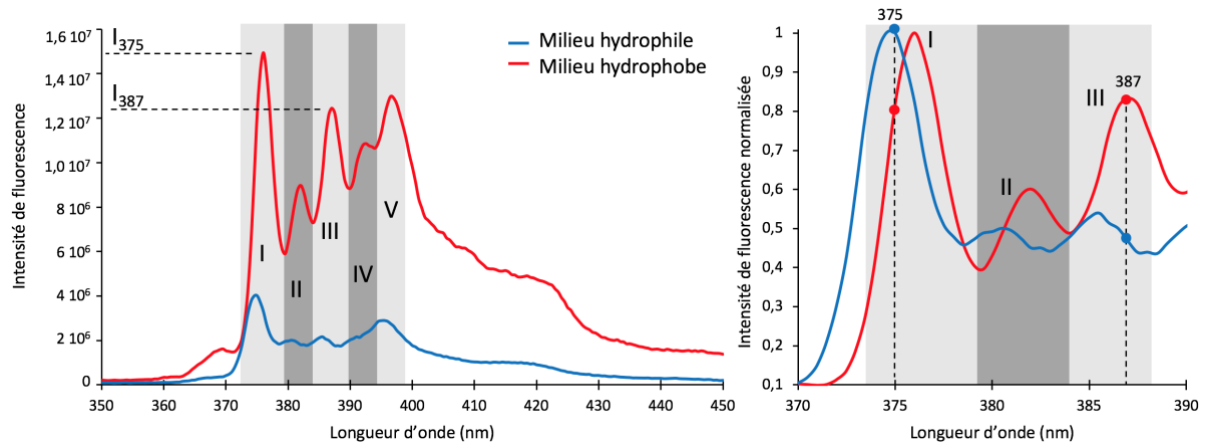


Figure 66. Spectres d'émission du pyrène, avec ses 5 bandes caractéristiques, dans un environnement hydrophile ou hydrophobe. Les spectres normalisés (à droite) montrent bien l'exacerbation des bandes à 375 et 387 nm en milieu hydrophobe et la pertinence du rapport I_{375}/I_{387} pour la détermination de la CMC d'un amphiphile.

Dans un premier temps, nous avons utilisé cette méthode de détermination de la CMC pour nos trois APLs de référence et, plus spécifiquement, la miltéfosine et la périfosine pour lesquelles des valeurs sont disponibles dans la littérature.^{321,336}

Nous avons obtenu les valeurs de 13,5 μM pour la miltéfosine et de 4,44 μM pour la périfosine, ce qui est conforme aux valeurs de 12-13 μM et 2-3 μM , respectivement, précédemment décrites (Figure 67). À notre connaissance, aucune valeur de CMC n'a été rapportée pour l'érufosine et nous avons obtenu une valeur de 1,4 μM . Il est important de noter que la réalisation de plusieurs mesures indépendantes a révélé que l'incertitude associée à la méthode pouvait conduire à des variations de $\pm 0,4 \mu\text{M}$. Cette incertitude doit être prise en considération lors de l'analyse des résultats obtenus pour les différents pro-APLs (Figure 68).

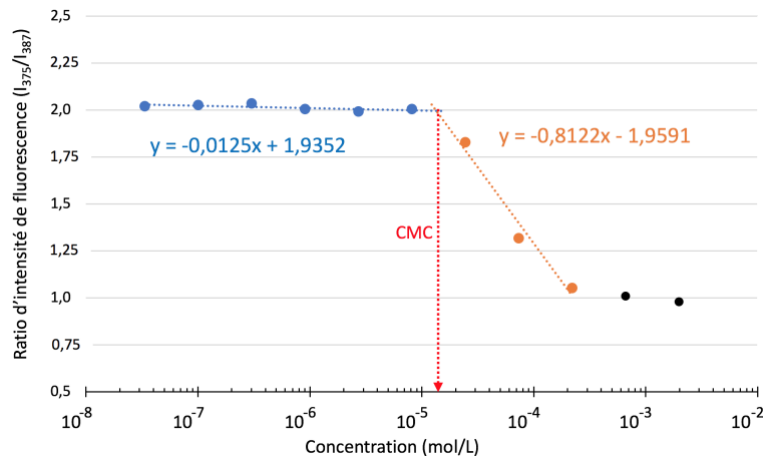


Figure 67. Détermination de la CMC de la miltéfosine, après résolution de l'équation mathématique associée aux courbes de tendances bleue et orange.

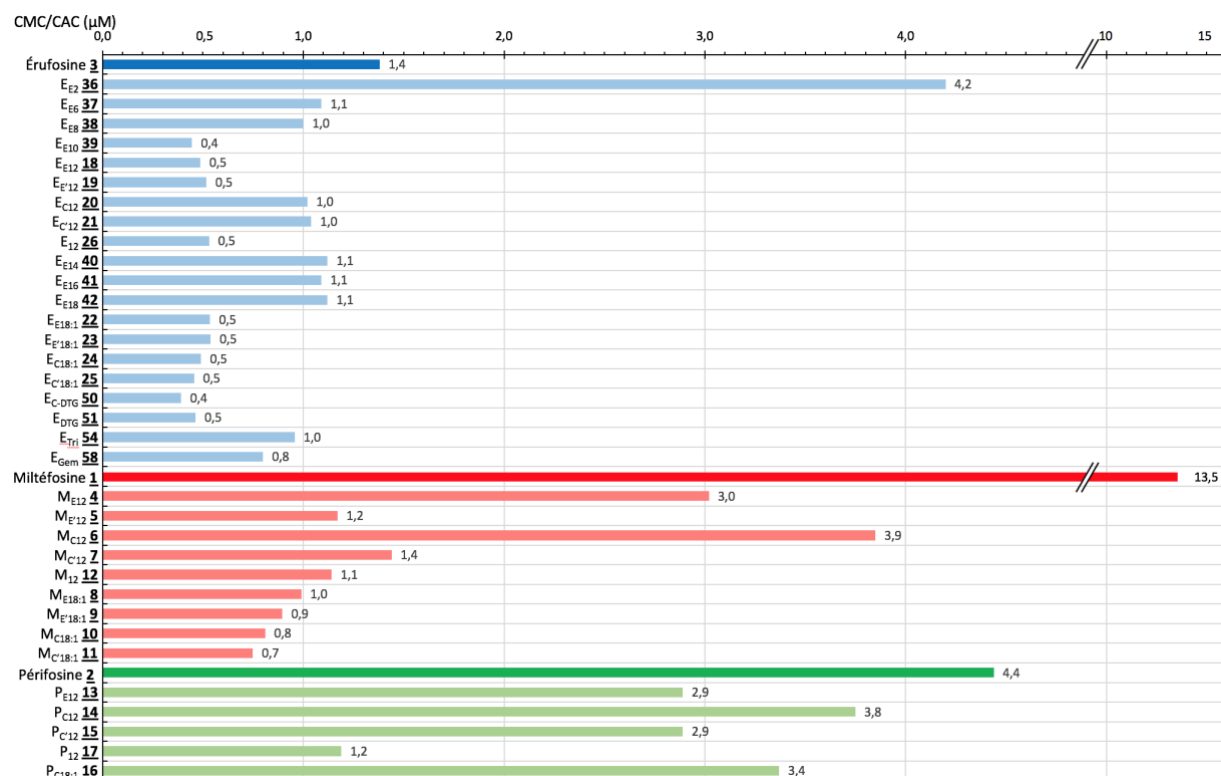


Figure 68. CMC des APLs et CAC des pro-APLs déterminées par la méthode d'incorporation du pyrène.

Ainsi, la CAC des pro-APLs a été déterminée et comparée aux valeurs de CMC recueillies pour les APLs. En guise de première remarque, nous pouvons dire que la CAC des pro-APLs est systématiquement abaissée par rapport à la valeur de CMC des APLs parents. Une seule exception est observée et concerne le composé E_{E2} (**36**), qui présente une CAC trois fois supérieure à la CMC de l'érufosine. Ceci pourrait trouver une explication dans le fait que le substituant introduit pour annuler la charge négative sur l'érufosine est très court et ne modifie pas significativement le "potentiel hydrophobe" de la molécule. Par contre, l'installation d'une charge positive nette augmente l'hydrophilie de la tête polaire et, par voie de conséquence, la solubilité de la molécule dans l'eau.

Dans un second temps, on constate que la majorité des CAC mesurées pour les pro-APLs (27 sur un total de 34 produits) sont comprises dans un intervalle relativement restreint, entre 0,4 µM et 1,4 µM. Compte tenu de l'incertitude de la méthode (*vide supra*), une analyse fine des résultats est assez délicate et, par conséquent, nous nous en tiendrons aux conclusions les plus robustes.

On note ainsi que l'abaissement de CMC entre érufosine et pro-érufosines est globalement moins important que dans les deux autres séries. Ceci peut s'expliquer par la valeur de CMC initialement plus faible de l'érufosine, le passage aux pro-érufosine se traduisant alors par une diminution potentiellement plus subtile de cette dernière.

Par ailleurs, la nature du substituant du lien phosphoacétal, ester ou carbonate, ne semble pas induire de différence significative quant à la CAC des composés correspondants, celles-ci s'établissant entre 0,5 µM (E_{E12}/ E_{C12}) et 0,9 µM (M_{E12}/ M_{C12} et P_{E12}/ P_{C12}). Les composés de type

phosphotriester "simple" présentent des valeurs de CAC un peu plus faibles que leurs homologues phosphoacétals dotés de la même chaîne dodécyle, pour les séries pro-miltéfosine et pro-pérfosine, les résultats obtenus dans la série pro-érufosine étant plus délicats à interpréter compte tenu de l'incertitude sur les mesures.

En ce qui concerne l'introduction d'un substituent méthyl sur le pont de l'acétal des pro-APLs, elle provoque une baisse significative de la CMC en série pro-miltéfosine (réduction d'un facteur 1,3 à 2,8). Cette baisse semble un peu moins perceptible en série pro-pérfosine et est non significative en série pro-érufosine.

Comme attendu, l'allongement de la chaîne carbonée R a un effet bénéfique sur la diminution de la CMC des APLs. On le constate en série pro-miltéfosine, où le passage d'une chaîne dodécyle à oléyle se traduit par un abaissement de la CMC d'un facteur 3 (M_{E12} et M_{C12} vs. $M_{E18:1}$ $M_{C18:1}$). Cette diminution est beaucoup plus subtile lorsque le pont acétalique est substitué ($R' = Me$). Compte tenu des CAC plus basses enregistrées en série érufosine, les effets précédemment observés sont écrasés et plus difficiles à identifier. En effet, pour un bras contenant 6 atomes de carbone ou plus, la concentration chute et se situe entre 0,4 et 1,1 μM , des valeurs qui pourraient s'approcher de la concentration minimale que la technique permet de mesurer. En effet, le nombre de molécules hydrophobes qui composent l'agrégat ou le volume de celui-ci pourrait devenir trop faible pour solubiliser le pyrène.³⁴⁴ On constate d'ailleurs qu'il y a peu d'exemples de composés étudiés par cette technique et qui présentent des CMC dans un gamme de concentration aussi basse.³⁴⁵

En résumé, bien que cette étude menée sur la CMC/CAC de nos composés suggère que les prodrogues d'APLs pourraient être mieux tolérées que les APLs parents durant leur transport dans l'organisme, il faut considérer que l'actif thérapeutique final correspond au complexe formé entre le pro-APL et un acide nucléique et non au pro-APL seul. Nous avons néanmoins caractérisé nos composés et pu vérifier, du point de vue physico-chimique, la pertinence de notre stratégie de conception des pro-APLs. Comme pour les observations faites sur la stabilité hydrolytique des pro-APLs, nos conclusions sur la CMC/CAC de ces derniers ne nous permettent pas de présumer avec certitude de leur comportement en milieu biologique complexe.

IV. Conclusion

Au terme de nos travaux de synthèse, nous avons à notre disposition un total de 34 composés pro-APLs, dont 9 sont issus de la miltéfosine, 20 de l'érufosine et 5 de la pérfosine. Les rendements des synthèses réalisées sont très variables (de 15 % à 97 % pour la seule étape de *O*-alkylation des APLs) ce qui est lié, d'une part, à la réactivité intrinsèques des APLs et des électrophiles et, d'autre

part, à la formation de divers produits secondaires selon les réactifs mis en jeu. Deux cibles initialement prévues ont dû être abandonnées mais l'obtention du composé E_{Gem} (**58**) constitue malgré tout une réussite, compte tenu des difficultés de synthèse qui sont associées à cette classe de pro-APLs.

Une large diversité structurale a été générée à travers la *O*-alkylation des APLs et la variété des électrophiles mis en jeu dans cette réaction, ces derniers ayant été préparés en utilisant des méthodologies robustes. L'accès rapide à de nombreux pro-APLs que nous avons développé constitue ainsi un avantage pour la réalisation d'une étude de relation de structure-activité et répond aux critères de développement de vecteurs non-viraux, à savoir l'accès efficace à des vecteurs performants et modulables à partir de précurseurs peu onéreux.

Les pro-APLs ont été caractérisés par différentes méthodes analytiques pour confirmer leur structure chimique (RMN ¹H, ¹³C, ³¹P ; IR ; HR-MS) et déterminer leurs propriétés physico-chimiques (stabilité hydrolytique, propriétés d'auto assemblage). Comme nous l'avons déjà dit, ces études ne permettent pas, en l'état actuel des connaissances, de prédire les propriétés des actifs thérapeutiques qui seront obtenus à partir des pro-APLs, mais elles constituent une preuve de concept.

Dans la partie qui suit, nous allons présenter l'évaluation biologique de ces composés en étudiant leur potentiel en tant qu'agent de délivrance d'acide nucléique (siARN et ADN plasmidique) et leur cytotoxicité, dans le cadre général d'applications en combothérapie anti tumorale.

Chapitre 3

-

Développement de formulations de pro-APLs pour une combothérapie antitumorale

Comme indiqué précédemment, ce chapitre détaille l'étude biologique *in vitro* qui a été réalisée avec les composés pro-APLs, sur des lignées cellulaires cultivées au laboratoire. Les thématiques de recherche de notre équipe étant focalisées sur le poumon, nous avons principalement réalisé notre évaluation sur des cellules pulmonaires humaines. Toutefois, nous avons également eu recours à des cellules du colon, du sein et du sang.

I. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection de siARN

Dans l'optique de proposer une combothérapie antitumorale innovante, nous souhaitons, dans un premier temps, étudier la capacité des pro-APLs à délivrer un siARN, avant d'envisager leur utilisation pour la délivrance d'un ADN plasmidique. En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (cf. *Chapitre 1 – III.1.3 Les petits ARN interférents*), il existe de nombreux exemples de siARNs thérapeutiques capables d'induire la mort des cellules transfectées. Or, nos pro-APLs sont censés générer des espèces antitumorales (les APLs) au sein même de ces cellules, ce qui constitue une seconde cause potentielle d'apoptose. Il est dans ce cas difficile d'établir une corrélation entre la mort cellulaire et la nature de l'actif thérapeutique employé. Afin de clairement dissocier la réponse biologique induite par l'activité du siARN transfecté de celle découlant du caractère antitumoral intrinsèque des APLs ou pro-APLs, nous avons utilisé un modèle cellulaire impliquant un gène rapporteur, celui de la luciférase. Ainsi, contrairement à un siARN ciblant un gène impliqué dans l'apoptose, un siARN réprimant l'expression de la luciférase pourra voir sa transfection très facilement quantifiée par simple mesure de bioluminescence, sans interférence avec l'activité apoptotique intrinsèque du vecteur utilisé.

I.1. Le gène rapporteur de la luciférase en transfert de siARN

La luciférase est une enzyme dont l'activité biologique s'accompagne d'un phénomène de bioluminescence que l'on peut observer, par exemple, chez le ver luisant. Dans nos études, nous avons sélectionné les cellules A549-Luc, qui sont des cellules cancéreuses de poumon humain (adénocarcinome) qui ont été génétiquement modifiées afin d'exprimer de manière stable le gène codant la luciférase de *Firefly*. Elles produisent donc ladite enzyme, qui peut être extraite des cellules et dosée par mesure de la bioluminescence émise en présence de son substrat, la D-luciférine (Figure 69). En effet, la transformation de ce substrat s'accompagne d'une émission de photons (bioluminescence), qu'il est possible de quantifier à l'aide d'un luminomètre. La quantité de photons émis est directement liée à la quantité de protéine présente et, donc, au niveau d'expression du gène correspondant. Ainsi, la répression du gène de la luciférase par un siARN entraîne un blocage de la production de la protéine, ce qui se traduit par une chute de son activité

enzymatique et, donc, une chute du signal de bioluminescence en présence du substrat. Il est ainsi possible d'établir une corrélation directe entre l'intensité du signal de bioluminescence enregistré et l'efficacité de la transfection réalisée.

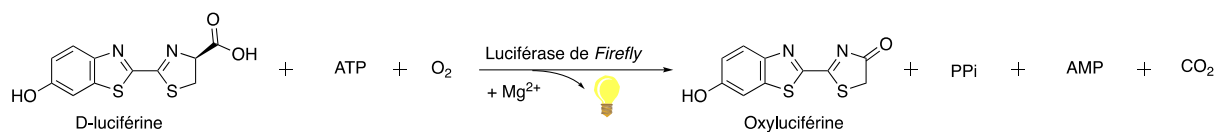


Figure 69. Transformation de la D-luciférine en oxyluciférine par la protéine luciférase de *Firefly* qui est à l'origine d'une émission de bioluminescence, alors quantifiable par un bioluminomètre équipé d'un photomultiplicateur.

Dans nos expériences de transfection, nous avons donc employé un siARN dirigé contre l'ARNm codant pour la luciférase de *Firefly* (siLucU), ainsi qu'un siARN non codant (sic). Ce dernier sert de contrôle négatif puisqu'il possède une séquence qui ne cible aucun transit cellulaire. Il permet de s'assurer que l'extinction du gène est spécifique et non due à la toxicité des particules de transfection.

I.2. Complexation du siARN par les pro-APLs

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à vérifier que les pro-APLs étaient en mesure de complexer notre siARN de 21 paires de bases. Ainsi nous avons formés des lipoplexes à base de pro-APLs et de siARN en mettant en jeu une quantité fixe de siARN et une quantité croissante de lipide cationique. On définit alors un rapport de charge N/P qui est calculé de la manière suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{[\text{lipide cationique}]}{[\text{siARN}] \times 42}$$

avec : la concentration en mol/L

42 = nombre de phosphates présents sur le siARN (nombre de charges négatives)

Les lipoplexes de siARN sont préparés selon une procédure standardisée qui fait intervenir la préparation d'un film de lipide cationique. En effet, l'évaporation d'une solution éthanolique de pro-APL dans un eppendorf laisse un film au fond du tube, qui peut être repris par une solution de siLucU, dans le glucose à 5 %. Le mélange est agité pendant 20 secondes au vortex, puis incubé pendant 30 minutes, pour fournir des lipoplexes de siARN prêts à l'emploi.

Une électrophorèse sur gel d'agarose des complexes formés à différents rapports N/P permet de caractériser le pouvoir de complexation du vecteur, comme illustré pour les deux pro-érufosine E_{E12} (**18**) et E_{E'12} (**19**) (Figure 70). En présence d'une trop faible quantité de lipide cationique (N/P faible), l'acide nucléique n'est pas totalement complexé et migre donc au travers du gel. Lorsque la quantité de lipide cationique est suffisante pour assurer la complexation totale du siARN, alors

aucune migration n'est observée. Dans le cas du pro-érufosine E_{E12} (**18**), une faible quantité d'acide nucléique migre encore au rapport N/P de 3 (Figure 70-A), alors que dans le cas du pro-érufosine $E_{E'12}$ (**19**), un rapport N/P de 2 est suffisant pour assurer la complexation totale du matériel génétique (Figure 70-B). Il semble donc que l'introduction d'un groupement méthyle sur le pont du phosphoacétal accroisse le pouvoir de complexation du pro-APL. Par ailleurs, la détermination du potentiel zéta de ces particules indique qu'au rapport N/P de 1, les espèces sont chargées négativement, ce qui confirme la complexation partielle du siARN dans ces conditions.

De manière générale, tous les pro-APLs que nous avons préparés sont en mesure de complexer un siARN et ce, pour des rapports N/P compris entre 1,5 et 4.

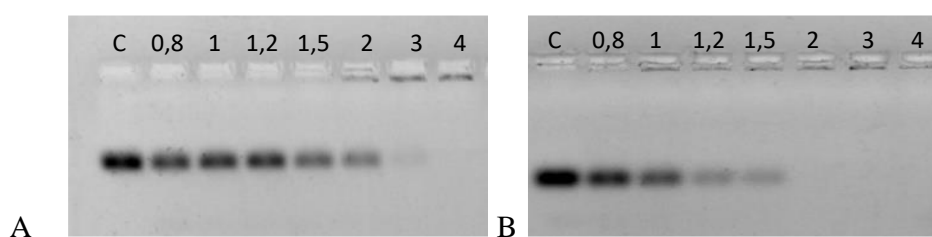


Figure 70. Électrophorèses sur gel d'agarose réalisées avec des lipoplexes E_{E12} (**18**)/siLucU (gel A) et $E_{E'12}$ (**19**)/siLucU (gel B), pour des rapports N/P allant de 0,8 à 4. Le contrôle (C) correspond au siARN nu.

I.3. Résultats de vectorisation et optimisations des conditions

Après avoir montré que les pro-APLs présentent un pouvoir de complexation des siARN, nous nous sommes engagés dans une évaluation de leurs performances en transfert de siARN.

Pour ces expériences de transfection, la concentration finale en siARN qui a été choisie est de 10 nM et nous avons étudié l'activité des lipoplexes pour des rapports N/P de 1, 3, 5, 10, 25, 50 et 100. Ces lipoplexes sont incubés avec des cellules A549-Luc durant 48 h, en présence de sérum (10 %). À la fin de cette incubation à 37 °C, les cellules sont lysées et la luciférase présente dans le milieu est dosée par luminométrie. La viabilité cellulaire est, quant à elle, déterminée par dosage des protéines. L'INTERFERin[®], agent de transfection commercial, est utilisé en tant que contrôle positif (C), avec une concentration finale en siARN de 10 nM.

Un lipide cationique anciennement développé au laboratoire, le pro-DOPC PP677, constitue un deuxième contrôle positif, avec son profil de transfection de siARN particulièrement intéressant (Figure 71). En effet, il permet une extinction spécifique du gène de la luciférase à partir du rapport N/P de 25, tout en préservant une bonne viabilité cellulaire (> 60 %).

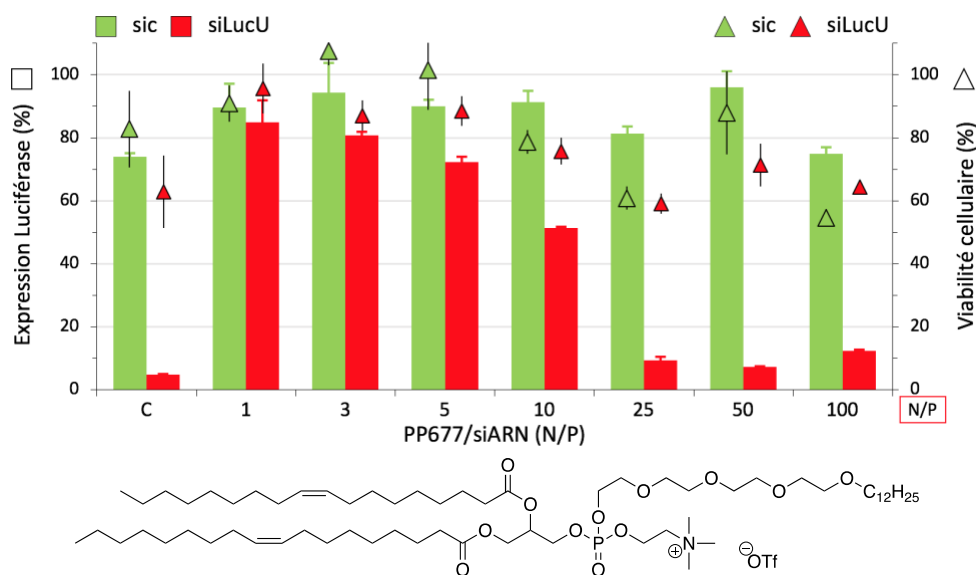


Figure 71. Structure et profil de transfection de siARN obtenu avec le vecteur PP677. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données en pourcentages par rapport aux cellules non traitées (A549-Luc). (C) fait référence à l'utilisation d'INTERFERin® en tant que contrôle positif.

I.3.1. Résultats

Dans les expériences en transfection de siARN, nous avons principalement étudié les premiers pro-APLs de I^{ère} génération (cf. *Chapitre 2 - I.4 Cibles, nomenclature et rétrosynthèse*).

Malgré la diversité de structures chimiques évaluées, nous n'avons pas obtenu de résultat satisfaisant pour le transfert de siARN et aucun des 23 composés testés n'a permis d'éteindre le gène cible. Les profils obtenus pour les composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**) sont représentatifs des résultats obtenus dans ces expériences (Figure 72).

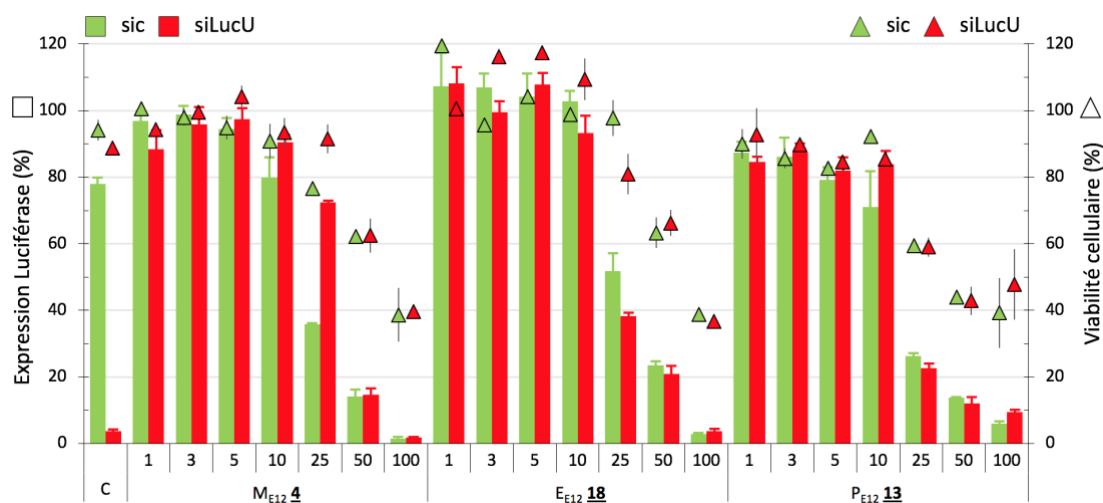


Figure 72. Profil de transfection de siARN obtenu avec les vecteurs M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), à divers N/P.

Dans l'ensemble des cas étudiés, le profil de transfection obtenu fait uniquement apparaître la toxicité des particules de transfection. En effet, dans les conditions dans lesquelles nous les avons évalués, aucun pro-APL ne s'est révélé en mesure d'induire une extinction spécifique du gène de la luciférase puisque l'expression de la protéine diminue de manière identique, quel que soit le siARN utilisé, codant ou non. La diminution de l'expression de la luciférase est donc simplement le reflet de la baisse de viabilité cellulaire, elle-même due à la toxicité intrinsèque du lipide cationique. Le dosage des protéines confirme la baisse progressive de la viabilité cellulaire lorsque le rapport N/P augmente.

À la vue des résultats négatifs systématiquement obtenus avec nos composés, nous avons procédé à diverses tentatives d'optimisation du protocole de transfection, de la formulation des lipoplexes ou de la structure des pro-APLs.

I.3.2. Optimisation par modification du protocole de transfection

La première tentative d'optimisation a consisté à modifier le protocole de transfection employé. En effet, si celui-ci s'est trouvé adapté pour des lipoplexes à base de pro-DOPC (Figure 71), il est possible que la spécificité structurale de nos composés nécessite un ajustement de certains paramètres.

Nous avons donc préparé les lipoplexes en préformant des liposomes. Brièvement, les lipides dissous dans EtOH sont injectés dans une solution de glucose à 5 %. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, la solution est mise en présence de siARN, lui-même en solution dans le glucose 5 %. Après une incubation de 20 minutes, les lipoplexes sont déposés sur les cellules et le traitement ultérieur est identique à celui du protocole initial.

Ce protocole n'a apporté aucune amélioration. Pire, le siARN formulé avec le vecteur de référence PP677 dans ces conditions n'induit aucune extinction du gène cible. Le protocole initial ne semble donc pas être en cause.

Par ailleurs, que le dépôt des lipoplexes soit réalisé sur des cellules adhérentes (disposées dans les puits 24 h avant le dépôt des lipoplexes) ou sur des cellules fraîchement disposées (quelques minutes avant le dépôt), aucune différence n'a pu être relevée, y compris avec le pro-DOPC PP677.

I.3.3. Optimisation par introduction de DOPE dans les formulations

Considérant alors que le protocole de transfection n'est pas responsable de l'échec de nos lipoplexes à transfecter les cellules, nous avons tenté d'optimiser nos formulations en introduisant de la DOPE dans celles-ci. En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, ce lipide neutre aux propriétés fusogènes permet d'accroître l'efficacité de transfection de nombreuses formulations.^{230,231} Ainsi, nous avons intégré la DOPE dans nos constructions lors de l'étape de

préparation des films lipidiques, à l'aide d'une solution éthanolique de ce lipide. Nous avons défini un nouveau rapport, D/N, représentant la quantité de DOPE intégré dans le film lipidique et calculé comme suit :

$$\frac{D}{N} = \frac{[DOPE]}{[\text{lipide cationique}]}$$

avec la concentration en mol/L

L'ajout de DOPE, à raison d'un ou deux équivalents par rapport au lipide, n'a cependant pas solutionné l'absence d'efficacité de transfection du pro-miltéfosine M_{E12} (**4**), comme on peut le constater sur la Figure 73. Seule la viabilité cellulaire s'en trouve améliorée pour les N/P élevé (10, 25 et 50), ce qui ne soutient pas l'hypothèse d'une assistance lors de l'échappement endosomal, dans ce cas-là. En revanche, la proportion plus importante en DOPE dans la formulation pourrait entraîner la formation de lipoplexes moins concentrés en lipides cationiques, pouvant alors expliquer cette augmentation de la viabilité cellulaire dans le cas du ration D/N de 2. Cette tendance a été observée pour les deux tentatives réalisées sur les composés M_{E12} (**4**) et P_{E12} (**13**).

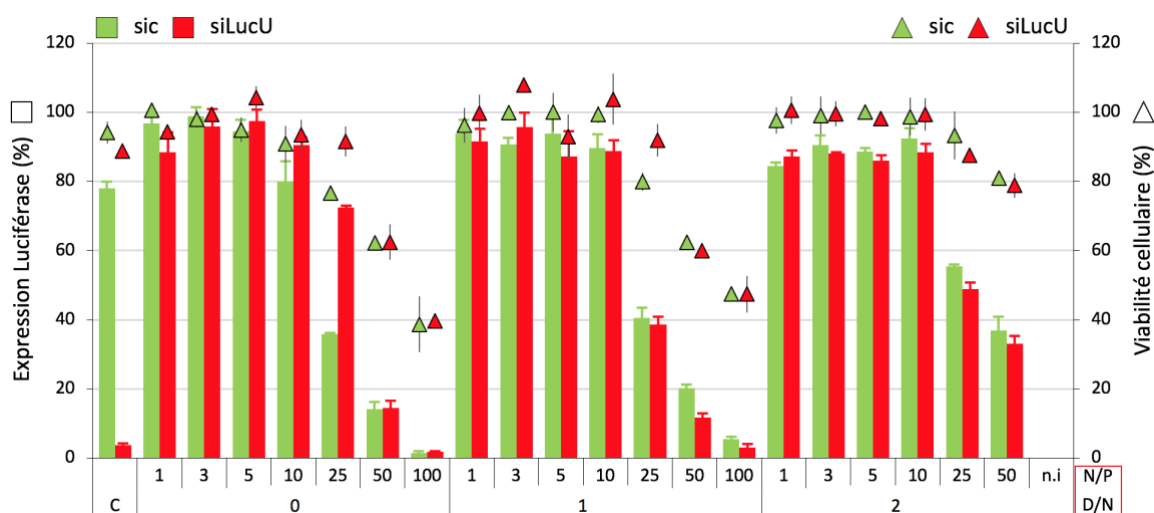


Figure 73. Profil de transfection obtenu avec le vecteur M_{E12} (**4**) en mélange avec la DOPE (D/N = 0, 1 et 2).

Face à ce nouvel échec, nous avons remis en cause notre design de pro-APLs et avons envisagé la synthèse de nouveaux composés. Ceux-ci correspondent aux pro-APLs de seconde génération décrits dans le chapitre précédent.

I.3.4. Optimisation par l'emploi des pro-APLs de II^{ème} génération

La structure chimique des pro-APLs est somme toute similaire à celle des pro-DOPC, ces deux familles de composés portant le même type de substituant biolabile sur le groupe phosphate. Toutefois, une différence majeure les distingue et réside dans le nombre de chaînes grasses présentes dans la molécule. En effet, la structure d'un pro-DOPC comporte trois chaînes alkyles

distinctes, dont deux sont partie intégrante de la DOPC parent, la troisième étant introduite sur le phosphate par *O*-alkylation. Quant à eux, les pro-APLs sont des espèces bicaténaires et ne comportent que deux chaînes grasses. Nous avons donc conçu un composé pro-APL tricaténaire, le E_{Tri} (**54**), en respectant le cahier des charges initialement défini.

Par ailleurs, nous avons également développé le pro-APL E_{C-DTG} (**50**) qui porte un motif détergent (DTG) afin de faciliter l'échappement endosomal, l'utilisation de DOPE n'ayant pas été concluante dans notre cas.

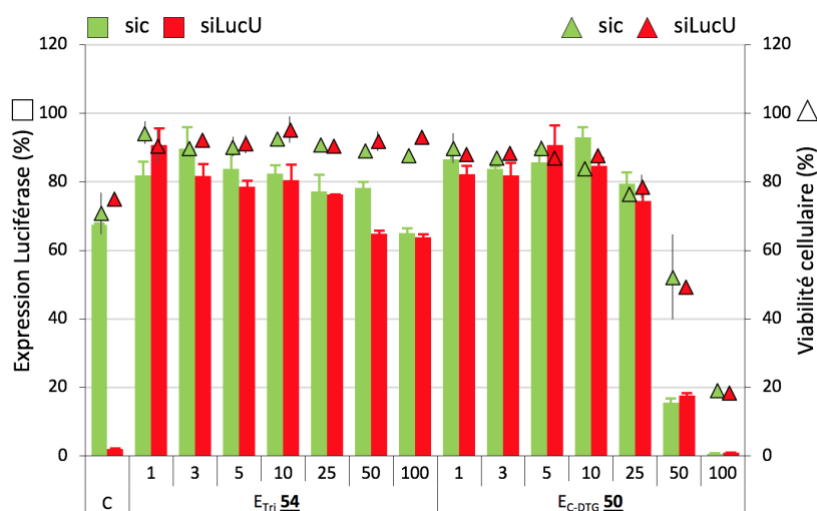


Figure 74. Profil de transfection obtenu avec les vecteurs E_{Tri} (**54**) et E_{C-DTG} (**50**).

C'est avec une grande déception que nous avons constaté qu'aucune de ces deux nouvelles constructions n'était capable de permettre une transfection significative des cellules (Figure 74). Cependant, on pourra noter que le composé E_{Tri} (**54**) ne présente aucune toxicité envers les cellules, la viabilité étant maintenue à plus 90 %, même aux rapports N/P les plus élevés. Ceci pourrait s'expliquer par un manque d'internalisation des lipoplexes ou par une l'incapacité de ces derniers à s'échapper hors de l'endosome. Faute de temps, nous n'avons pas cherché à travailler sur ces hypothèses. En comparaison, le composé E_{C-DTG} (**50**), lui, présente le profil de transfection habituel des pro-APLs, avec une absence de transfection et une toxicité du lipide dose-dépendante, ce qui semble suggérer que l'introduction du motif DTG ne favorise pas le transfert de siARN.

I.4. Conclusion sur la délivrance de siARN par les pro-APLs

L'ensemble du travail réalisé dans le cadre des essais de délivrance de siARN par les pro-APLs n'a pas fourni de résultats satisfaisants. En effet, les nombreuses tentatives d'optimisation réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque capacité de la part de ces composés à délivrer un siARN. Nous n'avons, à ce jour, aucune hypothèse à proposer pour expliquer cette absence d'efficacité.

Le fait que ces composés soient incapables de vectoriser un siARN dans une cellule en culture ne constitue toutefois pas un obstacle rédhibitoire dans notre stratégie de combothérapie antitumorale. En effet, la littérature rapporte de nombreux exemples de composés inactifs comme vecteurs de siARN, mais qui permettent néanmoins de vectoriser de l'ADN plasmidique, et inversement. Nous avons donc tout normalement poursuivi nos efforts en nous intéressant à la vectorisation d'ADN par les pro-APLs, puisque l'utilisation d'un ADN plasmidique thérapeutique, comme l'ADN codant la protéine TRAIL, s'inscrit parfaitement dans notre stratégie de combothérapie antitumorale. La suite des travaux présentés est donc le résultat de ce changement de stratégie quant à la délivrance d'acide nucléique.

II. Les pro-APLs comme vecteurs de transfection d'ADN

Compte tenu des résultats décevants obtenus en transfert de siARN, nous avons décidé d'étudier le potentiel des pro-APLs pour délivrer de l'ADN plasmidique. Comme précédemment, pour des raisons de commodité, l'activité des pro-APLs a été tout d'abord étudiée dans un système fondé sur l'utilisation du gène rapporteur de la luciférase.

II.1. Le gène rapporteur de la luciférase en transfert d'ADN

Dans le cadre de la délivrance d'un ADN plasmidique codant la luciférase, l'utilisation de lignées cellulaires classiques ne rencontre en principe aucune difficulté. L'efficacité du vecteur est déduite de l'activité du transgène par mesure de bioluminescence. Nous avons donc mis en place la culture de cellules A549 (pulmonaires humaines cancéreuses) et avons sélectionné le plasmide pCMV-GLuc (5764 paires de bases) qui code la protéine luciférase de *Gaussia princeps*.

Cette version de la luciférase diffère de la précédente (*Firefly*) dans le sens où la protéine est majoritairement excrétée des cellules qui l'ont produite (> 85 %). Ainsi, le dosage de la luciférase peut être réalisé dans le milieu extracellulaire, en utilisant le surnageant de culture. Les cellules transfectées sont ainsi préservées et peuvent être utilisées pour d'autres analyses comme le dosage des protéines (BCA), ou être bien maintenues en incubation pour un suivi cinétique d'expression. Par ailleurs, le signal de bioluminescence émis par la luciférase de *Gaussia* en présence de son substrat, la coelentérazine (Figure 75), est significativement plus fort que celui obtenu avec la luciférase de *Firefly*, de l'ordre de 10^7 RLU contre 10^5 . Il en résulte une plage de luminescence plus large et, donc, une plus grande facilité à différencier les vecteurs entre eux.

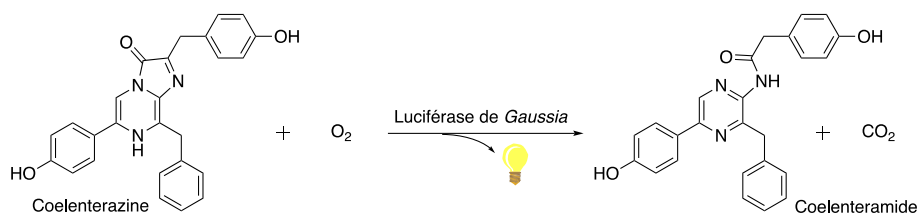


Figure 75. Réaction enzymatique entre la protéine luciférase de *Gaussia* avec son substrat et qui est à l'origine d'une émission de bioluminescence, alors quantifiable par un bioluminomètre équipé d'un photomultiplicateur.

II.2. Complexation et condensation de l'ADN par les pro-APLs

Les pro-APLs ont d'ores et déjà démontré leur capacité à complexer le siARN, mais nous avons bien entendu vérifié si c'était également le cas avec de l'ADN plasmidique. Les lipoplexes à base de pro-APLs et d'ADN sont obtenus de manière similaire à celle impliquant un siARN, par reprise d'un film lipidique à l'aide d'une solution aqueuse d'ADN (0,04 µg/µL dans le glucose à 5 %). La seule différence réside dans le temps d'incubation qui est de 30 minutes dans le cas de l'ADN. Par ailleurs, les rapports N/P et D/N gardent leur signification (à la différence que la concentration donnée pour l'ADN correspond à la concentration en phosphate) :

$$\frac{N}{P} = \frac{[\text{lipide cationique}]}{[\text{charge négative de l'ADN}]} \quad \text{et} \quad \frac{D}{N} = \frac{[\text{DOPE}]}{[\text{lipide cationique}]}$$

avec la concentration en mol/L

L'analyse des lipoplexes d'ADN formés à partir des composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), sur gel d'électrophorèse, confirme que l'ADN est bien complexé et condensé par les pro-APLs (Figure 76). La complexation complète est obtenue pour des rapports N/P proches de 2. Par ailleurs, nous avons également pu constater que l'introduction de DOPE dans les formulations (D/N de 1) ne modifie pas le potentiel de complexation des pro-APLs.

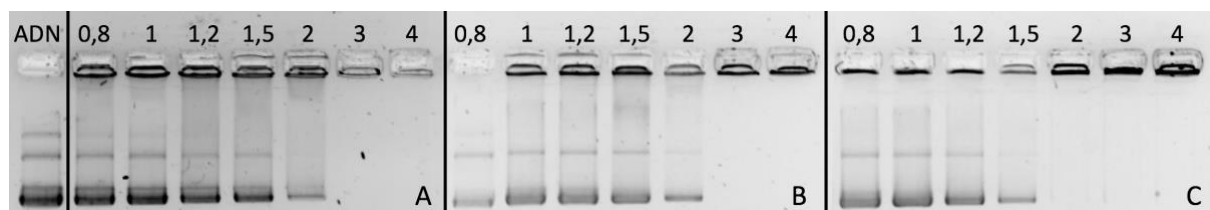


Figure 76. Électrophorèses sur gel d'agarose réalisées avec des lipoplexes d'ADN préparés à partir de M_{E12} (**4**) (gel A), P_{E12} (**13**) (gel B), et E_{E12} (**18**) (gel C), pour des N/P allant de 0,8 à 4, avec l'ADN nu comme contrôle.

Parallèlement à ces électrophorèses, des mesures de la taille et de la charge des particules ont été effectuées (Tableau 7). Pour le composé M_{E12} (**4**) au rapport N/P de 1, la charge des particules est négative (- 39 mV), ce qui est en accord avec le résultat de l'électrophorèse indiquant une complexation incomplète à ce rapport N/P. Au rapport N/P de 3, pour lequel la complexation est totale, la charge des

particules est en effet positive (+ 32 mV). Ceci est également valable pour les deux autres composés, puisque la charge des particules issues de P_{E12} (**13**) et de E_{E12} (**18**) s'établit respectivement à + 36 mV et + 46 mV. Le potentiel ζ significativement plus élevé pour les lipoplexes à base de E_{E12} (**18**) peut s'expliquer par le fait que ce pro-APL offre une complexation totale de l'ADN à partir d'un rapport N/P compris entre 1,5 et 2, alors qu'il se situe entre 2 et 3 pour les deux autres pro-APLs.

Tableau 7. Taille et charge de lipoplexes d'ADN, obtenus avec les pro-APLs M_{E12} (**4**), P_{E12} (**13**), E_{E12} (**18**).

Pro-APL	N/P	Charge (mV)	Taille (nm)
M _{E12} 4	1	- 39 ± 2	102 ± 6
	3	+ 32 ± 2	140 ± 6
P _{E12} 13	3	+ 36 ± 1	145 ± 3
E _{E12} 18	3	+ 46 ± 1	138 ± 4

II.3. Résultats de vectorisation et optimisations

Sans plus attendre, nous avons engagé nos pro-APLs dans des expériences de transfection avec le plasmide pCMV-GLuc sur la lignée cellulaire A549. Nous avons conduit ces expériences en plaques de 96 puits, en déposant 0,4 µg d'ADN complexé dans chaque puitsensemencé la veille avec 6.000 cellules, dans 100 µL de milieu de culture supplémenté à 10 % de sérum (cette concentration cellulaire garantit que la confluence n'est pas atteinte à la fin de l'expérience).

L'efficacité de transfection des lipoplexes est évaluée pour des rapports N/P de 1, 3 et 5, après 24 h d'incubation à 37 °C. Pour ce faire, un aliquot du surnageant (20 µL) est prélevé dans chaque puits pour réaliser les mesures de bioluminescence. La viabilité cellulaire est déterminée par dosage des protéines dans le tapis cellulaire, ce qui permet également de pondérer l'activité de transfection, alors exprimée en RLU/mg de protéine.

Un contrôle positif est obtenu avec l'agent de transfection commercial LipofectAMINE® 2000 (noté Lipo dans les graphiques), utilisé avec une concentration finale en ADN de 0,1 µg par puits, ce qui correspond aux recommandations données par le fournisseur pour ce type d'agent de transfection (Thermo Fisher Scientific). La quantité de matériel génétique est certes plus faible que dans le cas de nos composés, mais la toxicité de cet agent de transfection est telle qu'il n'est pas très pertinent de l'utiliser dans les mêmes conditions que nos pro-APLs (Figure 77). Par ailleurs, l'activité de transfection brute (RLU/puits) reste constante à environ 1.10⁹ sur la plage de 0,1 à 0,4 µg d'ADN, mais l'activité de transfection pondérée (RLU/mg de protéines), elle, est augmentée (respectivement 1,9.10¹¹ ; 3,7.10¹¹ ; 6,8.10¹¹ et 8,6.10¹¹). L'influence de la cytotoxicité sur les niveaux d'expression n'est donc pas négligeable et l'interprétation des résultats de transfection peut donc être modifiée. Ainsi, il nous est apparu plus pertinent de présenter les résultats de transfection en RLU/mg de protéines pour ne pas sous-évaluer l'activité de transfection des composés testés.

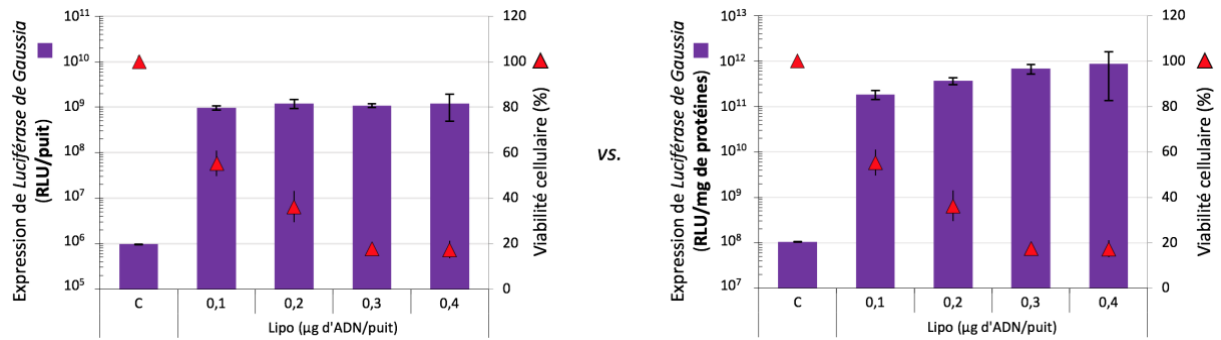


Figure 77. Profil de transfection de la LipofectAMINE® 2000, exprimé en RLU/puits (gauche) ou en RLU/mg de protéines (droite), pour une charge d'ADN pCMV-GLuc de 0,1 à 0,4 µg d'ADN/puits. Les cellules A549 non traitées (C) constituent le contrôle négatif.

II.3.1. Influence de la nature du lien clivable

Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité de transfection des pro-APLs de 1^{ère} génération. Afin de comparer l'efficacité des pro-APLs à celle du contrôle positif (LipofectAMINE 2000), nous avons défini un indice d'efficacité (I_{eff}) qui répond à la formule :

$$I_{eff} = \frac{\text{Activité (Lipo)}}{\text{Activité (pro-APL)}}$$

où les activités sont exprimées en RLU/mg de protéine.

Plus cet indice est faible, plus le vecteur est performant, un indice de 1 indiquant une activité similaire à celle du contrôle positif. Avec un indice supérieur à 100, un vecteur est considéré comme n'ayant aucune activité significative et l'indice associé aux cellules non traitées est de 7000. Les indices I_{eff} indiqués dans le Tableau 8 sont le résultat de moyennes obtenues pour un à trois triplicats (transfections indépendantes).

Tableau 8. Indice d'efficacité de transfection (I_{eff}) calculé pour les 23 pro-APLs de 1^{ère} génération, formulés avec pCMV-Gluc dans des rapports N/P de 1, 3 et 5.

Pro-miltéfosines (N/P)				Pro-érufosines (N/P)				Pro-pérfosines (N/P)			
	1	3	5		1	3	5		1	3	5
M_{E12} 4	>100	>100	79	E_{E12} 18	>100	>100	>100	P_{E12} 13	>100	>100	>100
M_{E'12} 5	>100	>100	>100	E_{E'12} 19	>100	>100	>100				
M_{C12} 6	>100	>100	>100	E_{C12} 20	>100	>100	>100	P_{C12} 14	>100	>100	>100
M_{C'12} 7	>100	95	>100	E_{C'12} 21	>100	>100	>100	P_{C'12} 15	>100	>100	>100
M_{E18:1} 8	>100	>100	>100	E_{E18:1} 22	>100	64	21				
M_{E'18:1} 9	>100	48	>100	E_{E'18:1} 23	>100	>100	>100				
M_{C18:1} 10	>100	74	>100	E_{C18:1} 24	>100	>100	>100	P_{C18:1} 16	>100	>100	>100
M_{C'18:1} 11	>100	>100	>100	E_{C'18:1} 25	>100	>100	>100				
M_{I2} 12	>100	>100	87	E_{I2} 26	>100	34	>100	P_{I2} 17	>100	>100	>100

Les résultats indiquent que l'efficacité de transfection avec les pro-APLs n'est globalement pas très importante, pour la plage des rapports N/P testés. En effet, seuls 7 composés présentent un I_{eff} notable, sur les 23 étudiés. Bien que les résultats correspondants ne figurent pas dans le Tableau 8, aucun gain d'efficacité n'a été détecté pour des rapports N/P supérieurs et allant jusqu'à 10. Donc, contrairement à ce que nous avons constaté avec les siARN, les pro-APLs démontrent une certaine activité de transfection avec de l'ADN, ce qui nous a beaucoup rassurés. D'après les profils de transfection obtenus, il semble qu'un N/P de 3 à 5 soit nécessaire pour que les lipoplexes puissent susciter une réponse en transfection.

Ces résultats préliminaires ne permettant pas encore d'établir un quelconque lien entre la nature du lien clivable et l'efficacité de transfection, nous avons procédé à un travail d'optimisation plus fin de nos formulations.

II.3.2. Étude de l'influence de la DOPE dans les formulations

Comme dans le cas du siARN (*vide supra*), la DOPE est ajoutée aux pro-APLs avant l'étape de formation du film lipidique. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la présence d'un équivalent molaire de DOPE dans la formulation (D/N = 1) (Tableau 9).

Tableau 9. Indice d'efficacité de transfection (I_{eff}) calculé pour les 23 pro-APLs de 1^{ère} génération formulés avec un équivalent de DOPE (D/N = 1) et le plasmide pCMV-Gluc, dans des rapports N/P de 1, 3.

Pro-miltéfosines (N/P)				Pro-érufosines (N/P)				Pro-périfosines (N/P)						
	1	3	5		1	3	5		1	3	5			
M_{E12}	4	>100	7	7	E_{E12}	18	>100	5	7	P_{E12}	13	>100	7	8
M_{E'12}	5	>100	22	>100	E_{E'12}	19	>100	17	49					
M_{C12}	6	>100	74	99	E_{C12}	20	>100	30	32	P_{C12}	14	>100	38	>100
M_{C'12}	7	>100	45	>100	E_{C'12}	21	>100	35	61	P_{C'12}	15	>100	>100	>100
M_{E18:1}	8	>100	25	88	E_{E18:1}	22	>100	96	79					
M_{E'18:1}	9	>100	32	31	E_{E'18:1}	23	>100	7	27					
M_{C18:1}	10	>100	15	10	E_{C18:1}	24	>100	15	47	P_{C18:1}	16	>100	>100	>100
M_{C'18:1}	11	>100	37	17	E_{C'18:1}	25	>100	28	>100					
M₁₂	12	>100	43	>100	E₁₂	26	>100	27	53	P₁₂	17	>100	>100	70

De manière générale, les résultats obtenus en transfection d'ADN sont significativement améliorés par l'ajout d'un équivalent molaire de DOPE dans nos formulations, avec des valeurs de l'indice I_{eff} qui passent sous la barre des 100 pour tous les pro-APLs, hormis les deux pro-périfosines P_{C'12} (**15**) et P_{C18:1} (**16**).²³⁰ Par ailleurs, l'augmentation de la proportion de DOPE dans les formulations (D/N = 2, 3) n'a pas permis d'améliorer ce score et c'est la raison pour laquelle ces données ne sont pas présentées. Ces observations sont en accord avec certaines données de la littérature, qui suggèrent une courbe en cloche pour l'activité de transfection dont le maximum est atteint pour le ratio équimolaire.²³¹

Aucune efficacité de transfection n'est observée au rapport N/P de 1, ce qui confirme les résultats des électrophorèses sur gel d'agarose. En effet, le fait que ces particules soient chargées négativement constitue un obstacle à leur interaction avec la membrane plasmique et donc à leur internalisation.^{221,257} Le rapport N/P de 3 conduisant aux meilleures efficacités de transfection avec la majorité des pro-APLs, nous avons sélectionné cette condition dans les évaluations suivantes.

À partir des résultats présentés dans le Tableau 9, nous pouvons tenter d'établir des relations entre la structure chimique des pro-APLs et l'activité des particules de transfection.

Premièrement, les trois pro-APLs de type phosphotriester M₁₂ (**12**), E₁₂ (**26**) et P₁₂ (**17**) sont globalement moins efficaces que ceux qui possèdent le lien phosphoacétal. Ceci valide quelque part notre hypothèse de travail, à savoir que le lien phosphoacétal est plus sensible à l'environnement biologique et permet une libération plus efficace, et/ou avec un meilleur timing, de l'acide nucléique dans la cellule. Ces résultats sont en outre parfaitement cohérents avec ceux de notre étude de la stabilité hydrolytique des pro-APLs par RMN.

Deuxièmement, la présence d'un groupement méthyle sur l'atome de carbone acétalique ne semble pas améliorer significativement l'efficacité des pro-APLs, exception faite pour le composé E_{E18:1} (**23**) qui se trouve être 13 fois plus efficace que son homologue non substitué E_{E18:1} (**22**). Notre étude par RMN montrait que l'introduction d'un substituant sur le pont acétal accélérât la vitesse d'hydrolyse du composé sous catalyse acido-basique. Sous catalyse enzymatique, cette plus grande sensibilité pourrait se traduire par une décomplexation, voire un relargage, trop précoce de l'acide nucléique qui se trouverait ainsi exposé à une dégradation par les nucléases du milieu.

En troisième lieu, et compte tenu des précédentes observations, les pro-APLs comportant un ester de phosphoacétal avec une chaîne saturée en C₁₂ offrent systématiquement de meilleurs résultats que leurs homologues carbonate. Le résultat inverse est observé lorsque la chaîne portée par le lien biolabile est plus longue et insaturée (C_{18:1}). Quoiqu'il en soit, parmi tous les pro-APLs étudiés jusqu'ici, ce sont ceux qui contiennent le motif dodécanoate de phosphométhyle, à savoir les composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), qui se sont montrés les plus performants en termes de transfection. Nous avons donc décidé de les étudier plus en détail.

Des études impliquant des variations plus fines des rapports N/P (1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5) et D/N (0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5) ont été conduites sur ces trois composés (Figure 78). Les meilleures efficacités de transfection ont été obtenues au rapport N/P de 3, ce qui confirme nos résultats précédents. En ne considérant donc que ce rapport N/P de 3, l'expression du transgène s'est révélée légèrement plus faible avec rapport D/N de 0,5 et plus particulièrement avec P_{E12} (**13**), mais est apparue à peu près stable pour les valeurs supérieures (de 0,75 à 3).

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de fixer les rapports N/P et D/N à 3 et 1, respectivement, dans nos optimisations suivantes.

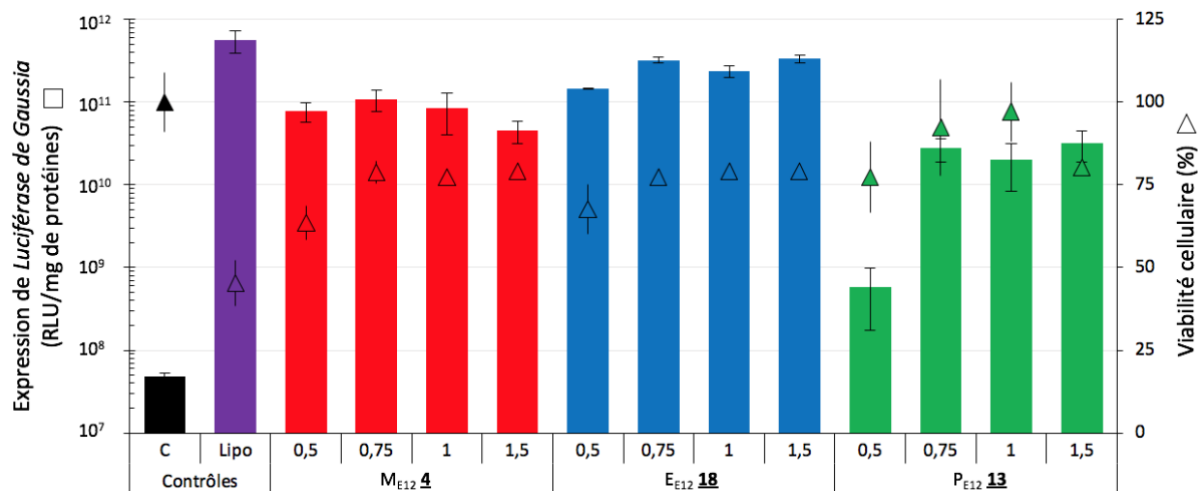


Figure 78. Profil de transfection des trois pro-APLs M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), en présence de quantités croissantes de DOPE. Le contrôle (C) correspond aux cellules A549 non traitées.

Toutefois, si des résultats intéressants ont pu être obtenus avec cette première sélection de pro-APLs, diverses investigations avaient été menées en parallèles, portant notamment sur la cinétique d’expression ou sur les conditions de formulation des complexes.

II.3.3. Étude de la cinétique d’expression du transgène

Comme nous venons donc de le dire, l’évolution de l’expression du transgène en fonction du temps a été étudiée avant que nous ayons tous les résultats sur l’influence de DOPE dans les formulations. Ceci explique pourquoi cette étude a été menée sur le composé E_{E18:1} (**23**) et non sur E_{E12} (**18**) qui aurait été plus pertinent (Figure 79).

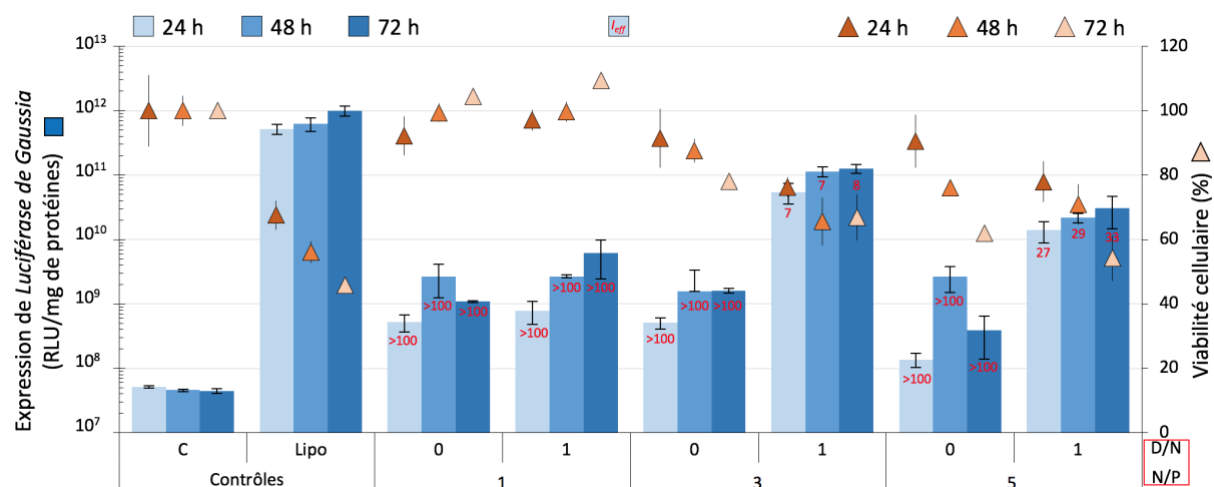


Figure 79. Évolution de l’activité de transfection (RLU/mg de protéines) du composé E_{E18:1} (**23**) au cours du temps (24, 48 et 72 h), pour les rapports N/P de 1, 3 et 5 et pour les rapport D/N de 0 et 1.

Comme on peut le voir, le composé $E_{E'18:1}$ (**23**) n'induit pas de transfection significative en l'absence de DOPE, quel que soit le rapport N/P étudié et le temps d'incubation considéré ($I_{eff} > 100$) (Figure 79). L'introduction de DOPE dans la formulation avec un rapport N/P de 3 permet d'induire une expression de gènes à un haut niveau après 24 heures d'incubation (I_{eff} de 7), alors qu'un effet un peu moins marqué est observé pour un N/P de 5 (I_{eff} de 27). Les résultats obtenus avec 2 ou 3 équivalents de DOPE sont similaires et ne sont pas représentés dans le Tableau 10. Dans ces conditions, le niveau d'expression du transgène est maintenu sur toute la plage de temps étudiée (à 48 h, I_{eff} est de 7 et 29 pour un N/P de 3 et 5, respectivement ; à 72 h, il est de 8 et 33). La lignée A549 voyant sa population multipliée par 2 toutes les 24 heures, cela suggère que l'expression du transgène perdure à travers les cycles de divisions cellulaires. Une augmentation de la toxicité des particules est cependant observée au cours du temps, ce qui est normal compte tenu du fait que les complexes sont toujours présents dans le milieu et qu'ils peuvent progressivement agir sur les cellules.

Compte tenu de cela, nous avons conservé une durée d'incubation de 24 heures pour nos expériences de transfection "standard".

Tableau 10. Évolution de l'activité de transfection (I_{eff}) du composé $E_{E'18:1}$ (**23**) au cours du temps, pour différents rapports N/P et D/N.

$I_{efficacité}$		Temps d'incubation (h)								
		24			48			72		
N/P		1	3	5	1	3	5	1	3	5
D/N	0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	1	>100	7	27	>100	7	29	>100	8	33

Un dernier commentaire peut être fait à propos des niveaux de transfection obtenus pour un rapport N/P de 1, bien que ces derniers soient très faibles ($I_{eff} > 100$). En effet, une augmentation de l'efficacité de transfection peut être constatée après 24, 48 et 72 heures d'incubation (Figure 79). Nous avons précédemment rappelé que pour un tel rapport N/P, le potentiel de transfection des particules est très limité, potentiellement en raison de leur charge négative, toutefois il est envisageable que le recrutement des protéines du milieu, et donc la « protéin corona », évolue au cours du temps en faveur d'une internalisation des ces particules. Ceci n'est qu'une supposition et aucune investigation supplémentaire n'a été menée dans ce sens.

II.3.4. Étude des conditions de formulation des lipoplexes d'ADN

II.3.4.1 Milieu d'incubation

Le composé $E_{E'18:1}$ (**23**) a également fait l'objet d'une étude de l'influence du milieu de formation des lipoplexes sur l'efficacité de transfection. Des préparations à base de $E_{E'18:1}$ (**23**) ont donc été réalisées dans trois milieux différents : le milieu habituel (glucose à 5 %), un milieu NaCl

150 mM, et un milieu OPTI-MEM (préconisé pour la préparation du contrôle avec la LipofectAMINE® 2000). Hormis le milieu utilisé pour la fabrication des lipoplexes, ces expériences de transfection ont été réalisées dans les conditions habituelles. Les résultats obtenus avec les trois préparations de lipoplexes présentent de légères différences, le niveau de transfection le plus élevé étant atteint avec les lipoplexes préparés dans du glucose à 5 % (Tableau 11).

À la vue de ces résultats, il a donc été décidé ne pas modifier la nature du milieu de complexation.

Tableau 11. Efficacité de transfection (I_{eff}) obtenue avec le pro-APL $E_{E'18:1}$ (**23**), en fonction du milieu dans lequel les lipoplexes ont été préparés (D/N = 1).

$I_{efficacité}$	N/P		
	1	3	5
Glucose 5 %	>100	7	27
NaCl 150 mM	>100	48	43
OPTI-MEM	>100	15	26

II.3.4.2 Température d'incubation

Dans le but d'identifier une quelconque influence de la température sur la formation des lipoplexes et les potentielles répercussions que cela pourrait avoir sur leur efficacité de transfection, une étude comparative a été menée. Celle-ci était essentiellement motivée par le fait que les lipides à chaîne(s) saturée(s) sont connus pour présenter des températures de transition de phase qui peuvent se situer dans une gamme pouvant aller de +10 à +50 °C selon leur longueur. Considérant qu'un lipide cationique formulé en dessous ou au-dessus de sa température de transition de phase peut donner des assemblages différents avec de l'ADN, il nous a semblé intéressant d'évaluer des lipoplexes préparés à différentes températures.

Diverses préparations de complexes M_{E12} /ADN ont été réalisées en duplicats (D/N : 0 et 1 ; N/P : de 1 à 5). Une série a été placée dans un incubateur à 37 °C pendant 20 minutes, tandis que l'autre a été incubée à la température de la salle de culture (25 °C). Les lipoplexes ont ensuite été déposés sur les cellules pour une expérience de transfection standard. À l'issue des 24 heures d'incubation, le dosage de l'expression de la luciférase et la quantification des protéines ont donné des résultats strictement équivalents avec les deux séries de lipoplexes.

Ceci permet de conclure que la température d'incubation des lipoplexes préparés avec le lipide M_{E12} (**4**) n'a pas d'effet significatif sur l'efficacité de transfection de ces derniers.

II.3.5. Étude de l'influence de la chaîne alkyle du motif clivable

Nous avons vu précédemment que la nature chimique du lien clivable implanté sur l'APL revêt une grande importance et que les esters de phosphoacétal conduisaient aux meilleurs résultats en transfection. Tout naturellement, nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la longueur de

la chaîne acyle présente sur le lien clivable en étudiant une série de 9 composés en série pro-érufosine (Figure 80). Cette étude a été conduite en parallèle sur la lignée cellulaire A549 et sur la lignée 16HBE (cellules pulmonaires non cancéreuses immortalisées),³⁴⁶ cette lignée pouvant être utilisée comme modèle de cellules saines et sa culture étant beaucoup plus facile que celle de cellules primaires.

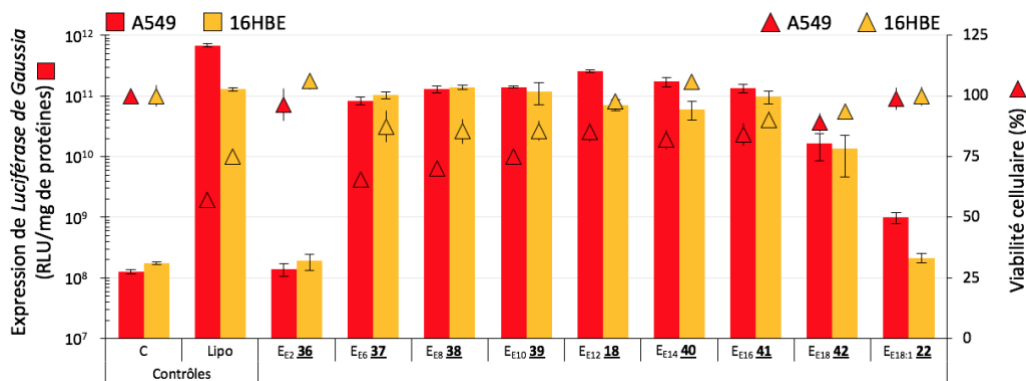


Figure 80. Profil de transfection obtenu avec les différentes pro-érufosines E_{En} sur cellules A549 et 16HBE, pour un rapport N/P de 3, un rapport D/N de 1.

Les résultats de transfection obtenus dans les deux lignées sont très similaires, quoiqu'un peu plus marqués sur la lignée 16HBE, et montrent tout d'abord que la pro-érufosine avec la chaîne la plus courte, E_{E2} (**36**) ne présente aucune activité en transfert de gènes, alors qu'une excellente activité est observée avec les chaînes plus longues (C_6 et plus). Globalement, l'allongement progressif de la chaîne alkyle de 2 et 18 atomes de carbone se traduit par des activités qui se distribuent sur une courbe en cloche, le maximum étant atteint pour une chaîne à 12 atomes de carbone. L'introduction d'une insaturation dans la chaîne la plus longue conduit à une perte majeure de l'efficacité de transfection (cf. E_{E18} et $E_{E18:1}$).

En termes de toxicité, on constate globalement que celle-ci diminue lorsque la longueur de chaîne augmente. Il y a une exception cependant avec le pro-APL E_{E2} (**36**) qui présente la chaîne la plus courte mais est néanmoins parfaitement toléré par les cellules. On remarque également que la toxicité n'est pas corrélée au niveau de transfection, ce qui est contraire à ce qui est habituellement observé. Elle n'est pas non plus corrélée à la CMC des pro-APLs (cf. *Chapitre 2 - III.3. CMC des pro-APLs et biocompatibilité*) mais pourrait éventuellement l'être avec celle des acides gras issus de l'hydrolyse de ces derniers. La toxicité des composés est par ailleurs moins importante dans le cas des cellules 16HBE, pour un taux de transfection équivalent.

Les deux lignées pourraient donc constituer un modèle cellulaire intéressant dans le cadre de notre combothérapie antitumorale, avec la lignée cancéreuse A549 potentiellement plus réceptive à l'activité des APLs que la lignée non cancéreuse 16HBE. Compte tenu de cela, le composé E_{E2} (**36**) pourrait être considéré comme le plus sélectif vis-à-vis des cellules tumorales (avec une toxicité de 34 % sur la lignée tumorale contre 12 % sur la lignée saine). C'est cependant le composé E_{E12} (**18**)

que nous retiendrons pour nos études ultérieures car il semble présenter un meilleur compromis entre activité de transfection et toxicité cellulaire.

II.3.6. Études des pro-APLs de II^{ème} génération

II.3.6.1 Pro-érufosine tricaténaire et conjugués érufosine-DTG

Globalement, les composés E_{C-DTG} (**50**), E_{DTG} (**51**) et E_{Tri} (**54**) se sont révélés peu efficaces en tant que vecteur de transfection (Figure 81). Les meilleures performances sont atteintes avec le pro-érufosine tricaténaire, en présence de DOPE (D/N de 1) et au rapport N/P de 5, mais elles sont tout de même 7 à 35 fois inférieures à celles atteintes avec le composé E_{E12} (**18**). On notera également que les conjugués érufosine-DTG sont significativement plus toxiques que les autres pro-APLs, ce qui est en accord avec un potentiel relargage *in situ* d'un agent tensio-actif capable de déstabiliser les membranes cellulaires. La toxicité suscitée par l'homologue phosphotriesters E_{DTG} (**51**) est d'ailleurs plus modérée (39 %), ce qui révèle à nouveau une différence quant à la cinétique d'hydrolyse entre les composés de type phosphoacétal et phosphotriesters. La toxicité de ces composés sur la lignée 16HBE s'est avérée une nouvelle fois plus faible que sur les cellules A549 (résultats non présentés) mais, compte tenu du seul critère de l'activité de transfection, ces composés n'ont pas été retenus dans nos études ultérieures.

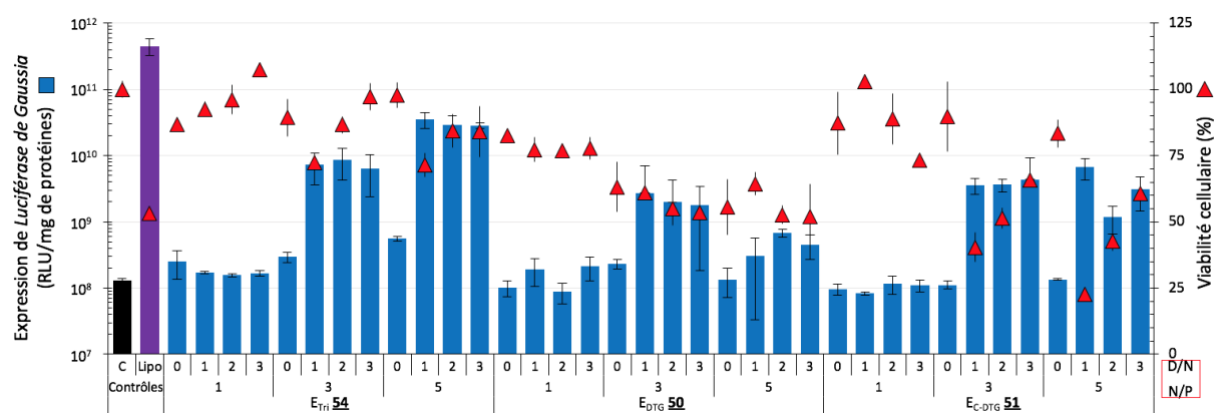


Figure 81. Profil de transfection des pro-érufosine de II^{ème} génération, sur cellules A549.

II.3.6.2 Pro-érufosine gemini

L'évaluation du composé E_{Gem} (**58**) en transfert d'ADN révèle une efficacité assez modeste mais le profil de transfection de ce pro-APL mérite d'être discuté (Figure 82).

Aucune activité de transfection n'est observée pour des rapports D/N de 0 et de 1 et ceci, quel que soit le rapport N/P testé, mais une certaine toxicité des particules, dose-dépendante, est néanmoins observable. Une activité de transfection apparaît pour des rapports D/N supérieurs (2 et 3), mais celle-ci reste modérée et inférieure d'un facteur 10 aux meilleures activités enregistrées avec les pro-APLs jusqu'ici. Pour cette raison, il n'a pas été retenu pour les expériences suivantes.

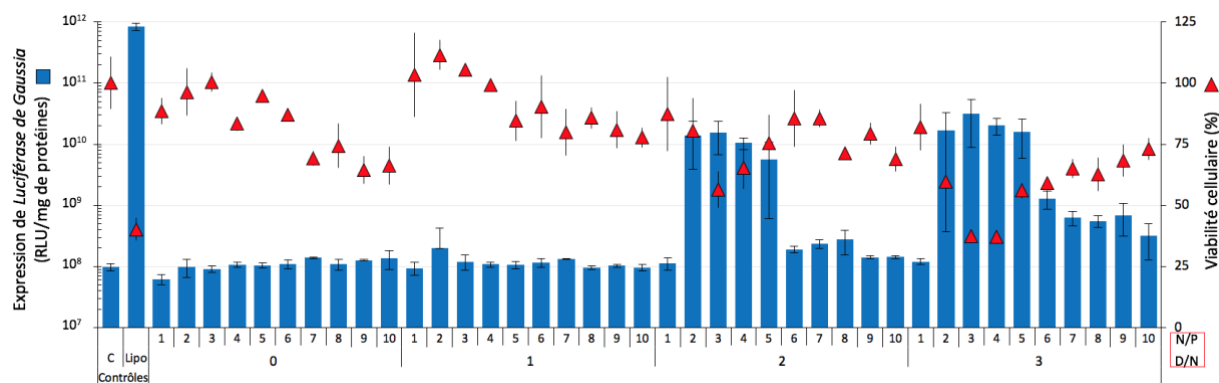


Figure 82. Profil de transfection du pro-érufosine gemini E_{Gem} (**58**), sur cellules A549 et pour une large gamme de rapports N/P (entre 1 et 10) et D/N (0 ; 1 ; 2 ; 3).

II.3.7. Optimisation 3 candidats retenus

Nous avons *in fine* retenu trois composés pro-APLs à l'issue des diverses tentatives d'optimisation décrites ci-dessus. Il s'agit des trois esters de phosphoacétal en C₁₂, les composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**). À partir de leur profil de transfection initial (Figure 83), nous avons souhaité étudier certains paramètres en prévision de l'évolution de notre modèle de délivrance d'ADN (pCMV-GLuc) vers un modèle thérapeutique (pEGFP-TRAIL).

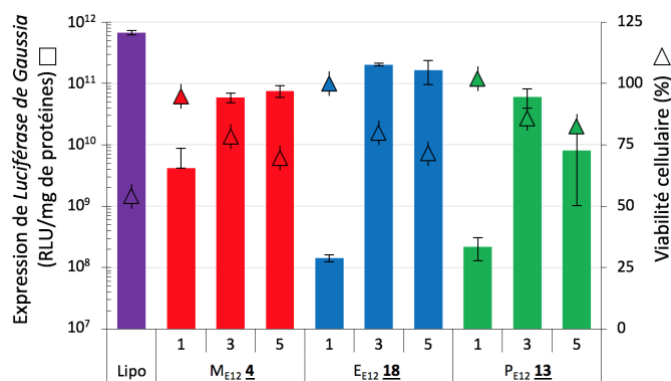


Figure 83. Résumé des profils de transfection des 3 candidats pro-APLs retenus (cellules A549).

II.3.7.1 Optimisation de la dose d'ADN délivrée

Nous avons jusqu'ici réalisé l'intégralité des expériences de transfection en plaques de 96 puits, en utilisant une dose de 0,4 µg d'ADN/puits. Afin de comparer la performance de nos pro-APLs à celle de la LipofectAMINE® 2000, nous avons réalisé une étude de dose-réponse. Des lipoplexes ont donc été formulés avec le composé E_{E12} (**18**), dans une large gamme de rapports N/P et un rapport D/N fixé à 1, avec une dose d'ADN variant de 0,1 à 0,4 µg par puits (Figure 84).

Les résultats de transfection obtenus indiquent que le taux maximal d'expression du transgène varie assez peu avec la dose d'ADN lorsque le rapport N/P est supérieur à 2, et un excellent niveau de transfection est atteint avec une dose de 0,2 µg/puits ($I_{\text{efficacité}} = 4$). Cependant, l'efficacité de transfection est plus amplement affectée par l'utilisation d'une dose de 0,1 µg/puit (baisse d'un

facteur ~ 5 , $I_{\text{efficacité}} = 15$), bien que le signal soit tout de même plus important que celui fourni par la majorité des pro-APLs testés précédemment et pour une charge en ADN de 0,4 $\mu\text{g/puit}$.

Par ailleurs, il peut être mentionné qu'un décalage progressif du N/P_{optimal} en fonction de la dose d'ADN déposée est observable. Ceci pourrait s'expliquer par le fait de devoir compenser la diminution de la concentration en espèces cationiques [pro-APLs] vis-à-vis des protéines du milieu qui peuvent interagir avec les particules de transfection.²⁵⁷Ces diverses observations et conclusions ont également pu être faites dans le cas des composés M_{E12} (**4**) et P_{E12} (**13**).

Ainsi, les trois composés peuvent être employés au ratios N/P de 3 et D/N de 1, à la dose de 0,2 μg d'ADN/puit, sans perte d'activité de transfection significative.

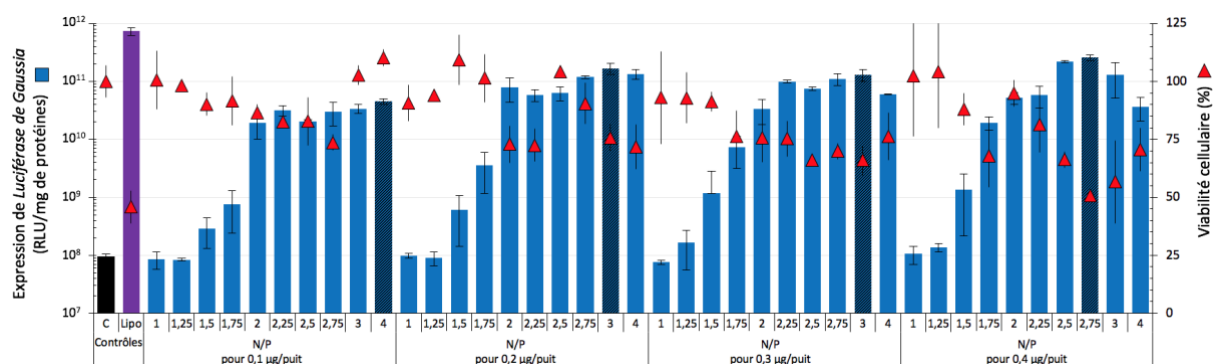


Figure 84. Profil de transfection du pro-APL E_{E12} (**18**), en fonction de la dose d'ADN utilisée (cellules A549).

II.3.7.2 Tolérance au SVF

Toutes les expériences de transfection présentées dans ce manuscrit ont été réalisées en présence de sérum (10 %). Dans un souci de meilleure adéquation avec une stratégie à visée thérapeutique, nous avons souhaité connaître le niveau de tolérance de nos composés vis-à-vis du sérum, celui-ci représentant jusqu'à 55 % du volume sanguin. Des expériences de transfection ont donc été réalisées selon le protocole standard excepté que, juste avant le dépôt des lipoplexes sur les cellules (N/P = 3 ; D/N = 1 ; de 0,4 et 0,2 μg d'ADN par puits), le surnageant contenant 10 % de sérum a été remplacé par du milieu de culture en contenant de 10 à 75 % (Figure 85).

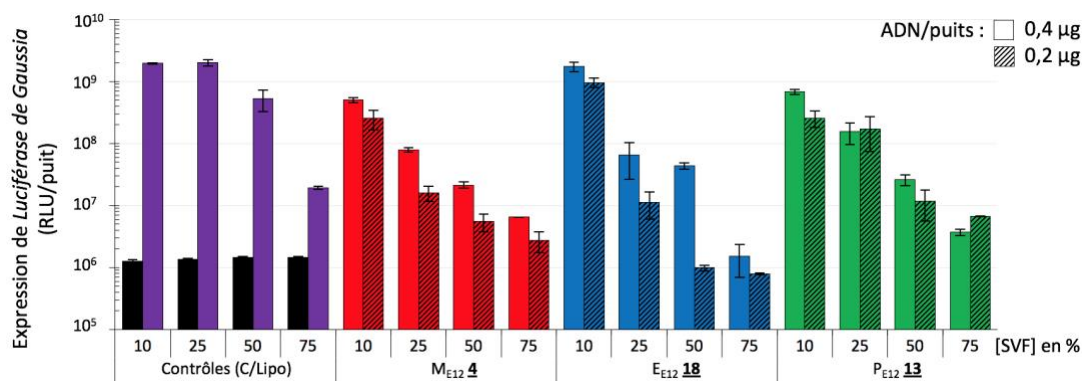


Figure 85. Profil de transfection des 3 pro-APLs (N/P de 3 ; D/N de 1) en fonction de la concentration en sérum (cellules A549).

Les résultats montrent que l'efficacité de transfection baisse progressivement lorsque la concentration en sérum augmente. Cette baisse d'activité est facilement explicable par la quantité croissante de protéines présentes dans le milieu et pouvant interférer avec les complexes en formant une « protein corona » qui masque leur caractère cationique et diminue leur internalisation cellulaire.²⁷⁹ Les résultats montrent donc que les composés pro-APLs sont en mesure de délivrer l'ADN aux cellules même en présence de concentrations importantes en sérum, moyennant une perte continue de l'efficacité de transfection. On notera d'ailleurs que cette perte est plus marquée que celle observée avec l'agent de transfection commercial. Malgré cela, les résultats obtenus avec les pro-APLs sont très concluants, de nombreux vecteurs utilisés *in vitro* nécessitant d'être employés en l'absence de sérum pendant quelques heures pour susciter un niveau de transfection significatif.

II.4. Conclusion sur la délivrance d'ADN

L'ensemble du travail fourni dans le cadre de la délivrance d'ADN a mené à l'obtention de résultats tout à fait satisfaisants. Bien que l'emploi d'un adjuvant, la DOPE, soit nécessaire pour obtenir de hauts niveaux de transfection, les pro-APLs constituent de bons vecteurs d'ADN. De plus, l'efficacité de transfection des composés étant modulable selon la structure de ces derniers, des relations de structure-activité ont pu être réalisées sur un échantillonnage de 34 pro-APLs. De ces relations, il est apparu que l'introduction d'un même motif clivable, le phosphoacétal de dodécanoyle, sur les trois différents APLs a conduit aux trois vecteurs les plus performants : M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**).

Plusieurs optimisations ont été réalisées afin d'améliorer la formulation de nos composés et envisager l'utilisation d'un plasmide d'ADN d'intérêt, codant la protéine TRAIL. Les conditions retenues pour ces expériences sont une dose d'ADN de 0,2 µg/puits, un rapport N/P de 3 et un rapport D/N de 1.

Toutefois, avant de présenter les résultats obtenus dans le cadre d'une transfection thérapeutique, nous allons nous intéresser de plus près à la cytotoxicité des pro-APLs.

III. Les pro-APLs comme prodrogues antitumorales

III.1. Toxicité des APLs et des pro-APLs sur les cellules pulmonaires

À notre connaissance, la littérature ne fait mention d'aucun exemple où une sélectivité de la part des APLs aurait été observée entre cellules tumorales et cellules saines dans le cas des tumeurs solides et, *a fortiori*, dans celui des tumeurs pulmonaires. Par ailleurs, les raisons de la sélectivité d'action des APLs pour les cellules sanguines cancéreuses ne sont pas encore élucidées, bien que des hypothèses suggèrent un rôle de la perméabilité membranaire.¹⁴⁰⁻¹⁴² Ainsi, l'étude

toxicologique des APLs et de nos pro-APLs ne devrait pas démontrer de différence fondamentale en termes d'activité antitumorale sur les deux lignées cancéreuses A549 et H292, et sur la lignée non cancéreuse 16HBE. Nous avons toutefois décidé de nous en assurer.

Des solutions liposomales d'APLs et de pro-APLs à différentes concentrations ont donc été mises en présence de cellules, préalablement disposés dans des plaques à 96 puits. La viabilité cellulaire a été mesurée après une exposition de 24 heures, afin de déterminer la concentration IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) nécessaire pour induire la mort de 50 % du matériel cellulaire (Tableau 12).

D'une manière générale, il est très difficile de dégager une tendance claire dans les résultats obtenus en raison des écarts types qui sont relativement grands et reflètent une forte variabilité des expériences. Chacune d'elle a été réalisée en triplicat, à deux ou trois reprises, pour pouvoir dégager, malgré tout, une information statistiquement significative et exploitable.

Tableau 12. Activité antitumorale (IC_{50}) des APLs et pro-APLs évaluée après 24 heures d'incubation avec les cellules A549, H292 et 16HBE.

IC_{50} (μ M)	Miltéfosine et pro-miltéfosines			Érufosine et pro-érufosines				Pérfosine et pro-pérfosines		
Cellules	M 1	M_{E12} 4	M₁₂ 12	E 3	E_{E12} 18	E₁₂ 26	E_{Gem} 58	P 2	P_{E12} 13	P₁₂ 17
A549	77 ± 15	39 ± 16	46 ± 11	60 ± 9	164 ± 26	80 ± 6	65 ± 7	127 ± 39	139 ± 4	56 ± 7
H292	70 ± 9	52 ± 28	56 ± 7	46 ± 15	125 ± 25	117 ± 15	47 ± 9	–	168 ± 7	63 ± 5
16HBE	73 ± 8	69 ± 26	107 ± 14	20 ± 6	146 ± 45	143 ± 30	45 ± 14	116 ± 33	231 ± 70	72 ± 7

Concernant les APLs, les résultats ne révèlent en effet aucune sélectivité d'action vis-à-vis des lignées cancéreuses puisque les IC_{50} mesurées dans les lignées cancéreuses A549 et H292 ne sont pas significativement plus basses que celle mesurée dans la lignée normale 16HBE. Dans le cas de l'érufosine, c'est même plutôt l'inverse qui est observé.

En ce qui concerne les composés pro-APLs, nous nous sommes focalisés sur les trois phosphoacétals retenus à l'issue de nos évaluations en transfert de gènes (**M_{E12} (4)**, **E_{E12} (18)** et **P_{E12} (13)**), ainsi que leurs homologues phosphotriesters (**M₁₂ (12)**, **E₁₂ (26)** et **P₁₂ (17)**). Les données recueillies ne présentent pas de tendance générale entre les différentes séries de composés. En effet, les pro-miltéfosines apparaissent légèrement plus cytotoxiques que leur APL parent, avec une possible préférence d'action pour les deux lignées cancéreuses, légèrement plus marquée pour le phosphotriester **M₁₂ (12)** que pour le phosphoacétal **M_{E12} (4)**. Dans le cas des pro-érufosines, les composés phosphotriester **E₁₂ (26)** et phosphoacétal **E_{E12} (18)** semblent significativement moins cytotoxiques que l'érufosine. Il n'est, par contre, pas possible de conclure à une éventuelle sélectivité vis-à-vis des cellules saines, du fait de la taille des écarts-type. On notera également que le composé **E_{Gem} (58)** présente une cytotoxicité très similaire à celle de l'érufosine sur les cellules cancéreuses (65 et 47 μ M contre 60 et 46 μ M, sur A549 et H292, respectivement) mais semble deux fois mieux toléré par les cellules saines (45 μ M vs. 20 μ M). Enfin, l'analyse de l'activité des pro-

périfosines ne permet aucune conclusion particulière si ce n'est que les cytotoxicités mesurées sont assez variables.

D'un point de vue général, deux conclusions majeures peuvent être tirées de ces expériences. En premier lieu, elles révèlent qu'il n'a pas de diminution significative de cytotoxicité entre les APLs et leurs prodrogues. En second lieu et de manière assez inattendue, il apparaît que les composés *a priori* les plus robustes vis-à-vis de l'hydrolyse (M_{12} (**12**), E_{12} (**26**) et P_{12} (**17**)) sont plus cytotoxiques que leurs homologues biolabiles (M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**)).

En l'état, il n'est cependant pas possible de dire si la cytotoxicité observée pour les pro-APLs est une toxicité intrinsèque de ces composés ou si elle résulte de leur hydrolyse en APLs. Afin d'explorer cette piste, un suivi cinétique a été réalisé avec le pro-miltéfosine M_{C12} (**6**). La cytotoxicité a été mesurée dans la lignée A549, à 24, 48 et 72 h et s'est révélée faiblement supérieure à celle mesurée pour la miltéfosine parent (57, 53 et 41 μ M vs. 80, 70 et 50 μ M, respectivement). Bien qu'il soit difficile d'établir de réelle conclusion, il apparaît néanmoins que, quel que soit l'origine de la cytotoxicité des pro-APLs, celle-ci s'exerce avec un profil assez similaire à celle des APLs. Les variations observées pourraient être dues à la cinétique d'hydrolyse des prodrogues mais pourraient également résulter d'une différence d'adressage dans la cellule.

Les actifs thérapeutiques qui nous intéressent plus particulièrement dans le cadre de cette thèse sont les lipoplexes formulés avec les pro-APLs. En conséquence, nous nous sommes ensuite intéressés au profil de toxicité de ces lipoplexes et non plus des lipides nus.

L'étude de la toxicité des particules de transfection a été conduite sur les lignées A549 et 16HBE, à partir de lipoplexes formés avec les pro-APLs M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), avec un rapport N/P de 3 et un rapport D/N de 1. La gamme de concentration en lipoplexes a été obtenue par hydratation de films lipidiques indépendants par des solutions d'ADN indépendantes, et non par des dilutions successives. Cette précaution prise quant à la préparation des lipoplexes est le résultat d'essais préliminaires qui ont montré la difficulté de former des solutions homogènes de lipoplexes à forte concentration, avec les conséquences qui pourraient en découler lors des étapes de dilution en cascade habituellement réalisées pour ce genre d'expérience. Une fois formés aux différentes concentrations, les lipoplexes ont été incubés avec les cellules pendant 24 heures.

La viabilité cellulaire a été mesurée et le profil de toxicité des particules a été établi en fonction de la concentration en lipide cationique, par rapport au 100 % de viabilité des cellules non traitées (Figure 86).

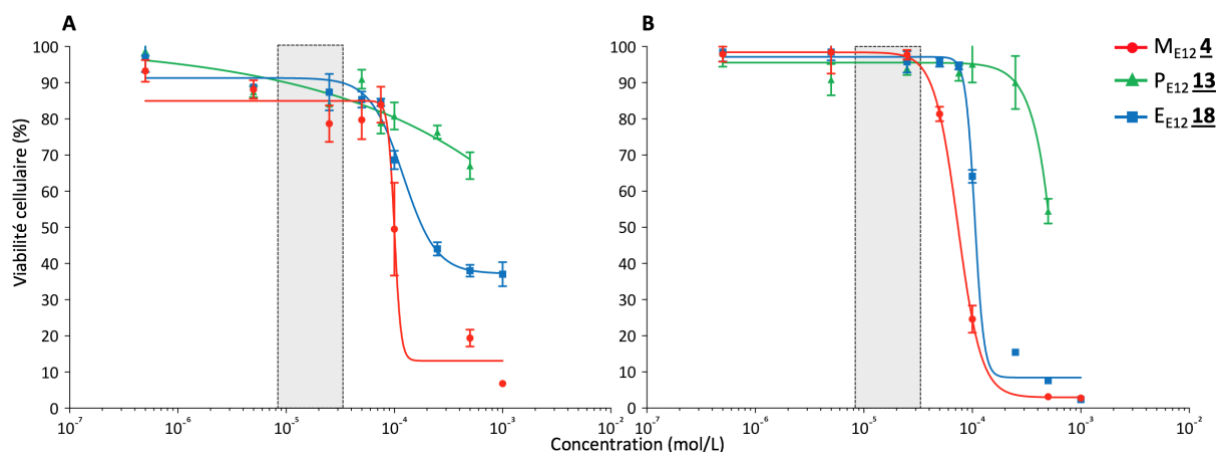


Figure 86. Profil de toxicité des lipoplexes d'ADN formulés à partir des pro-APLs M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), en fonction de la concentration en pro-APL, dans les lignées A549 (A) et 16HBE (B). Le 100 % de viabilité correspond aux cellules non traitées. Les complexes sont formés pour un rapport N/P de 3 et un rapport D/N de 1. La zone grisée (8,3.10⁻⁶ à 33.10⁻⁶ mol/L) correspond à la plage de concentration en pro-APL utilisée lors des transfections conduites *in vitro* (de 0,1 à 0,4 µg d'ADN/puits, avec les mêmes rapports N/P et D/N).

Globalement, les résultats obtenus indiquent que l'IC₅₀ mesurée pour des lipoplexes est proche de celle des pro-APLs nus, de l'ordre de 100 µM, mais la toxicité des lipoplexes est légèrement moins marquée sur les cellules saines (16HBE) que sur les cellules cancéreuses (A549). De plus, ce gain de viabilité cellulaire est valable pour une plage de concentration différente selon la nature du pro-APL étudié. En effet, la perte du caractère sélectif des complexes est obtenue pour une concentration de 50 µM en pro-miltéfossine M_{E12} (**4**) de 100 µM en pro-érufosine E_{E12} (**18**) et de 400 µM en pro-pérfossine P_{E12} (**13**). Ces concentrations sont toutes supérieures à la plage de concentration utilisée dans les expériences en transfert de gènes *in vitro* (zone grisée), ce qui pourrait laisser espérer une potentielle et légère sélectivité d'action des particules de transfection vis-à-vis des cellules cancéreuses A549, au profit des cellules non cancéreuses 16HBE.

III.2. Toxicité des APLs et des pro-APLs pour les cellules sanguines

Il est rapporté dans la littérature que la majorité des composés de la famille des APLs possèdent une activité hémolytique trop importante pour qu'une administration par voie intraveineuse soit envisageable.^{54,73} Seule l'érufosine présente une activité hémolytique réduite et compatible avec son utilisation par cette voie.⁸⁶ L'activité hémolytique de nos composés a donc été déterminée afin d'évaluer une possible augmentation de la tolérance des cellules sanguines vis-à-vis des pro-APLs. Ainsi, des globules rouges fraîchement préparés ont été mis en présence de concentrations croissantes d'APLs et de pro-APLs afin de déterminer la concentration nécessaire pour provoquer l'hémolyse de 50 % des cellules (*Hemolytic Concentration*, HC₅₀). Après une incubation des hématies pendant une heure à 37 °C, la perte d'hémoglobine engendrée par l'action des lipides sur les membranes des cellules sanguines a été quantifiée et rapporté au contrôle d'hémolyse complète, qui est obtenue par l'ajout de Triton X-100 sur les globules rouges (Figure 87).

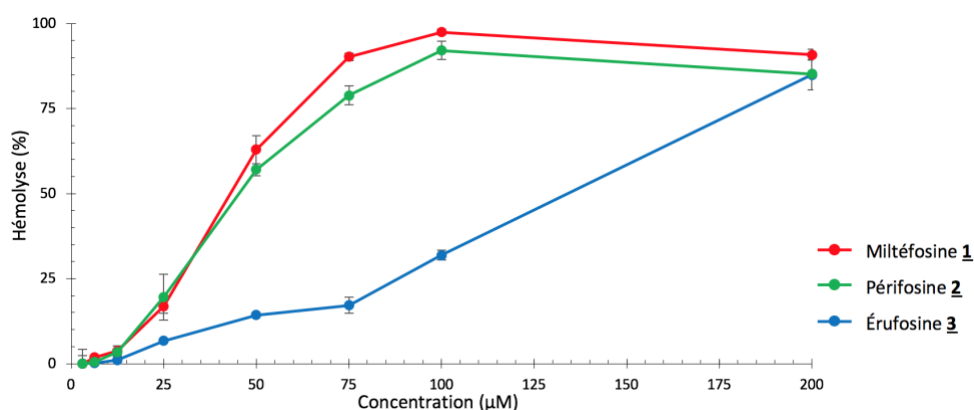


Figure 87. Activité hémolytique des APLs, mesurée sur des globules rouges de mouton, pendant 1 heure à 37 °C.

Partant des protocoles les plus fréquemment trouvés dans la littérature (4% d'hématocrites, temps d'incubation d'une heure), nous avons déterminé une activité hémolytique HC_{50} de 42 μM pour la miltéfosine et de 45 μM pour la périfosine, alors que celle de l'érufofosine s'est révélée 3 fois supérieure et s'établit à 135 μM . En ce qui concerne la miltéfosine, les données recueillies sont en accord avec celles de la littérature, à savoir, 41 μM pour 4 % d'hématocytes,³⁴⁷ ou 34,4 μM pour 2 % d'hématocytes.³⁴⁸ Nous n'avons trouvé aucune publication rapportant une valeur de HC_{50} pour la périfosine dans le cas de suspensions de globules rouge, mais seulement pour du sang humain complet.³²¹ L'activité hémolytique 3 fois plus faible de l'érufofosine comparée à celle des autres APLs confirme l'intérêt potentiel de ce composé.⁸⁵

La même analyse a ensuite été menée sur les composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**), retenus pour le transfert de gènes (Figure 88). Contrairement aux APLs, il a été impossible de déterminer la HC_{50} des trois pro-APLs après seulement 1 heure d'incubation. En effet, dans ces conditions, le taux d'hémolyse, pour la concentration maximale de 200 μM , n'est que de 16 % dans le cas de M_{E12} (**4**) et il est nul pour les autres pro-APLs.

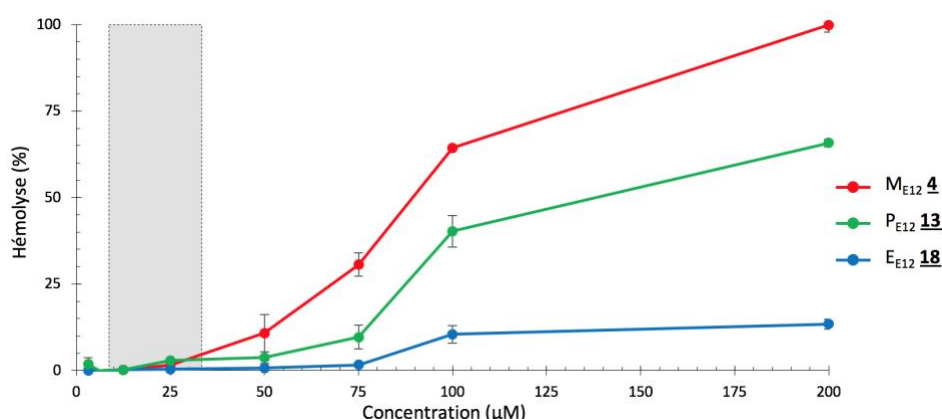


Figure 88. Activité hémolytique des pro-APLs, mesurée sur des hématies de mouton exposées à des concentrations croissantes, pendant 24 heures, à 37 °C.

Ce n'est qu'après une durée de 24 heures qu'une activité hémolytique notable est observée et qu'une valeur de HC_{50} peut être déterminée. Des trois pro-APLs, c'est donc le composé M_{E12} (**4**)

qui présente l'activité hémolytique la plus importante, avec une HC₅₀ de 90 µM. Pour la pro-pérfosine P_{E12} (**13**), elle est de 140 µM. Quant à la pro-érufosine E_{E12} (**18**), les données collectées ne permettent pas de déterminer une HC₅₀, puisque le taux d'hémolyse atteint après 24 heures d'incubation à la plus forte concentration de lipide (200 µM) n'est que de 13 %, la même concentration en érufosine induisant 85 % d'hémolyse après seulement 1 heure d'incubation.

Comme pour le profil de toxicité des lipoplexes (*vide supra*), nous avons représenté sur les graphes d'hémolyse la plage de concentration en lipide correspondant aux expériences de transfection *in vitro*. Ceci permet de constater que les pro-APLs ne sont pas du tout toxiques vis-à-vis des cellules sanguines à ces concentrations.

Nous avons étudié le profil d'hématotoxicité d'autres pro-érufosines synthétisées au cours de cette thèse, pour la même plage de concentration (3 à 200 µM), afin d'apporter des précisions supplémentaires quant à l'influence de la structure chimique des pro-APLs sur leurs propriétés biologiques. Les taux d'hémolyses obtenus dans cette plage de concentration n'étant pas suffisants pour déterminer des HC₅₀, nous avons uniquement représenté ce taux à la concentration la plus forte testée (200 µM), pour une incubation d'une heure et de 24 heures (Tableau 13).

Tableau 13. Taux d'hémolyse (en %) de globules rouges (4 % d'hématocytes dans le PBS) incubés pendant 1 et 24 heures avec 200 µM des diverses pro-érufosines.

Temps	E 3	E _{E2} 36	E _{E6} 37	E _{E12} 18	E _{E'12} 19	E _{C12} 20	E _{C'12} 21	E _{E18} 42	E _{E18:1} 22	E _{C-DTG} 50	E _{Gem} 58
1 h	85	28	25	0	0	0	0	0	2	2	26
24 h	-	31	83	13	14	10	15	11	2	72	76

La présence d'un substituant sur le pont acétalique ne semble pas être un facteur déterminant dans la toxicité envers les cellules sanguines. Comme attendu, la présence du motif détergent sur le composé E_{C-DTG} (**50**) induit une forte hémolyse après 24 heures, ce qui est en accord avec les précédentes observations faites pour ce composé, à savoir une augmentation notable de toxicité par rapport aux autres représentants de la série. Le composé E_{Gem} (**58**) montre également une activité hémolytique importante à 24 heures, même si elle reste inférieure à celle de l'érufosine (d'un facteur 3 à 1 h), ce qui rend éventuellement compte du temps nécessaire pour son hydrolyse. Ceci est particulièrement intéressant compte tenu du fait que nous avons précédemment observé une activité antitumorale semblable à celle de l'érufosine pour ce composé.

De manière générale, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude mettent en évidence que la transformation des APLs en pro-APLs améliore très sensiblement leur hématocompatibilité, ce qui valide une partie de nos hypothèses de travail. Cependant, il convient de souligner que l'activité hémolytique a été évaluée pour les pro-APLs nus. En ce qui concerne des lipoplexes

incorporant des pro-APLs, Il est probable que l'hématotoxicité serait encore réduite, mais nous n'avons pas vérifié ce point particulier.

III.3. Conclusion sur la toxicité des pro-APLs

L'étude de la toxicité des APLs et des pro-APLs a donc été réalisée, à la fois, sur des cellules pulmonaires (A549, H292 et 16HBE) et sur des cellules sanguines (érythrocytes de mouton). Ceci a permis d'estimer le potentiel cytotoxique de nos composés dans notre modèle d'étude pour le transfert de gènes, mais aussi d'évaluer leur hématocompatibilité, dans l'optique d'une administration par voie i.v.

L'étude sur les cellules épithéliales pulmonaires a révélé que les pro-APLs possèdent une activité cytotoxique assez similaire à celle des APLs, mais aucune preuve d'une quelconque sélectivité pour les cellules tumorales vis-à-vis des cellules saines n'a pu être apportée. En plus de conduire à des particules de transfection efficaces, les pro-APLs M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**) présentent également un bon potentiel antitumoral, avec des effets légèrement moins importants dans le cas des cellules non cancéreuses 16HBE. Bien que les informations recueillies pour le composé E_{Gem} (**58**) permettent de mettre en lien les propriétés de toxicité avec le potentiel de relargage de l'APL parent, nous n'avons pas tenté de mettre en évidence ledit phénomène de relargage de l'APL dans le compartiment intracellulaire. Pour autant, la preuve de concept de la réversibilité des pro-APLs a été faite lors de l'étude de stabilité hydrolytique de ces composés. L'étude de l'hématotoxicité, quant à elle, suggère que les pro-APLs sont des composés mieux tolérés que les APLs parents, ce qui soutient l'hypothèse initiale qui sous-tend tout notre travail.

IV. Les pro-APLs en combothérapie antitumorale

Au cours des précédentes parties, nous avons étudié les pro-APLs et évalué leur potentiel dans le cadre de la délivrance de gènes (siARN et ADN), mais aussi dans le développement d'une activité cytotoxique intrinsèque. Parmi les 34 pro-APLs développés, trois ont démontré à la fois une capacité à délivrer efficacement un ADN plasmidique et des propriétés intéressantes en termes de cytotoxicité. Les différentes évaluations qui sont présentées dans ce qui suit ont été conduites dans l'optique d'une utilisation des pro-APLs en combothérapie antitumorale, alliant les effets induits par la délivrance d'un transgène thérapeutique, tel qu'un ADN codant la protéine TRAIL, aux effets antitumoraux des APLs issus de l'hydrolyse des pro-APLs.

IV.1. Le choix du modèle *in vitro*

Pour cette étude, nous avons travaillé sur les trois lignées cellulaires précédemment utilisées, à savoir les cellules A549, 16HBE et H292. Ce choix n'est pas anodin, puisque nous avons voulu tester notre combinaison sur deux types cellulaires cancéreux, l'un réceptif et l'autre résistant à TRAIL, respectivement H292 et A549,³⁴⁹ ainsi que sur un type cellulaire supposé résistant à TRAIL du fait de son statut non cancéreux, 16HBE.¹⁵⁷ En complément des données recueillies dans la littérature, nous avons dans un premier temps cherché à caractériser nos modèles cellulaires. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des récepteurs de TRAIL, ainsi qu'à la sensibilité des lignées cellulaires vis-à-vis de la protéine TRAIL recombinante.

IV.1.1. Les récepteurs de TRAIL

Comme nous l'avons indiqué dans le premier chapitre (cf. *Chapitre 1 - III.1.2. L'utilisation thérapeutique d'un plasmide TRAIL*), TRAIL possède 5 récepteurs, dont 2 sont des récepteurs de mort capables d'induire l'apoptose. L'implication des récepteurs de TRAIL dans la résistance tumorale n'est pas avérée mais, sans la présence de ces derniers, toute action de ladite protéine est impossible. Nous avons donc vérifié la présence de ces récepteurs dans nos modèles cellulaires.

Des cellules de chaque lignée ont été disposées dans une plaque à 96 puits, à raison de 100.000 cellules/puit. Après centrifugation, ces dernières ont été mises en présence de quatre anticorps monoclonaux fluorescents ciblant respectivement les récepteurs TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 ou encore TRAIL-R4, pendant 30 minutes et à 4 °C. L'expression des récepteurs TRAIL a ensuite été analysée par cytométrie en flux (Figure 89).

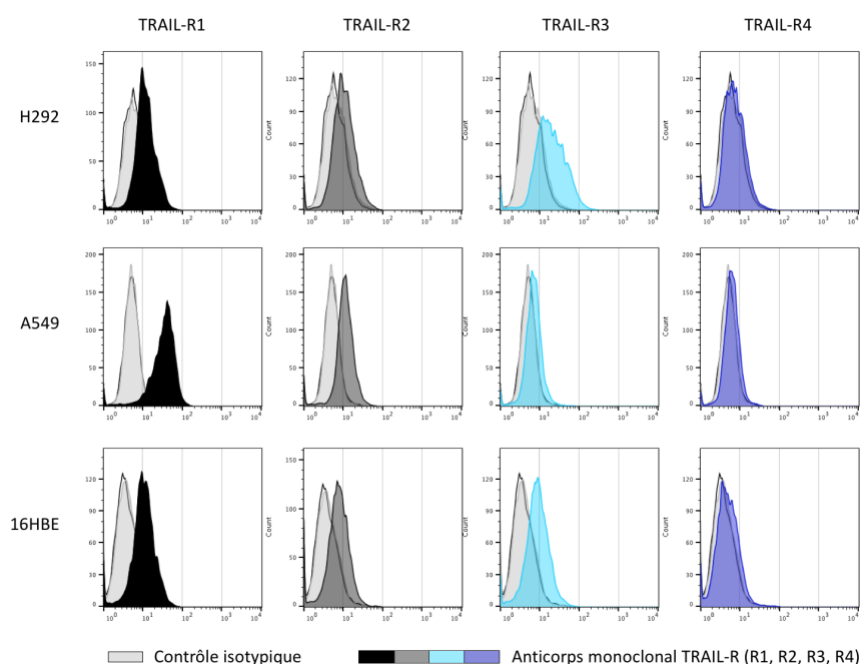


Figure 89. Étude de l'expression des récepteurs de TRAIL, en fonction du type cellulaire (H292, A549 et 16HBE), par cytométrie en flux.

Les résultats démontrent tout d'abord que toutes les lignées cellulaires expriment les deux récepteurs de mort (TRAIL-R1 et TRAIL-R2). Ceci confirme que la protéine TRAIL pourrait interagir avec ces cellules, sans pour autant nécessairement induire l'apoptose. En ce qui concerne les récepteurs inhibiteurs, aucune des lignées étudiées n'exprime le récepteur TRAIL-R4 et seules les cellules H292 et 16HBE ont une expression positive du récepteur TRAIL-R3.

Comme nous l'avons déjà dit, il n'est pas possible de prédire la sensibilité des cellules vis-à-vis de TRAIL en se basant uniquement sur l'expression des récepteurs. Quoi qu'il en soit, la présence des récepteurs de mort (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) sur chacune des lignées constitue un prérequis pour notre étude et il convient à présent d'estimer la sensibilité des cellules.

IV.1.2. La sensibilité à TRAIL

Afin de vérifier la sensibilité de nos lignées cellulaires vis-à-vis de la protéine TRAIL, nous avons employé une protéine TRAIL recombinante capable d'induire l'apoptose, SuperKillerTRAIL.^{350,351} Les cellules ont ainsi été incubées avec cette protéine à différentes concentrations (2,2 µg/mL à 1,1 ng/mL), pendant 24 heures, à 37 °C. La viabilité cellulaire a été mesurée à la fin de l'incubation afin de déterminer le profil de toxicité et donc le degré de sensibilité des cellules (Figure 90).

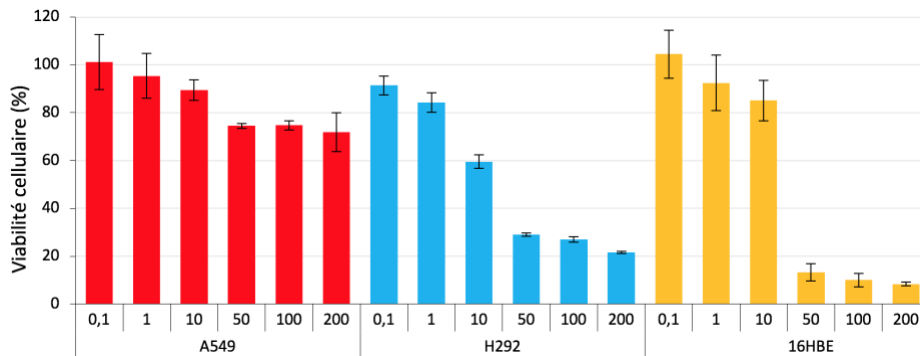


Figure 90. Viabilité des différentes lignées cellulaires après exposition à une concentration croissante de protéine SuperKillerTRAIL, pendant 24 heures.

Les résultats suggèrent que les cellules A549 sont en effet résistantes à l'action de TRAIL puisqu'une viabilité cellulaire résiduelle de 70 % est enregistrée à la plus forte concentration de SuperKillerTRAIL (200 ng/mL), alors que les deux autres types cellulaires présentent une viabilité inférieure à 20 %, pour cette même concentration. Les cellules 16HBE semblent légèrement plus résistantes que les cellules H292, sur la plage de concentration de 0,1 à 10 ng/mL et la même viabilité est obtenue pour ces deux types cellulaires (85 %) mais pour un facteur 10 de concentration (1 ng/mL sur H292 contre 10 ng/mL pour 16HBE). Par ailleurs, les résultats obtenus pour l'analyse des cellules H292 et A549 sont cohérents avec les données de la littérature et selon lesquelles des IC₅₀ de 25 et 1500 ng/mL sont associées à ces lignées, respectivement.³⁴⁹ Ces différents résultats valident donc nos modèles cellulaires pour l'évaluation de notre combothérapie antitumorale.

IV.2. Résultats de vectorisation d'ADN codant TRAIL

Nos modèles cellulaires ayant été validés, nous avons préparé des complexes d'ADN à partir des 3 pro-APLs que nous avons retenus précédemment, à savoir les composés M_{E12} (**4**), E_{E12} (**18**) et P_{E12} (**13**). Par ailleurs, nous avons choisi de préparer conjointement des complexes avec le plasmide pCMV-GLuc et un plasmide codant TRAIL. À l'image du couple siLucU/sic pour la délivrance de siARN, l'utilisation de ce couple de plasmide permet de vérifier, par bioluminescence, le succès de la transfection et de s'assurer que l'éventuel surcroît de toxicité est induit spécifiquement par le gène thérapeutique.

Les conditions de formulation de ces lipoplexes sont celles établies lors de notre étude d'optimisation (*vide supra*, N/P = 3, D/N = 1), la complexation étant réalisée à température ambiante, dans le glucose à 5 %. Quant à la dose de matériel génétique, nous avons étudié une gamme allant de 0,4 à 0,1 µg d'ADN/puits, afin de détecter un éventuel effet.

IV.2.1. Le plasmide pEGFP-TRAIL

Les premières expériences de transfection thérapeutique ont été réalisées à l'aide de (Addgène, 5607 paires de bases), un plasmide codant pour la protéine TRAIL fusionnée à l'eGFP. Malheureusement, aucune différence en termes de toxicité n'a pu être observée, sur les trois lignées cellulaires, entre les lipoplexes préparés avec les 3 pro-APLs et les deux plasmides pCMV-GLuc et pEGFP-TRAIL. Des transfactions ont été conduites sur 24 à 72 heures, afin d'identifier une toxicité éventuellement tardive mais spécifique à TRAIL, en vain.

Nous avons alors diversifié nos lignées cellulaires, craignant que nos modèles soient défaillants, et avons ainsi transfecté d'autres lignées cellulaires référencées comme réceptives à TRAIL : MDA-MB-231 (cancer du sein), SKBr3 (cancer du sein) et HCT116 (cancer du côlon). Bien que ces cellules soient de bons hôtes de transfection, c'est-à-dire que de bons niveaux d'expression de luciférase aient pu être induits par pCMV-GLuc, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet antitumoral spécifique dû à l'emploi de pEGFP-TRAIL.

Nous avons alors envisagé que la protéine TRAIL fusionnée à la GFP pouvait présenter un défaut d'activité par rapport à la protéine TRAIL native. En effet, étant donné la taille d'eGFP (238 acides aminés, 27 kDa), la fusion avec TRAIL pourrait avoir une certaine influence sur l'interaction de cette dernière avec ses récepteurs ou sur l'adressage de la chimère dans la cellule.

Nous avons donc décidé d'abandonner le plasmide pEGFP-TRAIL et d'évaluer un autre plasmide disponible commercialement : pUNO1-hTRAIL (InvivoGen, 4026 paires de bases).

IV.2.2. Le plasmide pUNO1-hTRAIL

L'utilisation de pUNO1-hTRAIL, contrairement au plasmide précédent, a permis de mettre en évidence un effet antitumoral spécifique. Les conclusions pouvant différer selon la nature du pro-APL étudié, nous allons présenter séparément les résultats obtenus avec chacun de ces composés, avant de proposer une perspective plus générale. Par ailleurs, l'ensemble des résultats de transfection thérapeutique sont présentés en rapportant la viabilité cellulaire après 24 heures d'exposition. Un dosage de la luciférase a été effectué pour chacune des conditions testées, afin d'isoler l'activité de transfection et de s'assurer du succès de la délivrance intracellulaire des deux plasmides. Dans chacun des cas, les niveaux d'expression de cette protéine sont légèrement moins importants à la dose de 0,1 µg d'ADN/puits par rapport aux trois autres doses qui suscitent des niveaux de transfection équivalents (Figure 91).

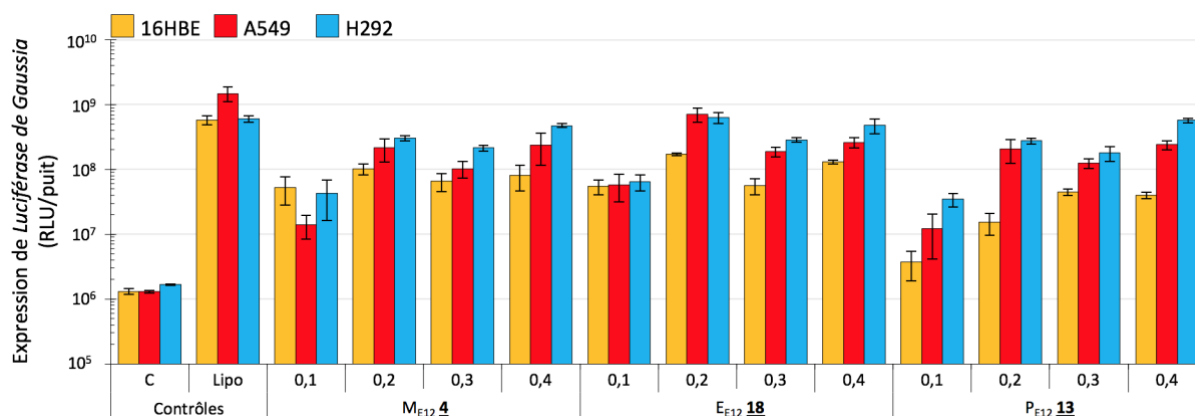


Figure 91. Profil de transfection des trois pro-APLs, en fonction de la dose d'ADN utilisée, sur les trois lignées cellulaires. Les complexes ont été préparés au rapports N/P de 3 et D/N de 1.

IV.2.2.1 Vectorisation par la pro-miltéfosine ME12

La première remarque qui peut être faite sur la transfection thérapeutique réalisée par la pro-miltéfosine ME12 (**4**) concerne le fait que la viabilité est plus importante dans le cas des cellules non cancéreuses 16HBE que pour les deux autres types cellulaires, ce qui pourrait être vu comme un avantage thérapeutique (Figure 92). Mais il serait imprudent de parler de sélectivité antitumorale au sens littéral du terme, compte tenu du fait que cette observation est valable pour le contrôle LipofectAMINE. En effet, ce dernier induit, conformément à l'ensemble des autres transfections réalisées avec cet agent commercial, une toxicité plus faible sur le type cellulaire 16HBE que sur les deux autres. En revanche, le niveau de toxicité induit sur les autres lignées cellulaires est probablement trop important pour que la part de toxicité liée au plasmide TRAIL ne soit visible.

Concernant l'emploi du transgène thérapeutique, les résultats les plus marqués sont obtenus pour la lignée cellulaire H292, puisqu'il existe une nette différence de viabilité cellulaire selon qu'on transfecte avec du pCMV-Gluc ou du pUNO1-hTRAIL. Cette lignée avait été choisie en raison de sa réceptivité vis-à-vis de la protéine TRAIL et les résultats sont en totale adéquation avec

cette hypothèse. La perte de viabilité cellulaire que l'on observe lorsque l'on passe du plasmide LUC au plasmide TRAIL est de 12 et 13 % pour les doses de 0,1 et 0,2 µg d'ADN/puits. Elle s'élève à 20 et 21 % pour les doses de 0,3 et 0,4 µg d'ADN/puits. Une perte de viabilité peu significative voire inexistante est enregistrée pour les deux autres types cellulaires, ce qui corrobore leur statut de cellules résistantes.

Globalement, l'utilisation d'une dose de 0,4 µg de plasmide conduit aux résultats les plus marqués et constitue donc la condition la plus intéressante pour la pro-miltéfosine M_{E12} (4).

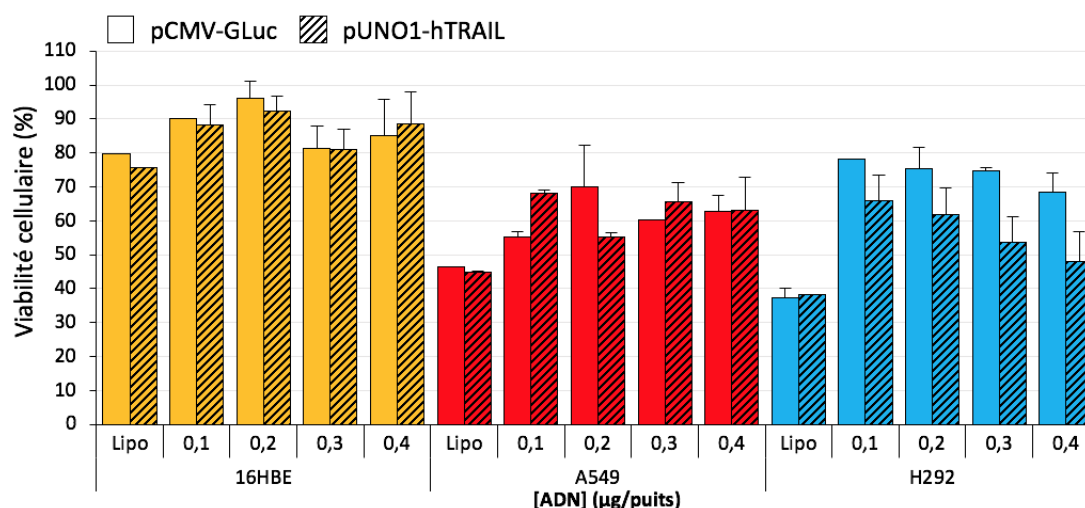


Figure 92. Viabilité cellulaire dans le cadre d'une transfection du gène thérapeutique TRAIL, par rapport au gène rapporteur LUC, avec M_{E12} (4) comme vecteur de transfection et prodrogue de miltéfosine (N/P de 3 ; D/N de 1).

IV.2.2.2 Vectorisation par la pro-érufosine E_{E12}

Le cas de la transfection thérapeutique par la pro-érufosine E_{E12} (18) est un peu différent du précédent, bien que les résultats soient également satisfaisants (Figure 93).

Premièrement, la dose de 0,1 µg d'ADN/puits engendre systématiquement 20 % de toxicité sur les trois lignées cellulaires, quel que soit le transgène employé, ceci en fait donc une condition peu intéressante. Les trois autres doses nous ramènent à des résultats similaires au cas précédent, avec une perte de viabilité cellulaire observée entre les deux plasmides. À nouveau, cette diminution est plus importante dans le cas des cellules H292 que pour les autres, et est de 11, 15 et 10 % de perte, respectivement pour les doses de 0,2, 0,3 et 0,4 µg/puits. Ceci est toujours explicable par le degré de sensibilité des cellules vis-à-vis de TRAIL, les H292 étant sensibles alors que les A549 sont de nature résistante et que les 16HBE sont non cancéreuses.

C'est à la dose de 0,3 µg d'ADN/puits que l'on enregistre la plus grande différence de viabilité entre les types cellulaires cancéreux et non cancéreux, ainsi que le meilleur différentiel entre les transgènes (plus important pour H292 que pour A549 et 16HBE).

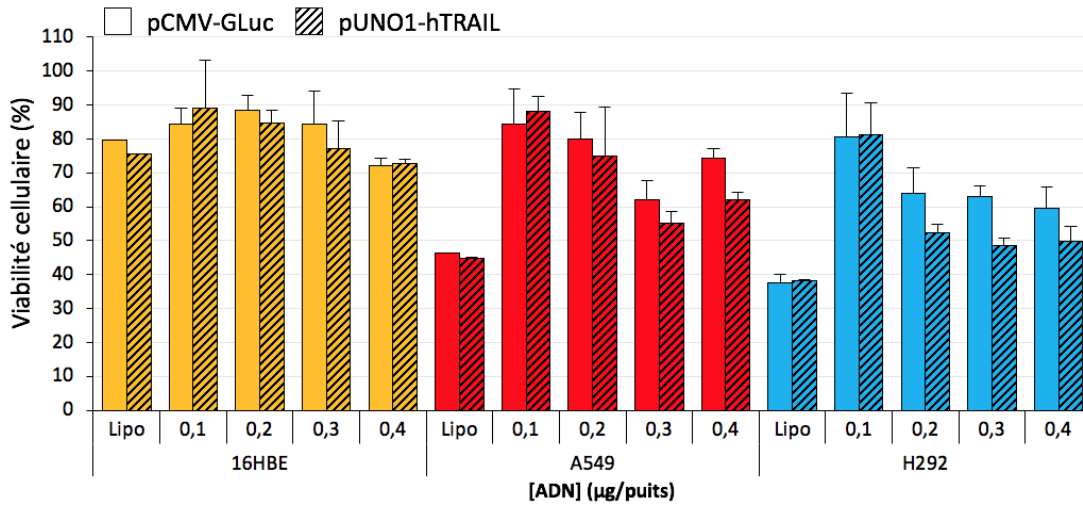


Figure 93. Viabilité cellulaire dans le cadre d’une transfection du gène thérapeutique TRAIL, par rapport au gène rapporteur LUC, avec E_{E12} (**18**) comme vecteur de transfection et prodrogue d’érufosine (N/P de 3 ; D/N de 1).

IV.2.2.3 Vectorisation par la pro-pérfosine P_{E12}

La pro-pérfosine P_{E12} (**13**) conduit elle aussi à des résultats de transfection thérapeutique satisfaisants puisqu’elle permet d’engendrer préférentiellement une perte de viabilité cellulaire sur les cellules H292 à l’aide du pUNO1-hTRAIL (Figure 94).

À nouveau, la dose de 0,1 µg d’ADN/puits ne permet pas d’obtenir de résultats aussi marqués que pour les 3 autres doses. En effet, pour les doses de 0,1 à 0,4 µg, les pertes de viabilité cellulaires sont respectivement de 9, 18, 35 et 11 %. L’effet antitumoral spécifique du transgène TRAIL engendre donc un gain de toxicité d’un facteur 1,3 à 1,9 pour ces 3 doses supérieures, alors qu’il n’y pas d’induction de toxicité pour les autres lignées. À nouveau, les lipoplexes sont mieux tolérés par la lignée non cancéreuse 16HBE, quel que soit le plasmide utilisé. Ceci permet de déceler un effet cytotoxique nettement plus marqué sur les cellules H292 que sur les 16HBE.

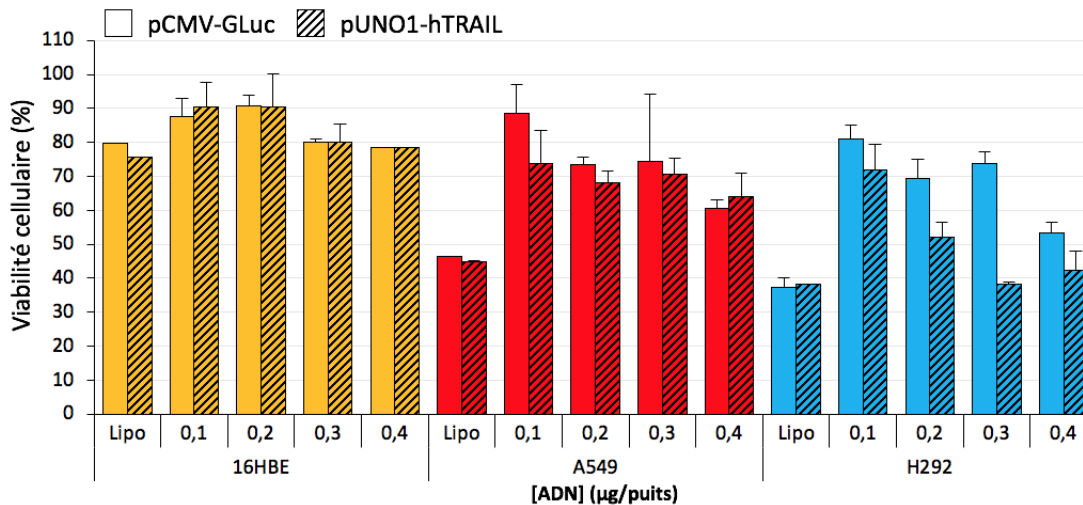


Figure 94. Viabilité cellulaire dans le cadre d’une transfection du gène thérapeutique TRAIL, par rapport au gène rapporteur LUC, avec P_{E12} (**13**) comme vecteur de transfection et prodrogue de pérfosine (N/P de 3 ; D/N de 1).

IV.3. Conclusion sur la transfection thérapeutique

Les résultats de transfection apportés par cette dernière étude avec un plasmide codant TRAIL sont très encourageants, puisqu'ils ont permis de mettre en évidence une cytotoxicité spécifique liée à l'utilisation du transgène thérapeutique, couplée à la cytotoxicité intrinsèque des pro-APLs. De plus, la cytotoxicité due spécifiquement à l'expression du transgène confirme la sélectivité initialement attendue entre cellules tumorales et cellules saines, ce qui est en accord avec nos hypothèses de travail.

Cependant, ces propos doivent être nuancés par le fait qu'il est difficile d'évaluer avec certitude quel est l'effet antitumoral spécifiquement dû à l'activité antitumorale des composés sur les différents types cellulaires. En effet, il n'est pas possible de dire que c'est seulement l'activité des pro-APLs (et des APLs par extension) qui est responsable de la perte de viabilité cellulaire dans le cas du plasmide pCMV-GLuc. Bien que l'effet spécifique du transgène soit quantifiable (*vide supra*), il n'est pas possible de déterminer une quelconque synergie d'action avec l'effet spécifique des prodrogues d'APLs.

Ces travaux en sont à un stade préliminaire et n'ont pas pu être suffisamment approfondis compte tenu du fait qu'ils ont été réalisés à la toute fin du projet. Ce modèle de transfection thérapeutique sur trois lignées cellulaires spécialement choisies correspond au niveau d'aboutissement et de complexité le plus élevée de notre évaluation biologique et de nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires pour permettre sa mise en œuvre. Par ailleurs, l'utilisation initiale et infructueuse du plasmide pEGFP-TRAIL a contribué à l'obtention tardive des derniers résultats présentés. Les raisons de l'échec que nous avons essuyé avec ce premier plasmide thérapeutique restent inconnues à ce jour, mais une perte d'activité engendrée par la présence de la GFP fusionnée pourrait en être une. Ceci démontre que le choix de la cible biologique et du transgène qui lui est associé est tout aussi important que les améliorations faites sur le vecteur.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'évaluation biologique de nos pro-APLs, comprenant l'étude de leurs propriétés de vectorisation des acides nucléiques de type siARN et pADN, mais également l'étude de leur potentiel cytotoxique vis-à-vis de différents types cellulaires (cellules pulmonaires et sanguines).

De nombreuses investigations ont été conduites pour optimiser les formulations et obtenir des actifs les plus performants possibles. Ces différents efforts n'ont pas toujours été récompensés puisque les travaux sur la délivrance de siARN ont été un échec et ont dû être abandonnés, au profit de travaux avec de l'ADN. Dans ce contexte, des résultats satisfaisants ont été obtenus et ont permis

de sélectionner trois candidats parmi les 34 pro-APLs synthétisés. Ces candidats sont issus d'une modification commune introduite sur les trois APLs.

Un modèle a par ailleurs été développé pour permettre l'évaluation du potentiel des pro-APLs dans le cadre d'une combothérapie antitumorale, alliant transfert de gènes et chimiothérapie par les APLs. Les premiers résultats obtenus constituent une validation des choix opérés pour la mise en œuvre de ce modèle de combothérapie mais ils restent préliminaires et nécessiteront d'être approfondis.

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont été entièrement consacrés à un unique projet, à l'interface de la chimie et de la biologie, et s'inscrivent dans la continuité des précédentes recherches menées au laboratoire dans le cadre de la vectorisation des acides nucléiques. En effet, les travaux antérieurs avaient permis d'obtenir des lipides cationiques biolabiles dérivés d'un constituant naturel des membranes cellulaires, la DOPC, en masquant temporairement sa charge négative par l'introduction d'un substituant, clivable sous stimuli acide ou enzymatique. Ce concept s'était révélé particulièrement efficace pour la délivrance, *in vitro* et *in vivo*, d'acides nucléiques (ADN et siARN) avec un impact toxicologique minimisé.

Ce doctorat correspond à la transposition de ce système à une approche thérapeutique du cancer, à l'aide de constructions dérivées d'alkylphospholipides (APLs), des lipides antitumoraux. Le développement d'un actif présentant plusieurs modes d'actions différents et indépendants s'inscrit ainsi dans le cadre de la combothérapie antitumorale, alliant la délivrance d'un gène médicament et d'un agent de chimiothérapie conventionnel. Ce projet de thèse a donc nécessité de synthétiser ces prodrogues biolabiles (pro-APLs), mais également d'évaluer leur activité biologique sur des modèles cellulaires. Afin de pouvoir piloter moi-même ces deux phases de développement, j'ai été formé en interne à l'ensemble des techniques impliquées dans l'évaluation biologique de nos composés. L'apprentissage au cours du doctorat de ces nouvelles compétences constitue un indéniable point positif sur le plan professionnel. Cette interaction continue entre les synthèses chimiques et les évaluations biologiques a apporté une réelle valeur ajoutée à mon doctorat. Ces deux phases ont été présentées dans le manuscrit sous la forme de parties indépendantes, mais elles ont bel et bien été conduites de manière conjointe.

Conception de prodrogues cationiques d'alkylphospholipides (pro-APLs)

1) Conclusion

Au cours de notre travail de conception de pro-APLs, nous avons appliqué diverses méthodologies, dont certaines ont été développées au laboratoire, pour générer trois familles de prodrogues issues des APLs que nous avons sélectionnés, à savoir la miltéfosine, la périfosine et l'érufosine. Après avoir défini nos différentes cibles pro-APLs, nous avons effectué une réaction de *O*-alkylation du phosphate libre des trois APLs avec divers précurseurs électrophiles (esters de chloroalkyle, carbonate de chloroalkyle ou triflates d'alkyle). La différence de réactivité que nous avons observé entre les APLs, lors de cette réaction de *O*-alkylation, nous a conduit à développer majoritairement une des trois séries, celle des pro-érufosines. En effet, parmi un échantillon global de 34 pro-APLs synthétisés, 20 d'entre eux sont issus de l'érufosine, alors que les séries pro-miltéfosines et pro-périfosines comptent respectivement 9 et 5 représentants.

Par ailleurs, quatre structures pro-érufosines spéciales, sur les 20 existantes, ont été spécifiquement développées en réponse à des problématiques associées à la délivrance de siARN ou à l'induction de toxicité intracellulaire. Nous avons par exemple synthétisé un pro-APL tricaténaire, E_{Tri} (**54**), pour pallier l'incapacité de tous nos pro-APLs bicaténaires à délivrer un siARN. Un autre exemple concerne l'introduction d'un motif détergent (C₁₂E₄ ou DTG) dans deux de nos constructions, E_{C-DTG} (**50**) et E_{DTG} (**51**), dans l'optique de favoriser un échappement endosomal dans le cas de la délivrance de siARN, ou pour induire une toxicité additionnelle. Enfin, une construction gemini inédite, E_{Gem} (**58**), a été réalisée pour exacerber les propriétés de toxicité, par une capacité de relargage de deux molécules d'érufosine dans le compartiment intracellulaire. Bien que nous n'ayons isolé qu'un seul des trois pro-APLs gemini initialement envisagés, l'obtention de ce dernier constitue une réussite à part entière, compte tenu du défi que représentait la synthèse de telles constructions.

2) Perspectives

Les perspectives en termes de synthèse concernent naturellement la préparation des pro-APLs gemini, puisqu'il serait intéressant de mener à bien la synthèse des deux autres motifs gemini (**56** et **57**). Cela suggère de mener d'autres investigations pour tenter de résoudre le problème des conditions réactionnelles inadaptées à la concrétisation de la double *O*-alkylation, ou de la purification de ces composés. De plus, l'évaluation biologique des deux constructions gemini pourraient offrir des réponses quant à l'origine exacte de la toxicité dégagée par E_{Gem} (**58**). En effet, puisque ce composé arbore un pont disulfure capable de générer *in situ* de l'épisulfure, il nous est actuellement impossible de savoir dans quelle mesure cette espèce joue un rôle dans le potentiel antitumoral de E_{Gem} (**58**). Le composé **56**, lui, ne présente pas de pont disulfure et son potentiel antitumoral n'est alors lié qu'à sa capacité de relargage d'APL.

Une fois les problématiques de synthèse des gemini solutionnées, nous pourrions même envisager la conception de structures gemini qui intègrent un bras ramifié, comme par exemple un bras de type triglycéride qui permettrait alors le raccordement de trois molécules d'APLs. L'évaluation biologique de telles constructions s'inscrirait dans l'étude de l'induction de toxicité en fonction de la capacité de relargage d'APL parent.

En revanche, si des investigations ont été menées dans le sens de l'induction de toxicité intracellulaire durant ces travaux de thèse, aucune n'a été conduite dans le but de rendre les particules de transfection furtives au milieu extracellulaire afin d'échapper à l'opsonisation et au système MPS. Le recours à la PEGylation pourrait constituer une piste pour cette voie.

Enfin, il pourrait être envisagé de concevoir des pro-érufosines radiomarquées, à partir d'un exemplaire de l'érufosine qui intègre du ¹⁴C dans l'ammonium de l'homocholine, afin de suivre la pharmacocinétique des pro-APLs et leur comportement intracellulaire.

Développement de formulations de pro-APLs pour une combothérapie antitumorale

1) Conclusion

La seconde partie de notre travail a été consacrée à l'évaluation biologiques *in vitro* des pro-APLs. Nous avons, dans un premier temps, engagé nos composés dans des applications en transfert de siARN, à l'aide du modèle de gène rapporteur de la luciférase. Bien que les composés aient démontré la faculté à complexer le siARN, ces derniers se sont avérés incapables de délivrer un siARN aux cellules. Nous avons tenté d'améliorer cette situation en menant de nombreuses investigations, par exemple en changeant le protocole de fabrication des lipoplexes de siARN, en introduisant le lipide fusogène DOPE dans les formulations et en synthétisant même de nouveaux pro-APLs (*vide supra*). Toutefois, tous ces efforts se sont soldés par un échec et nous avons dû ainsi modifier notre stratégie de thérapie génique.

Dans le cadre de la délivrance d'ADN plasmidique, nous avons obtenu des résultats satisfaisants, notamment par l'introduction de DOPE dans les formulations, ce qui nous a permis d'établir des relations de structure-activité à partir des profils de transfection obtenus pour les différents composés. Il est apparu que l'utilisation d'un même motif clivable, le dodécanoate de phosphométhyle, a conduit aux meilleurs vecteurs de transfection pour les trois séries de pro-APLs étudiées, à savoir les composés M_{E12} (**4**), P_{E12} (**13**) et E_{E12} (**18**). Aux termes de nombreuses optimisations, les formulations les plus efficaces ont été obtenues par la complexation d'ADN à température ambiante, dans le glucose à 5 %, pour un rapport N/P de 3 et un rapport D/N de 1, et ceci pour des doses d'ADN comprises entre 0,2 et 0,4 µg d'ADN/puits.

Parallèlement à l'étude des propriétés de vectorisation des pro-APLs, nous nous sommes intéressés à la cytotoxicité de ces composés vis-à-vis de cellules pulmonaires mais également sanguines. Si aucune cytotoxicité sélective envers les cellules tumorales pulmonaires n'a été observée pour les APLs et pour les pro-APLs, ces derniers semblent toutefois posséder une activité semblable à leur APL parent. De plus, les lipoplexes d'ADN se sont montrés moins toxiques envers les cellules non cancéreuses 16HBE, dans la gamme de concentration utilisée pour la délivrance d'ADN.

L'ultime évaluation biologique de ces travaux de thèse correspond à l'étude d'une combothérapie antitumorale. En effet, nous avons employé nos trois meilleures formulations dans un modèle préliminaire de transfection thérapeutique à l'aide d'une plasmide codant la protéine d'intérêt TRAIL. Nous avons spécifiquement développé un modèle étude à partir de trois lignées cellulaires pulmonaires humaines, l'une résistante à l'action de TRAIL par sa nature non cancéreuse (16HBE), la seconde également résistante mais de nature cancéreuse (A549) et la troisième réceptive et cancéreuse. Ce modèle a été validé par une étude préalable de l'expression des récepteurs de TRAIL sur ces lignées, mais aussi par l'étude de leur sensibilité vis-à-vis d'une protéine TRAIL recombinante (SPK). Finalement, les résultats de transfection thérapeutique ont

permis de mettre en évidence une cytotoxicité spécifique liée à l'utilisation du transgène thérapeutique et couplée à la cytotoxicité intrinsèque des pro-APLs. De plus, la cytotoxicité issue de ce transgène démontre la sélectivité initialement attendue entre cellules tumorales et cellules saines, ce qui constitue la validation de nos hypothèses de travail.

Ces résultats sont toutefois préliminaires et requièrent d'être plus amplement approfondis.

2) Perspectives

La première perspective concernant l'évaluation biologique des pro-APLs découle du fait que cette évaluation s'inscrit dans un projet de thèse chimie/biologie, mené par un chimiste de formation et non par un biologiste. En effet, le seul recours à la viabilité cellulaire comme paramètre d'étude de toxicologie pourrait être considéré comme insuffisant pour l'élaboration et la vérification d'hypothèses. Toutefois, cela a permis de conduire une première étude de toxicologie impliquant de nombreux facteurs, mais aussi de faciliter toute la phase de criblage des pro-APLs dans le cadre de la délivrance de gènes.

Des analyses complémentaires pourraient alors être réalisées afin d'étudier par exemple les facteurs d'apoptose ou la cinétique de mort cellulaire afin de déterminer l'implication respective des APLs et de TRAIL dans ces expériences de transfection thérapeutique. Dans un esprit similaire, l'utilisation d'outils de marquage cellulaire (lysotracker, mitotracker, etc...) pourrait être envisagée pour identifier les sites d'accumulation des particules.

De même, la combinaison des pro-APLs avec des outils de ciblage ou d'imagerie pourrait conduire à un système théragnostique intéressant, à l'image des carbons dots développés au laboratoire et étudiés par le Dr. Claudel.

Enfin, cette thématique n'a pas été étudiée durant ces travaux de thèse, mais l'introduction d'un troisième actif antitumoral, hydrophobe (paclitaxel par exemple), au sein des particules de transfection pourrait être envisagée pour obtenir un système de trithérapie, basé sur une délivrance de gènes et de deux chimiothérapies indépendantes (*Gene and Double Drug Delivery*).

Partie expérimentale

Sommaire

I. Matériel	151
I.1. Matériel pour la synthèse organique	151
I.2. Matériel pour l'évaluation biologique	151
II. Méthodes	151
II.1. Chromatographie	151
II.2. Résonance Magnétique Nucléaire	151
II.3. Spectrométrie de masse	152
II.4. Spectroscopie Infrarouge	152
II.5. Conservation des composés pro-APLs	152
II.6. Mesure de la stabilité hydrolytique des pro-APLs	153
II.7. Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)	153
II.8. Préparation des lipoplexes d'acide nucléique	153
II.9. Mesure de la taille et de la charge des particules	154
II.10. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	154
II.11. Dosage de la luciférase	154
II.11.1. Après transfection d'un siARN (<i>Firefly luciferase</i>)	154
II.11.2. Après transfection d'un ADN (<i>Gaussia luciferase</i>).....	155
II.12. Dosage de protéines (BCA)	155
II.13. Test de viabilité cellulaire au MTT	156
III. Expériences <i>in vitro</i>	157
III.1. Culture cellulaire.....	157
III.2. Transfection <i>in vitro</i>	157
III.2.1. Transfection <i>in vitro</i> avec un siARN	157
III.2.2. Transfection <i>in vitro</i> avec un ADN	158
III.3. Mesure de l'IC ₅₀ des composés.....	159
III.4. Contrôle de l'expression des récepteurs de TRAIL dans les lignées cellulaires	159
III.5. Étude de la sensibilité des lignées cellulaires à TRAIL	160
III.6. Mesure de l'activité hémolytique des composés.....	160
IV. Synthèse des composés	161
IV.1. Synthèse de la miltéfosine	161
IV.2. Synthèse de la périfosine	161
IV.3. Synthèse de l'érufosine	162
IV.4. Procédure générale pour la synthèse des pro-APLs (PG1)	163
IV.5. Les pro-APLs de I ^{ère} génération (M _{Yn} , E _{Yn} , P _{Yn})	163
IV.6. Les pro-APLs de II ^{ème} génération (E _{Yn})	193

I. Matériel

I.1. Matériel pour la synthèse organique

Les réactifs chimiques employés ont été achetés chez Sigma-Aldrich, TCI, Merck ou Acros Organics et ont été utilisés sans purification préalable.

Les solvants organiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich ou chez VWR-Prolabo. Les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été réalisées sous atmosphère inerte et dans des solvants préalablement distillés sur le desséchant approprié (Et₂O et THF : Na/benzophénone ; CH₂Cl₂, éther de pétrole EP, toluène : CaH₂ ; EtOH, MeOH : Mg/I₂ ; Et₃N, pyridine : KOH).

I.2. Matériel pour l'évaluation biologique

La DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine) a été achetée sous forme de poudre sèche chez Avanti Polar Lipids. Le SPK (SuperKiller TRAIL) a été acheté chez Enzo Life Sciences. L'ADN plasmidique pCMV-GLuc a été acheté chez Tebu-bio, l'ADN plasmidique pUNO1-hTRAIL a été acheté chez Invivogen et surexprimé par RD-Biotech. Les siARN siLucU, sic, siGL3 et siGL2 ont été achetés chez Eurogentec.

Les milieux de culture et les solutions tampons ont été achetés chez Gibco, Sigma-Aldrich ou ont été préparés au laboratoire.

II. Méthodes

II.1. Chromatographie

Les avancements réactionnels ont été suivis par chromatographie sur couche mince (CCM) à l'aide de plaques de silice en verre (Merck, 60 F₂₅₄). La révélation des plaques a été effectuée par lumière ultraviolette (254 nm et 365 nm), ou à l'aide d'acide phosphomolybdique (PMA). Les purifications sur colonne de silice ont été réalisées manuellement sur colonne de gel de silice (Merck, 40-63 μm), ou à l'aide d'un appareil Reveleris X2 de Büchi sur des colonnes de 4 à 24 grammes (silice 50 μm). Le système d'élution est précisé pour chaque purification renseignée dans les modes opératoires.

II.2. Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton (¹H), du carbone (¹³C) et du phosphore (³¹P) ont été enregistrés à l'aide d'appareils Bruker 300, 400 et 500 MHz, à température ambiante.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm), par rapport au signal résiduel du solvant deutéré, utilisé comme référence (RMN ^1H : CDCl_3 à 7,26 ppm ; MeOD à 3,31 ppm ; $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1 à 3,31 ppm. RMN ^{13}C : CDCl_3 à 77,16 ppm ; MeOD à 49,0 ppm ; $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1 à 49,0 ppm). Pour la du phosphore (RMN ^{31}P), une référence externe a été utilisée (H_3PO_4 85 % à 0 ppm).

Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Pour la description de la multiplicité des signaux, les abréviations suivantes ont été utilisées : **s** singulet, **d** doublet, **t** triplet, **q** quadruplet, **qt** quintuplet, **m** multiplet, **b** signal large, **dd** doublet de doublet, **dt** doublet de triplet.

Remarques :

- Les analyses RMN des pro-APLs ont dû être effectuées dans un mélange de chloroforme deutéré et de méthanol deutéré (CDCl_3 1:1 MeOD) afin d'obtenir de bonnes résolutions de spectres. Ceci s'explique par la présence simultanée d'une partie polaire et de chaînes alkyles, ces dernières étant bien solubles dans un solvant classique comme le chloroforme à l'inverse de la tête polaire. L'utilisation du mélange cité ci-dessus améliore la lecture et l'interprétation des spectres. Dans ce mélange de solvants deutéré, c'est le signal du méthanol qui est utilisé comme référence de calibration.
- La numérotation des atomes d'un composé ne correspond pas à la nomenclature de ce composé mais fait référence à l'interprétation des spectres RMN. Le numéro attribué à un proton correspond à la numérotation du carbone qui le porte (le carbone C_2 porte le proton H_2).

II.3. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse à haute résolution (HR-MS) ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent 6520, par infusion directe.

II.4. Spectroscopie Infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge (FT-IR) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Nicolet 380 en mode ATR. Les longueurs d'ondes des bandes d'absorbance maximale (ν_{max}) sont exprimées en nombre d'ondes (cm^{-1}).

II.5. Conservation des composés pro-APLs

Les composés (APLs, pro-APLs et DOPE) ont été conservée à $-18\text{ }^\circ\text{C}$ dans des flacons en verre, sous forme d'aliquots secs de $250\text{ }\mu\text{g}$ à 5 mg préparés à partir d'une solution à 10 mg/mL dans CHCl_3 .

II.6. Mesure de la stabilité hydrolytique des pro-APLs

Les composés ont été formulés en liposomes par une technique d'injection de solvant :³⁵² les composés (10 μmol) ont été dissous dans l'*i*PrOH (200 μL), puis injectés à la seringue et sous agitation (400 rpm) dans une solution de tampon approprié (Hepes 10 mM à pH 7,4 ou AcOK/AcOH 10 mM à pH 4,5 ; 300 μL), contenant du Triton X-100 (10 mM). Le volume a été ajusté à 1 mL, à l'aide du tampon approprié (400 μL) et de D₂O (100 μL). L'intégralité de la solution a été placée dans un tube RMN (5 mm) à 25 °C. Un tube capillaire contenant du méthylphosphonate de diméthyle a été ajouté pour fournir une référence externe (RMN ³¹P : $\delta = 38,78$ ppm). Des acquisitions périodiques de spectres de RMN du ³¹P découplé du proton ont été réalisées sur un spectromètre à 500 MHz ($d_1 = 4$ secs ; 128 scans ; 25 °C). L'intégration respective des signaux de résonance correspondant aux phosphodiesters et phosphotriesters a permis de déterminer le temps $t_{1/2}$ au bout duquel 50 % des composés a été hydrolysé.³⁰²

II.7. Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)

Les déterminations de CMC ont été effectuées par la méthode d'incorporation du pyrène,^{340,343} avec nos composés formulés en liposomes par reprise d'un film lipidique. À partir d'une solution mère de lipide dans H₂O (2 mM, 1 mL), une gamme de solutions à différentes concentrations a été réalisée (entre 2 mM et 2 nM). Un volume fixe d'une solution de pyrène dans le DMSO (10 μL à 0,1 mM) a été ajouté à chaque solution, suivi d'une forte agitation, et d'une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière. Les spectres de fluorescence des échantillons ont ensuite été enregistrés à l'aide d'un Spectromètre Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon), entre 350 nm et 450 nm (bande passante de 1 nm), avec une longueur d'onde d'excitation de 330 nm (bande passante de 1 nm). Le rapport des intensités relatives d'émission à 375 nm et 387 nm (I_{375}/I_{387}) a été exprimé en fonction du logarithme de la concentration. La courbe obtenue présente trois domaines de linéarité distincts et donc deux points de rupture de linéarité. L'abscisse du point d'intersection entre les deux premières demi-droites associées aux domaines de linéarité distincts correspond à la CMC, puisque qu'il s'agit de la concentration minimale à partir de laquelle les monomères s'assemblent pour former les premières poches hydrophobes, dans lesquelles le pyrène va s'insérer. Le second point de rupture correspond à la saturation du signal de fluorescence du pyrène dans son environnement hydrophobe et nous apporte *a priori* pas d'information particulière.

II.8. Préparation des lipoplexes d'acide nucléique

À partir d'une solution de pro-APL dans EtOH (2 mM), différents volumes sont ajoutés dans un eppendorf de 1,5 mL, correspondant aux rapports N/P à tester. Si les conditions de l'expérience requièrent la présence de DOPE dans la formulation, de la DOPE en solution dans EtOH (2 mM)

est également ajoutée dans eppendorf. Le solvant est ensuite évaporé sous vide au SpeedVac, pendant 1 heure. Puis, une solution d'ADN ou de siARN (40 μ L, à la concentration requise dans une solution de glucose à 5 %) est ajoutée dans l'eppendorf et l'ensemble est agité pendant 20 secondes au vortex (puissance maximale). Un temps d'incubation de 30 minutes, à température ambiante, est respecté avant toute utilisation des échantillons.

II.9. Mesure de la taille et de la charge des particules

La détermination de la taille et de la charge des lipoplexes d'ADN est réalisée à l'aide d'un Zetasizer nanoZS (Malvern Instruments) et de cuvettes de mesure DTS1070. Les paramètres suivants ont été utilisés :

- indice de réfraction des particules : 1,43 (type liposome) ;
- indice de réfraction du milieu : 1,34 (glucose 5 %) ;
- viscosité du milieu : 1,0140 cP ;
- température de mesure : 25 °C.

Les mesures sont réalisées en triplicats (distribution en nombre), la mesure de taille en premier puis la mesure de charge.

II.10. Électrophorèse sur gel d'agarose

Une solution d'agarose à 1 % est préparée en dissolvant 0,5 g d'agarose dans 50 mL de tampon TBE 1X, sous agitation et léger chauffage au four micro-onde. Un gel est formé en coulant la solution tiède dans un moule approprié, en présence d'un peigne. Après solidification complète du milieu et retrait du peigne, les composés formulés en lipoplexes à différents rapports N/P (0,8 μ g d'acide nucléique, siARN ou ADN, dans 40 μ L) sont déposés dans chaque puits et soumis à migration, durant 80 min à 80 V dans le cas des lipoplexes d'ADN, ou 40 min à 80 V pour les lipoplexes de siARN. La révélation du gel est réalisée par incubation dans un bain de BET (10 μ L à 10 mg/mL dans 200 mL de H₂O) pendant 15 minutes, puis 5 minutes dans H₂O. Les bandes d'acide nucléique sont visualisées sous lumière UV à 312 nm, à l'aide d'un appareil Amersham Imager 600.

II.11. Dosage de la luciférase

II.11.1. Après transfection d'un siARN (*Firefly luciferase*)

Le dosage de la luciférase de Firefly est réalisé 48 h après dépôt des lipoplexes sur les cellules, à l'aide d'un kit commercial (Promega), avec quelques modifications par rapport au protocole préconisé par le fournisseur. À la fin de l'incubation des cellules, le surnageant est délicatement retiré et les cellules adhérentes sont lavées par une solution de PBS (100 μ L), avant d'être traitées

par un tampon de lyse 1X (20 μ L) pendant 30 minutes, sous agitation. Les lysats cellulaires sont dilués par l'ajout de H₂O (80 μ L) et un volume de 10 μ L est transféré dans une plaque blanche à 96 $\frac{1}{2}$ puits. À l'aide d'un bioluminomètre (Berthold Centro LB960 XS), 50 μ L de la solution de luciférine du kit sont ajoutés sur les 10 μ L d'échantillons présents dans la plaque, et la bioluminescence produite par la réaction enzymatique entre la luciférase et son substrat est mesurée durant 1 seconde. L'expression de la luciférase est exprimée en pourcentage par rapport au niveau basal d'expression dans les cellules non traitées (environ $2,5 \cdot 10^6$ RLU/puit).

II.11.2. Après transfection d'un ADN (*Gaussia luciferase*)

Le dosage de la luciférase de *Gaussia* diffère de celui de la luciférase de FireFly compte tenu du fait que la luciférase de *Gaussia* est excrétée par les cellules et, donc, est présente majoritairement dans le surnageant. Par ailleurs, le substrat de l'enzyme est également différent puisqu'il s'agit de la coéluentérazine.

À la fin de l'incubation (24 h), 2 μ L du surnageant de chaque puits sont transférés dans une plaque à 96 puits (non traitée), contenant au préalable 200 μ L du milieu de culture (non supplémenté et sans rouge de phénol) correspondant au type cellulaire testé. Une homogénéisation est réalisée à l'aide d'une pipette multicanaux, par aspiration et refoulement, puis 20 μ L sont transférés dans une plaque à 96 demi puits à fond blanc. Pour les mesures au bioluminomètre, 50 μ L d'une dilution au 100^{ème} d'une solution de coelenterazine native (1,47 mM dans l'EtOH) dans le milieu de culture (non supplémenté et sans rouge de phénol) sont ajoutés à chaque puits et la bioluminescence est enregistrée pendant 1 seconde.

L'expression du gène de la luciférase est exprimée en RLU/puit, en tenant compte de la dilution au 1/101^{ème} réalisée. En complément du dosage de la luciférase, un dosage de protéine (BCA) est effectué, afin de pondérer les résultats de transfection et de les exprimer en RLU/mg de protéines.

II.12. Dosage de protéines (BCA)

Le dosage de protéine utilisé est un test classique à l'acide bicinchoninique (BCA) et qui a été réalisé pour quantifier la viabilité cellulaire à la suite d'une expérience de transfection d'ADN, dans le modèle de gène rapporteur de la luciférase, afin d'exprimer l'activité de transfection en RLU/mg de protéine.

Après retrait du surnageant, les échantillons cellulaires à tester sont lysés par addition de 20 μ L de Tampon de Lyse 1X (Proméga) puis dilué avec 80 μ L d'eau. À partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, 2 mg/mL dans H₂O), une gamme étalon est réalisée (0,025 à 1,6 mg/mL) dans le même tampon que les échantillons (20 % de tampon de lyse 1X). Puis, 25 μ L d'étalon ou d'échantillon sont déposés dans une plaque 96 puits, et 200 μ L de réactif BCA (sulfate

de cuivre II/acide bicinchoninique 2:98, Uptima) sont ajoutés dans les puits qui sont incubés pendant 30 minutes à 37 °C. L'absorbance dans chaque puits est mesurée à 570 nm et la viabilité cellulaire est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{milieu seul}})}{(\text{Abs}_{\text{cellules non traitées}} - \text{Abs}_{\text{milieu seul}})} \times 100.$$

II.13. Test de viabilité cellulaire au MTT

Le test au MTT a été utilisé pour la détermination de l'IC₅₀ de nos composés, mais également pour mesurer la viabilité cellulaire dans certaines expériences de transfection d'ADN thérapeutique (TRAIL).

Brièvement, le réactif MTT (Sigma-Aldrich) est dissous dans le milieu de culture correspondant à la lignée cellulaire étudiée (RPMI ou DMEM/F12) et à la concentration de travail désirée (3 mg/mL ou 6 mg/mL), par agitation au vortex et par sonication. Un volume de cette solution de MTT est ajouté au puits à doser, de sorte à atteindre une concentration finale de 0,5 mg/mL. Après incubation d'une heure à 37 °C, le surnageant est précautionneusement retiré et 100 µL de DMSO sont ajoutés pour solubiliser les cristaux de formazan formés au cours de l'incubation. L'absorbance est mesurée à 492 nm et la viabilité cellulaire est calculée selon la même formule que précédemment.

III. Expériences *in vitro*

III.1. Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasques de culture (Corning, T₂₅ ou T₇₅) et maintenues à 37 °C dans un incubateur, sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Les cellules épithéliales pulmonaires humaines alvéolaires (A549) et bronchiques (16HBE) ont été cultivées dans le DMEM-F12 (Gibco), sans rouge de phénol et supplémenté par 10 % de SVF (Eurobio), 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL) et stabilisé par le tampon Hepes (5 mM final).

Les cellules métastatiques pulmonaires humaines NCI-H292 ont été cultivées dans le RPMI-1640 (Gibco), sans rouge de phénol et supplémenté par 10 % de SVF (Eurobio), de la L-Glutamine (2 mM final), 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL) et stabilisé par le tampon Hepes (10 mM final) contenant du pyruvate de sodium (1 mM final).

Les cellules cancéreuses colorectales HCT116 ont été cultivées dans le RPMI-1640 (Gibco), sans rouge de phénol et supplémenté par 10 % de SVF (Eurobio), 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL).

Les cellules A549-Luc sont une version génétiquement modifiée des cellules A549. Elles expriment de façon permanente le gène rapporteur de la luciférase. Elles ont été cultivées dans le RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), avec rouge de phénol et supplémenté par 10 % de SVF (Eurobio), 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL). Ces cellules ont été maintenues sous une pression de sélection par du G418 à 0,8 µg/mL (Promega).

III.2. Transfection *in vitro*

L'ensemble des expériences de transfection d'acide nucléique ont été conduites en présence de sérum de veau fœtal (SVF), à hauteur de 10 % du volume total utilisé.

III.2.1. Transfection *in vitro* avec un siARN

Pour les expériences de transfection de siARN, les cellules A549-Luc sont disposées dans une plaque à 96 puits (Corning) à raison de 10.000 cellules par puits, dans 100 µL de milieu de culture. Les particules de transfection sont ensuite ajoutées, à la concentration requise, dans 100 µL de milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 48 h à 37 °C.

Pratiquement, pour une transfection conduite en triplicat à 10 nM en siARN, une préparation de 350 µL de lipoplexes (20 nM en siARN ou 840 nM en phosphate) est nécessaire, ce qui correspond à 0,294 nmol de lipide cationique pour un N/P de 1. Après séchage au SpeedVac de la quantité de lipide cationique requise pour l'expérience (*vide supra*), le siARN (35 µL ; 200 nM dans

du glucose à 5 %) est ajouté et le mélange est agité pendant 20 secondes au vortex, puis incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Les lipoplexes ainsi obtenus sont dilués au 10^{ème} dans le milieu de culture et 100 µL de la solution sont déposés dans des puits dans lesquels 10.000 cellules A549-Luc dans 100 µL de milieu de culture ont été préalablement déposées, ce qui fait une concentration finale en siARN de 10 nM.

L'INTERFERin® (Polyplus-Transfection), utilisée dans les conditions recommandées par le fournisseur, nous fournit un contrôle positif de l'expérience. Pour préparer 350 µL de solution contenant un complexe INTERFERin®/siARN, le siARN (siLucU ou sic ; 6,6 µL à 1 µM dans H₂O) est dilué dans l'OPTI-MEM (322 µL), puis l'INTERFERin® (1,7 µL) est ajoutée. L'ensemble est homogénéisé et incubé 10 minutes à température ambiante. Un volume de 100 µL de cette solution est ensuite ajouté dans les puits contenant les cellules fraîchement déposées. Le contrôle négatif, quant à lui, est obtenu en ajoutant de 100 µL de milieu de culture dans les puits.

L'expression du gène de la luciférase est déterminée après 48 h d'incubation à 37 °C, selon la procédure décrite précédemment. Elle est exprimée en pourcentage d'expression de la Luciférase par rapport au niveau basal d'expression de la protéine dans les cellules non traitées. La viabilité cellulaire est également déterminée, à l'aide d'un dosage de protéine et selon le protocole décrit plus haut.

III.2.2. Transfection *in vitro* avec un ADN

Pour les expériences de transfection d'ADN, les cellules (dans 100 µL) sont déposées dans une plaque à 96 puits (Corning) 24 h avant le dépôt des lipoplexes, à raison de 9.000 (NCI-H292), 12.000 (16HBE) ou 6.000 (A549) cellules par puits.

Pour une transfection conduite en triplicat à 11 µM en ADN (soit 0,4 µg/puits), une préparation de 40 µL de lipoplexes (121 µM en phosphate ou 0,04 µg/µL d'ADN) est nécessaire, ce qui correspond à 4,85 nmol de lipide cationique pour un N/P de 1. Après séchage au SpeedVac de la quantité de lipide cationique requise, l'ADN (40 µL à 0,04 µg/µL dans le glucose à 5 %) est ajouté et une agitation de 20 secondes au vortex, suivie d'une incubation de 30 minutes à température ambiante, conduisent aux lipoplexes. Ceux-ci sont ensuite déposés dans les puits contenant les cellules déposées la veille, à raison de 10 µL par puits, ce qui correspond à une concentration finale en ADN de 11 µM (soit 0,4 µg d'ADN par puits).

La Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) sert de contrôle positif dans nos expériences de transfection avec de l'ADN. Elle est utilisée dans les conditions recommandées par le fournisseur. Une solution de Lipofectamine® 2000, préalablement diluée dans l'OPTI-MEM (1/25), est mélangée à une solution d'ADN (0,02 µg/µL dans l'OPTI-MEM) et l'ensemble est incubé 10 minutes à température ambiante avant addition (10 µL) dans les puits contenant les

cellules. Dans ces conditions, la concentration finale en ADN est de 2,8 μM (P) et correspondant à un dépôt de 0,1 μg d'ADN dans chaque puits. Le contrôle négatif est obtenu par l'ajout de glucose 5 % (10 μL), sans ADN, dans les puits.

L'expression du gène de la luciférase est déterminée après une incubation de 24 h à 37 °C, selon la procédure décrite précédemment et elle est exprimée, selon l'expérience, en RLU/puits ou en RLU/mg de protéine, la quantité de protéine présente dans chaque puits étant déterminée par un dosage BCA (*vide supra*).

III.3. Mesure de l'IC₅₀ des composés

Pour ces expériences, les cellules testées sont déposées dans une plaque à 96 puits, à raison de 9.000 (NCI-H292), 12.000 (16HBE), ou 6.000 (A549) cellules par puit, dans 100 μL . Après 24 h d'incubation, on retire 25 μL de milieu de culture de chaque puit, qu'on remplace par 25 μL d'une solution liposomale du composé à tester. Pour préparer les solutions liposomales, l'APL ou le pro-APL (3,6 μmol) est introduit dans un pilulier en verre à partir d'une solution éthanolique qu'on réduit ensuite sous vide. Une solution de glucose à 5 % est ajoutée sur le lipide et l'ensemble est agité pendant 20 secondes à l'aide d'un vortex à sa puissance maximale. Des dilutions en cascade dans le glucose à 5 % sont réalisées afin de générer des solutions liposomales de concentrations décroissantes. Puis, 25 μL de ces solutions sont déposés dans les puits contenant les cellules, et les plaques sont replacées dans l'incubateur à 37 °C. Un ajout de 25 μL de glucose à 5 % constitue le témoin négatif. La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide d'un test MTT après 24 h d'incubation.

Cette expérience a également été effectuée pour évaluer la toxicité des lipoplexes, la différence résidant alors dans l'emploi de différentes solutions de glucose à 5 % qui contiennent de l'ADN.

III.4. Contrôle de l'expression des récepteurs de TRAIL dans les lignées cellulaires

Ces expériences ont été réalisées par Cendrine Seguin (UMR 7199, équipe 3Bio).³⁵¹ Les cellules à étudier (10^6) ont été lavées par une solution de PBS contenant 2 % de SVF, puis incubées à 4 °C pendant 30 minutes avec un anticorps, conjugué à un marqueur fluorescent et dirigé contre TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 ou TRAIL-R4 (clone BK9 Diaclone, Besançon, France), aux concentrations préconisées par le fournisseur. Après deux étapes de lavage avec la solution de PBS-SVF 2 %, l'expression de TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 et TRAIL-R4 a été mesurée par cytométrie en flux (Guava easyCyte™, Merck Milipore) et les données ont été traitées à l'aide du logiciel InCyte (Merck Milipore).

III.5. Étude de la sensibilité des lignées cellulaires à TRAIL

Ces expériences ont été réalisées avec l'aide de Cendrine Seguin.^{350,351}

À partir d'une solution de SuperKillerTRAIL à 0,5 mg/mL (Enzo Life Sciences), une gamme de dilutions (1,1 ng/mL à 2,2 µg/mL) est préparée dans le PBS. Un volume de 10 µL de ces différentes solutions est ajouté dans des puits dans lesquels, 4 h plus tôt, on a déposé 30.000 cellules (NCI-H292, 16HBE, A549, ou HCT116) dans 100 µL. Après une incubation de 24 h à 37 °C, la viabilité cellulaire est déterminée par un test MTT.

III.6. Mesure de l'activité hémolytique des composés

À partir d'une solution liposomale d'APL ou pro-APL (3 mM dans le glucose à 5 %), une gamme d'échantillons à des concentrations allant de 45 µM à 3 mM est préparée (dans le glucose à 5 %). Les échantillons (10 µL) sont ensuite déposés en plaque de 96 puits et complétés par 140 µL d'une suspension d'érythrocytes. L'utilisation de 10 µL de glucose à 5 % constitue le témoin négatif alors que le témoin positif est obtenu par utilisation de 10 µL de Triton X-100 à 10 mM.

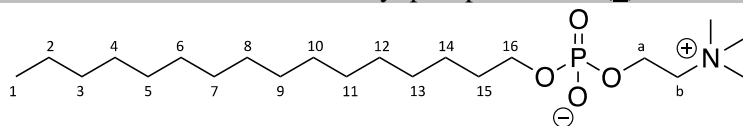
Préparation des érythrocytes.³⁵³ Un volume de 5 mL de sang de mouton (Eurobio) est centrifugé à 500 g, pendant 5 minutes. Le niveau des hématocrites (rouges, phase inférieure) et celui du plasma (jaunâtre, phase supérieure) sont repérés sur le tube et le surnageant est retiré et remplacé par du PBS (Gibco, pH 7,4). La solution sanguine est homogénéisée et est soumise au même traitement que le sang initial. Cette procédure est répétée trois fois et, à la fin de la troisième homogénéisation dans le PBS, une dilution au 1/25 est réalisée pour obtenir une suspension de globules rouges à 4 % d'hématocrites. À l'aide d'un bac à prélèvement et d'une pipette à multicanaux, 140 µL de la suspension de globules rouges sont ajoutés aux échantillons présents dans les puits (la gamme de concentration finale des échantillons est alors de 3 µM à 200 µM). Après une incubation d'une heure à 37 °C (ou plus selon les conditions testées), les plaques sont centrifugées à 250 g pendant 10 minutes, puis les surnageants (100 µL) sont transférés dans une autre plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Le taux d'hémolyse est obtenu à l'aide la formule suivante :

$$\text{Hémolyse (\%)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}})}{(\text{Abs}_{\text{témoin positif}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}})} \right] \times 100.$$

IV. Synthèse des composés

IV.1. Synthèse de la miltéfosine

Miltéfosine : Hexadécyl phosphocholine (**1**)



C₂₁H₄₆NO₄P (407,58 g/mol)

De la triméthylamine en solution aqueuse ($\approx 45\%$ en poids ; 5 mL ; 34,3 mmol) est ajoutée à du 2-bromoéthyl hexadécyl hydrogénophosphate **62** (1,00 g ; 2,33 mmol) en solution dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}/i\text{PrOH}$ 3:5:5 (13 mL), à température ambiante et sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé à 70 °C jusqu'à conversion complète (CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3). Le milieu est concentré sous vide, puis extrait avec un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:3 à 1:2). Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite deux fois avec le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ et la phase organique résultante est lavée par une solution saturée de NaCl, concentrée sous vide, diluée dans CHCl_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **1** (770 mg ; 81 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3 à 45:45:10).

$R_f = 0,1$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,85 (t ; $J = 6,2$ Hz ; 3H₁) ; 1,24 (m ; 26H₂₋₁₄) ; 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,4$ Hz ; 2H₁₅) ; 3,31 (s ; 9H_c) ; 3,62 (m ; 2H_b) ; 3,85 (td ; $J_1 = J_2 = 6,5$ Hz ; 2H₁₆) ; 4,23 (m ; 2H_a).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,3 (C₁) ; 23,2 (C₂) ; 26,4 (C₁₄) ; 30,1 (2C) ; 30,3 (8C) ; 31,3 (C₁₅) ; 32,5 (C₃) ; 54,5 (3C_c) ; 59,7 (C_a) ; 66,7 (C₁₆) ; 67,0 (C_b).

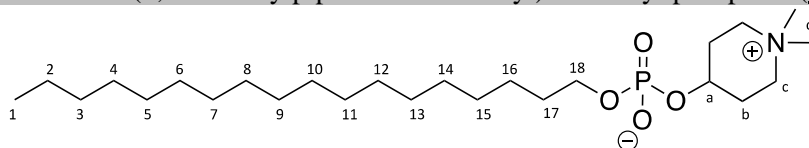
RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 0,3.

IR ν_{max} : 497 ; 716 ; 746 ; 853 ; 927 ; 957 ; 1050 ; 1126 ; 1246 ; 1471 ; 1633 ; 2849 ; 2914 ; 3372.

HR-MS (ESI+) m/z : 408,3239 [M+H]⁺ trouvée ; 408,3237 calculée pour (C₂₁H₄₇NO₄P⁺).

IV.2. Synthèse de la périfosine

Périfosine : (1,1-diméthylpipéridin-1-ium-4-yl) octadécyl phosphate (**2**)



C₂₅H₅₂NO₄P (461,67 g/mol)

De l'oxychlorure de phosphore (864 μL ; 9,2 mmol) est ajouté à une solution d'héxadécanol (2,5 g ; 9,2 mmol) dans l' Et_2O anhydre (100 mL), à 0 °C. De la triéthylamine (1,29 mL ; 9,2 mmol) est ensuite ajoutée goutte à goutte à 0 °C et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures, puis filtré et dissout à nouveau dans CHCl_3 anhydre (100 mL). Parallèlement, de la triéthylamine (3 mL ; 21,5 mmol) est ajoutée à une solution de tosylate de *N,N*-diméthyl-4-hydroxypipéridinium **63** (2,78 g ; 9,24 mmol) dans CHCl_3 anhydre (100 mL) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures. Le phosphodichlorure d'héxadecyl précédemment préparé est ajouté au milieu réactionnel et agité 2 jours à température ambiante et en présence de DMAP (65 mg ; 0,53 mmol). Le milieu est concentré sous vide et dissout à nouveau dans le THF (100 mL) puis il est décomposé par addition de H_2O (2 mL) et chauffé 6 heures à reflux et enfin concentré sous vide. Le produit attendu **2** (700 mg ; 16 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 10:6:1).

$R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,85 (t ; $J = 6,5$ Hz ; 3H_1) ; 1,24 (m ; 30H_{2-16}) ; 1,59 (m ; 2H_{17}) ; 2,10 (m ; 4H_b) ; 3,09 (s ; 3H_{d1}) ; 3,16 (s ; 3H_{d2}) ; 3,25-3,53 (m ; 4H_c) ; 3,82 (m ; 2H_{18}) ; 4,40 (m ; 1H_a).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,3 (C_1) ; 23,2 (C_2) ; 26,4 (C_{16}) ; 27,2 (2C_b) ; 29,9 ; 30,0 ; 30,2 (10C) ; 31,5 (C_{17}) ; 32,5 (C_3) ; 55,4 (2C_d) ; 59,2 (2C_c) ; 65,0 (C_a) ; 66,6 (C_{18}).

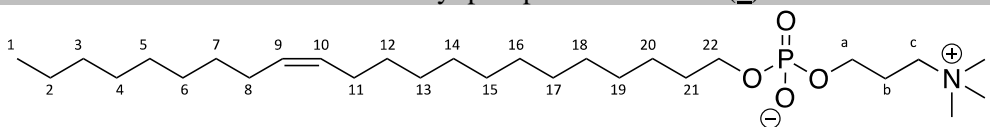
RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 0,4.

IR ν_{max} : 479 ; 720 ; 846 ; 919 ; 994 ; 1062 ; 1124 ; 1156 ; 1225 ; 1468 ; 2848 ; 2916.

HR-MS (ESI+) m/z : 484,3528 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ trouvée ; 484,3526 calculée pour ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NNaO}_4\text{P}^+$).

IV.3. Synthèse de l'érufosine

Erufosine : Erucyl phosphohomocholine (**3**)



C₂₈H₅₈ClNO₄P (503,75 g/mol)

De la triméthylamine en solution aqueuse (≈ 45 % en poids ; 3 mL ; 20,2 mmol) est ajoutée à de l'oxyde de 2-érucyl-1,3-dioxa-2-phosphinane **65** (200 mg ; 0,45 mmol) en solution dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}/i\text{PrOH}$ 3:5:5 (8 mL), à température ambiante et sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé à 70 °C et agité un peu plus de 24 heures (CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3), puis il est concentré sous vide. Le résidu est dilué dans CHCl_3 et lavé par une solution saturée de NaCl. La décantation est améliorée par ajout de MeOH, puis les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite deux fois avec CHCl_3 et la phase organique résultante est concentrée sous

vide, diluée dans CHCl_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **3** (123 mg ; 50 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3 à 45:45:10).

$R_f = 0,28$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,86 (t ; $J = 6,2$ Hz ; 3H_1) ; 1,25 (m ; $30\text{H}_{2-7,12-20}$) ; 1,60 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,00 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,04 (m ; 2H_b) ; 3,11 (s ; 9H_d) ; 3,47 (m ; 2H_c) ; 3,82 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 3,9 (td ; $J_1 = J_2 = 6,1$ Hz ; 2H_a) ; 5,31 (m ; $2\text{H}_{9,10}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz, MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,3 (C_1) ; 23,2 (C_2) ; 25,1 (C_b) ; 26,4 (C_{20}) ; 27,7 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 29,8 (2C) ; 29,9 ; 30,0 ; 30,1 (2C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (2C) ; 31,4 (C_{21}) ; 32,4 (C_3) ; 53,4 (3C_d) ; 61,9 (C_a) ; 64,9 (C_c) ; 66,2 (C_{22}) ; 130,3 ($2\text{C}_{9,10}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz, MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,7.

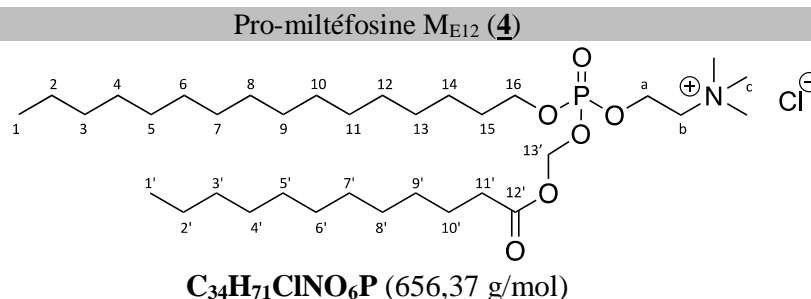
IR ν_{max} : 528 ; 553 ; 721 ; 840 ; 945 ; 1059 ; 1092 ; 1223 ; 1466 ; 1480 ; 1640 ; 2850 ; 2919 ; 3271.

HR-MS (ESI+) m/z : 504,4193 $[\text{M}+\text{H}]^+$ trouvée ; 504,4176 calculée pour ($\text{C}_{28}\text{H}_{59}\text{NO}_4\text{P}^+$).

IV.4. Procédure générale pour la synthèse des pro-APLs (PG1)

Une solution d'électrophile **27** à **35**, **43** à **49**, **52**, **53**, **55** ou encore **61** dans le CHCl_3 anhydre (2 mL) est ajoutée au lipide APL approprié **1** (miltéfosine), **2** (périfosine) ou **3** (érufosine) en solution dans le CHCl_3 (10 mL), à température ambiante et sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux du solvant et agité pendant 24 heures (suivi par CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3). Le brut réactionnel est concentré sous vide, puis directement purifié par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0 à 7:3).

IV.5. Les pro-APLs de I^{ère} génération (M_{Yn} , E_{Yn} , P_{Yn})



Le produit $\text{M}_{\text{E}12}$ **4** (136,1 mg ; 42 %) est obtenu par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (199,7 mg ; 0,49 mmol) avec le dodécanoate de chlorométhyle **27** (979,6 mg ; 3,94 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,48$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

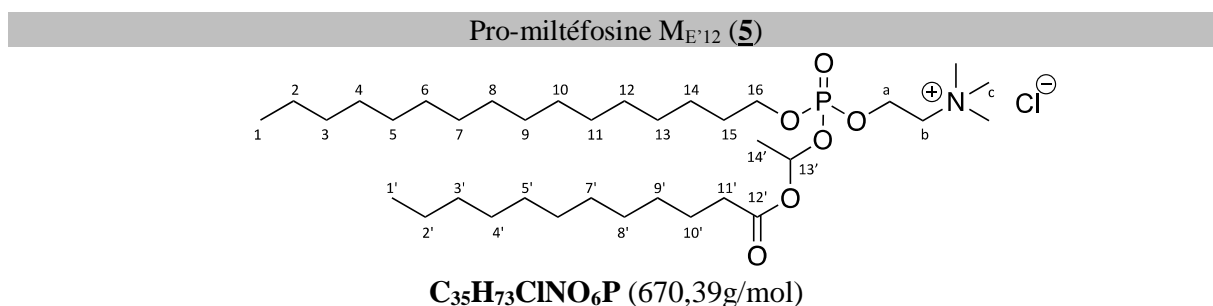
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃): 0,85 (t ; $J = 6,3$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,24 (m ; 42H_{2-14,2'-9'}); 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{10'}); 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; 2H₁₅); 2,40 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{11'}); 3,23 (s ; 9H_c); 3,76 (m ; 2H_b); 4,11 (td ; $J_1 = J_2 = 6,3$ Hz ; 2H₁₆); 4,5 (m, 2H_a); 5,64 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,4$ Hz ; $J_{BX} = 11,4$ Hz ; 2H_{13'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}); 23,3 (2C_{2,2'}); 25,1 (C_{10'}); 25,9 (C₁₄); 29,7; 29,8; 29,9; 30,0 (2C); 30,1 (4C); 30,2 (7C); 30,7 (C₁₅); 32,5 (2C_{3,3'}); 34,6 (C_{11'}); 54,7 (3C_c); 62,3 (C_a); 66,5 (C_b); 70,2 (C₁₆); 84,2 (C_{13'}); 173,2 (C_{12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,8.

IR ν_{max} : 458; 490; 721; 832; 873; 965; 1042; 1159; 1264; 1468; 1760; 2849; 2917; 2956; 3382.

HR-MS (ESI+) m/z : 620,5004 [M-Cl]⁺ trouvée ; 620,5014 calculée pour (C₃₄H₇₁NO₆P⁺).



Le produit ME¹² **5** (169,7 mg ; 51 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (201,0 mg ; 0,49 mmol) avec le dodécanoate de chloro-1-éthyle **28** (1,04 g ; 3,95 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomère n°1 :

$R_f = 0,51$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃): 0,85 (t ; $J = 6,1$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,24 (m ; 42H_{2-14,2'-9'}); 1,58 (d ; $J = 5,3$ Hz ; 3H_{14'}); 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{10'}); 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; 2H₁₅); 2,37 (t ; $J = 7,2$ Hz ; 2H_{11'}); 3,24 (s ; 9H_c); 3,76 (m ; 2H_b); 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,7$ Hz ; 2H₁₆); 4,50 (m, 2H_a); 6,42 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,3$ Hz ; 1H_{13'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}); 21,7 (C_{14'}); 23,4 (2C_{2,2'}); 25,3 (C_{10'}); 26,1 (C₁₄); 29,6; 29,7; 29,8; 29,9; 30,0 (2C); 30,1 (2C); 30,2 (4C); 30,3 (4C); 30,7 (C₁₅); 32,5 (2C_{3,3'}); 34,5 (C_{11'}); 54,6 (3C_c); 62,3 (C_a); 66,5 (C_b); 70,0 (C₁₆); 92,4 (C_{13'}); 173,3 (C_{12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 6,0.

Diastéréoisomère n°2 :

$R_f = 0,42$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3): 0,86 (t ; $J = 6,2$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$); 1,24 (m ; $42\text{H}_{2-14,2'-9'}$); 1,56 (d ; $J = 5,3$ Hz ; $3\text{H}_{14'}$); 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; $2\text{H}_{10'}$); 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; 2H_{15}); 2,37 (t ; $J = 7,3$ Hz ; $2\text{H}_{11'}$); 3,24 (s ; 9H_c); 3,76 (m ; 2H_b); 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,3$ Hz ; 2H_{16}); 4,50 (m, 2H_a); 6,42 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,3$ Hz ; $2\text{H}_{13'}$).

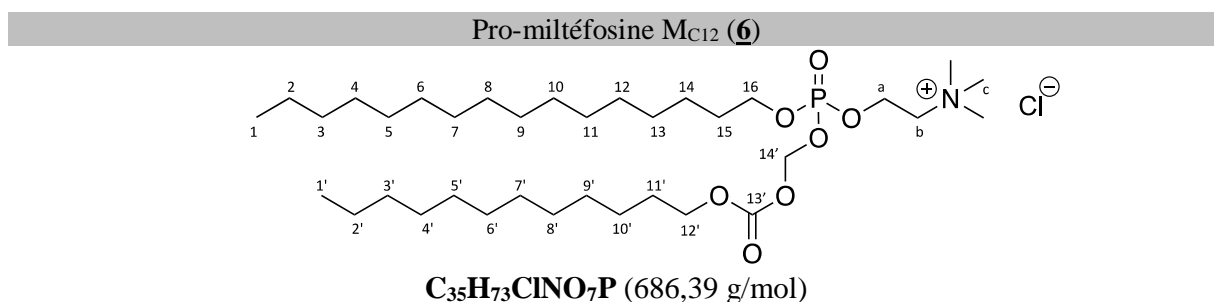
RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,5 ($2\text{C}_{1,1'}$); 21,6 ($\text{C}_{14'}$); 23,4 ($2\text{C}_{2,2'}$); 25,3 ($\text{C}_{10'}$); 26,1 (C_{14}); 29,6; 29,7; 29,8; 29,9; 30,0 (2C); 30,1 (2C); 30,2 (4C); 30,3 (4C); 30,7 (C_{15}); 32,5 ($2\text{C}_{3,3'}$); 34,5 ($\text{C}_{11'}$); 54,6 (3C_c); 62,1 (C_a); 66,5 (C_b); 70,2 (C_{16}); 92,3 ($\text{C}_{13'}$); 172,8 ($\text{C}_{12'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 5,6.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

IR ν_{max} : 509; 721; 934; 976; 1050; 1082; 1165; 1238; 1267; 1467; 1755; 2849; 2916; 2956; 3389.

HR-MS (ESI+) m/z : 634,5167 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 634,5170 calculée pour ($\text{C}_{35}\text{H}_{73}\text{NO}_6\text{P}^+$).



Le produit $\text{M}_{\text{C}12}$ **6** (86,1 mg ; 26 %) est obtenu par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (200 mg ; 0,49 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et de dodécyle **31** (1,06 g ; 3,78 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,56$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

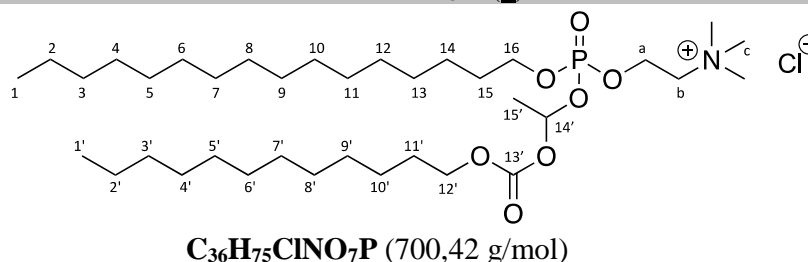
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,85 (t ; $J = 6,3$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$); 1,24 (m ; $44\text{H}_{2-14,2'-10'}$); 1,69 (m ; $4\text{H}_{15,11'}$); 3,23 (s ; 9H_c); 3,77 (m ; 2H_b); 4,13 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{16}); 4,19 (t, $J = 6,7$ Hz ; $2\text{H}_{12'}$); 4,52 (m ; 2H_a); 5,66 (m ; $2\text{H}_{14'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,5 ($2\text{C}_{1,1'}$); 23,2 ($2\text{C}_{2,2'}$); 25,9 (C_{14}); 26,2 ($\text{C}_{10'}$); 29,1 ($\text{C}_{11'}$); 29,7; 29,8; 29,9 (2C); 30,1 (2C); 30,2 (5C); 30,3 (5C); 30,7 (C_{15}); 32,5 ($2\text{C}_{3,3'}$); 54,6 (3C_c); 62,3 (C_a); 66,4 (C_b); 70,1 ($\text{C}_{12'}$); 70,4 (C_{16}); 86,8 ($\text{C}_{14'}$); 154,5 ($\text{C}_{13'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 3,6.

IR ν_{max} : 670; 771; 950; 1042; 1266; 1468; 1762; 2850; 2918; 3378.

HR-MS (ESI+) m/z : 650,5135 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 650,5119 calculée pour ($\text{C}_{35}\text{H}_{73}\text{NO}_7\text{P}^+$).

Pro-miltéfosine $M_{C^{12}}$ (**7**)

Le produit $M_{C^{12}}$ **7** (201 mg ; 59 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (199,7 mg ; 0,49 mmol) avec le carbonate de chloro-1-éthyle et de dodécyle **32** (1,16 g ; 3,97 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

$R_f = 0,61$ et $0,48$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

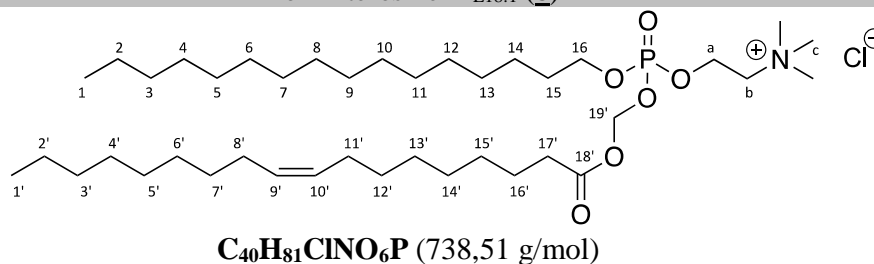
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,3$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 44H_{2-14,2'-10'}) ; 1,60 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{15'}) ; 1,68 (m ; 4H_{15,11'}) ; 3,23 (s ; 9H_c) ; 3,75 (m ; 2H_b) ; 4,10-4,25 (m ; 2H₁₆ et 2H_{12'}) ; 4,49 (m, 2H_a) ; 6,35 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 1H_{14'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,4 (2C_{1,1'}) ; 21,6 (C_{15'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 26,0 (C₁₄) ; 26,2 (C_{10'}) ; 29,1 (C_{11'}) ; 29,9 ; 30,0 (2C) ; 30,1 (2C) ; 30,2 (5C) ; 30,3 (6C) ; 30,7 (C₁₅) ; 32,5 (2C_{3,3'}) ; 54,6 (3C_c) ; 62,2 (C_a) ; 66,3 (C_b) ; 69,8 (C_{12'}) ; 69,7 (C₁₆) ; 96,0 (C_{14'}) ; 154,1 (C_{13'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,6 et - 6,0.

IR ν_{max} : 515 ; 721 ; 787 ; 878 ; 950 ; 973 ; 1051 ; 1268 ; 1397 ; 1467 ; 1758 ; 2849 ; 2916 ; 2956 ; 3383.

HR-MS (ESI+) m/z : 664,5294 [M-Cl]⁺ trouvée ; 664,5276 calculée pour (C₃₆H₇₅NO₇P⁺).

Pro-miltéfosine $M_{E18:1}$ (**8**)

Le produit $M_{E18:1}$ **8** (129 mg ; 36 %) est obtenu par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (199 mg ; 0,49 mmol) avec l'oléate de chlorométhyle **29** (1,15 g ; 3,46 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,43$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,85 (t ; $J = 6,0$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 46H_{2-14,2'-7',12'-15'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{16'}) ; 1,70 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; 2H₁₅) ; 1,99 (m ; 4H_{8',11'}) ;

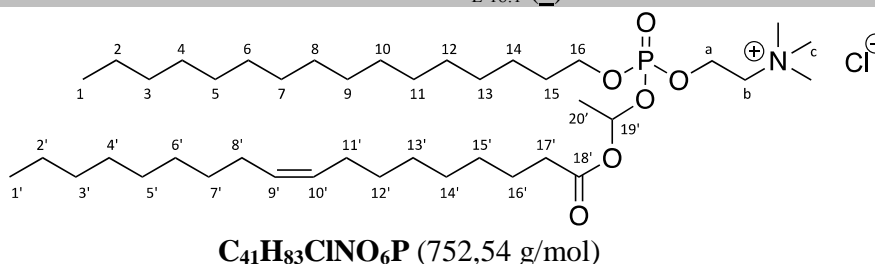
2,40 (t ; $J = 7,3$ Hz ; $2H_{17'}$) ; 3,23 (s ; $9H_c$) ; 3,75 (m ; $2H_b$) ; 4,11 (td ; $J_1 = J_2 = 6,7$ Hz ; $2H_{16}$) ; 4,50 (m, $2H_a$) ; 5,31 (m ; $2H_{9',10'}$) ; 5,64 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 14,5$ Hz ; $J_{BX} = 11,5$ Hz ; $2H_{19'}$).
RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : 14,5 ($2C_{1,1'}$) ; 23,4 ($2C_{2,2'}$) ; 25,2 ($C_{16'}$) ; 26,1 (C_{14}) ; 27,9 ($2C_{8',11'}$) ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ($2C$) ; 30,1 ($3C$) ; 30,2 ($4C$) ; 30,3 ($6C$) ; 30,9 (C_{15}) ; 32,5 ($2C_{3,3'}$) ; 34,5 ($C_{17'}$) ; 54,6 ($3C_c$) ; 62,2 (C_a) ; 66,4 (C_b) ; 70,4 (C_{16}) ; 83,6 ($C_{19'}$) ; 130,3 ($C_{9'}$) ; 130,7 ($C_{10'}$) ; 172,2 ($C_{18'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : - 3,8.

IR ν_{max} : 477 ; 721 ; 773 ; 826 ; 875 ; 962 ; 1031 ; 1164 ; 1267 ; 1414 ; 1467 ; 1759 ; 2849 ; 2918 ; 2956 ; 3396.

HR-MS (ESI+) m/z : 702,5781 $[M-Cl]^+$ trouvée ; 702,5796 calculée pour ($C_{40}H_{81}NO_6P^+$).

Pro-miltéfosine $M_{E'18:1}$ (**9**)



Le produit $M_{E'18:1}$ **9** (156,9 mg ; 44 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (192 mg ; 0,47 mmol) avec l'oléate de chloro-1-éthyle **30** (1,30 g ; 3,76 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomère n° 1 :

$R_f = 0,53$ ($CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN 1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : 0,85 (t ; $J = 6,2$ Hz ; $6H_{1,1'}$) ; 1,24 (m ; $46H_{2-14,2'-7',12'-15'}$) ; 1,58 (d ; $J = 5,1$ Hz ; $2H_{20'}$) ; 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; $2H_{16'}$) ; 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; $2H_{15}$) ; 1,99 (m ; $4H_{8',11'}$) ; 2,37 (t ; $J = 7,3$ Hz ; $2H_{17'}$) ; 3,24 (s ; $9H_c$) ; 3,77 (m ; $2H_b$) ; 4,08 (td ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; $2H_{16}$) ; 4,50 (m, $2H_a$) ; 5,27-5,35 (m ; $2H_{9',10'}$) ; 6,42 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,1$ Hz ; $1H_{19'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : 14,5 ($2C_{1,1'}$) ; 21,6 ($C_{20'}$) ; 23,3 ($2C_{2,2'}$) ; 25,3 ($C_{16'}$) ; 26,1 (C_{14}) ; 27,8 ($2C_{8',11'}$) ; 29,6 ; 29,7 ($3C$) ; 29,9 ($4C$) ; 30,1 ; 30,2 ($4C$) ; 30,3 ($5C$) ; 30,7 (C_{15}) ; 32,7 ($2C_{3,3'}$) ; 34,7 ($C_{17'}$) ; 54,6 ($3C_c$) ; 62,3 (C_a) ; 66,5 (C_b) ; 70,0 (C_{16}) ; 92,5 ($C_{19'}$) ; 130,4 ($C_{9'}$) ; 130,6 ($C_{10'}$) ; 173,2 ($C_{18'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : - 6,0.

Diastéréoisomère n°2 :

$R_f = 0,42$ ($CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN 1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 $CDCl_3$) : 0,86 (t ; $J = 6,1$ Hz ; $6H_{1,1'}$) ; 1,24 (m ; $46H_{2-14,2'-7',12'-15'}$) ; 1,56 (d ; $J = 5,1$ Hz ; $2H_{20'}$) ; 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; $2H_{16'}$) ; 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,6$ Hz ; $2H_{15}$) ;

2,00 (m ; 4H_{8',11'}); 2,36 (t ; $J = 7,3$ Hz ; 2H_{17'}); 3,24 (s ; 9H_c); 3,77 (m ; 2H_b); 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,5$ Hz ; 2H₁₆); 4,48 (m, 2H_a); 5,27-5,35 (m ; 2H_{9',10'}); 6,48 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,5$ Hz ; 1H_{19'}).

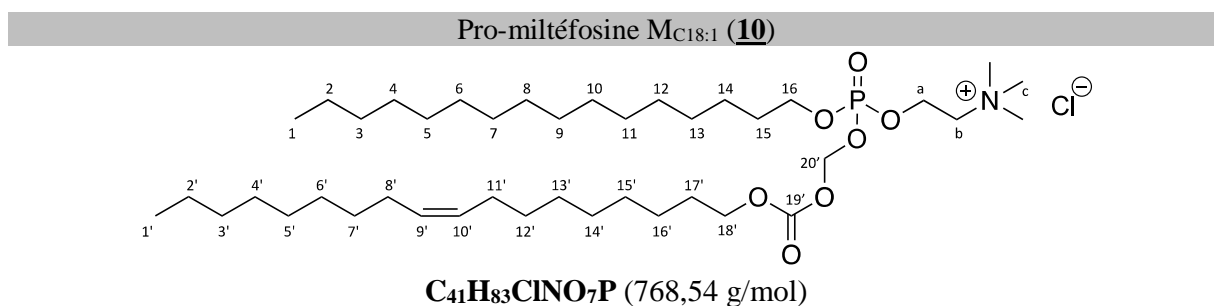
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}); 21,5 (C_{20'}); 23,3 (2C_{2,2'}); 25,3 (C_{16'}); 26,1 (C₁₄); 27,8 (2C_{8',11'}); 29,6; 29,7 (3C); 29,9 (4C); 30,1; 30,2 (4C); 30,3 (5C); 30,7 (C₁₅); 32,7 (2C_{3,3'}); 34,7 (C_{17'}); 54,6 (3C_c); 62,3 (C_a); 66,5 (C_b); 70,0 (C₁₆); 92,4 (C_{19'}); 130,4 (C_{9'}); 130,6 (C_{10'}); 172,8 (C_{18'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,6.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

IR ν_{\max} : 458; 721; 772; 824; 857; 973; 1052; 1084; 1167; 1269; 1378; 1466; 1754; 2850; 2919; 2956; 3397.

HR-MS (ESI+) m/z : 716,5955 [M-Cl]⁺ trouvée ; 716,5953 calculée pour (C₄₁H₈₃NO₆P⁺).



Le produit M_{C18:1} **10** (59,7 mg ; 16 %) est obtenu par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (201,3 mg ; 0,49 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et d'oléyle **33** (1,42 g ; 3,92 mmol) selon la procédure **PG1**.

R_f = 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

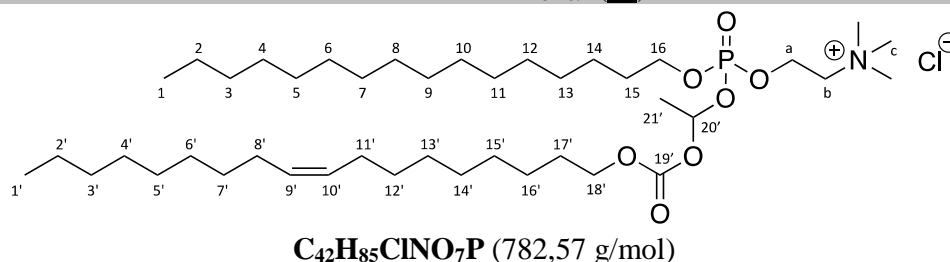
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,1$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,24 (m ; 48H_{2-14,2'-7',12'-16'}); 1,68 (m ; 4H_{15,17'}); 2,00 (m, 4H_{8',11'}); 3,24 (s ; 9H_c); 3,79 (m ; 2H_b); 4,12 (td ; $J_1 = J_2 = 6,7$ Hz ; 2H₁₆); 4,19 (t ; $J = 6,5$ Hz ; 2H_{18'}); 4,52 (m, 2H_a); 5,32 (m ; 2H_{9',10'}); 5,65 (m ; 2H_{20'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}); 23,2 (2C_{2,2'}); 26,0 (C₁₄); 26,4 (C_{16'}); 27,9 (2C_{8',11'}); 29,3 (C_{17'}); 29,8 (2C); 29,9; 30,1 (2C); 30,2; 30,3 (3C); 30,4 (9C); 30,7 (C₁₅); 32,5 (2C_{3,3'}); 54,7 (3C_c); 62,3 (C_a); 66,4 (C_b); 70,1 (C_{18'}); 70,4 (C₁₆); 86,6 (C_{20'}); 130,4 (C_{9'}); 130,6 (C_{10'}); 154,5 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,6.

IR ν_{\max} : 486; 721; 786; 836; 951; 977; 1022; 1049; 1156; 1258; 1417; 1467; 1758; 2850; 2919; 2956; 3390.

HR-MS (ESI+) m/z : 732,5905 [M-Cl]⁺ trouvée ; 732,5902 calculée pour (C₄₁H₈₃NO₇P⁺).

Pro-miltéfosine M_{C^{18:1}} (**11**)

Le produit M_{C^{18:1}} **11** (142,5 mg ; 37 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (200,1 mg ; 0,49 mmol) avec le carbonate de chloro-1-éthyle et d'oléyle **34** (1,47 g ; 3,92 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomère n°1 :

$R_f = 0,62$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,3$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 48H_{2-14,2'-7',12'-16'}) ; 1,61 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{21'}) ; 1,68 (m ; 4H_{15,17'}) ; 2,00 (m, 4H_{8',11'}) ; 3,24 (s ; 9H_c) ; 3,77 (m ; 2H_b) ; 4,08-4,22 (m ; 2H₁₆ et 2H_{18'}) ; 4,52 (m, 2H_a) ; 5,35 (m ; 2H_{9',10'}) ; 6,31 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 1H_{20'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 21,5 (C_{21'}) ; 23,2 (2C_{2,2'}) ; 25,9 (C₁₄) ; 26,2 (C_{16'}) ; 27,7 (2C_{8',11'}) ; 29,1 (C_{17'}) ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 (4C) ; 30,2 (2C) ; 30,2 (2C) ; 30,3 (8C) ; 30,7 (C₁₅) ; 32,5 (2C_{3,3'}) ; 54,6 (3C_c) ; 62,3 (C_a) ; 66,4 (C_b) ; 69,7 (C_{18'}) ; 70,0 (C₁₆) ; 95,9 (C_{20'}) ; 130,4 (C₉) ; 130,6 (C_{10'}) ; 154,0 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 6,0.

Diastéréoisomère n°2 :

$R_f = 0,51$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,1$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 48H_{2-14,2'-7',12'-16'}) ; 1,60 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{21'}) ; 1,68 (m ; 4H_{15,17'}) ; 2,00 (m, 4H_{8',11'}) ; 3,23 (s ; 9H_c) ; 3,76 (m ; 2H_b) ; 4,10-4,18 (m ; 2H₁₆ et 2H_{18'}) ; 4,50 (m, 2H_a) ; 5,35 (m ; 2H_{9',10'}) ; 6,36 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 2H_{20'}).

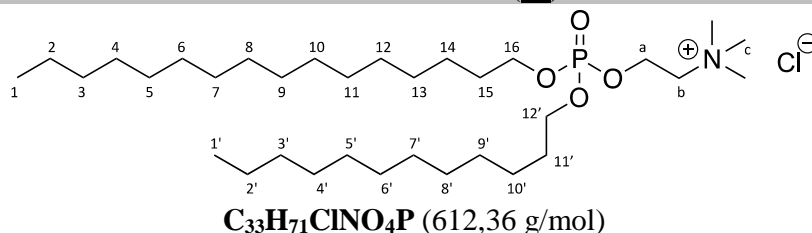
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 21,5 (C_{21'}) ; 23,2 (2C_{2,2'}) ; 25,9 (C₁₄) ; 26,2 (C_{16'}) ; 27,7 (2C_{8',11'}) ; 29,1 (C_{17'}) ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 (4C) ; 30,2 (2C) ; 30,2 (2C) ; 30,3 (8C) ; 30,7 (C₁₅) ; 32,5 (2C_{3,3'}) ; 54,6 (3C_c) ; 62,1 (C_a) ; 66,4 (C_b) ; 69,8 (C_{18'}) ; 70,3 (C₁₆) ; 95,7 (C_{20'}) ; 130,4 (C₉) ; 130,6 (C_{10'}) ; 154,2 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,6.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

IR ν_{\max} : 504 ; 721 ; 788 ; 826 ; 877 ; 972 ; 1047 ; 1260 ; 1394 ; 1464 ; 1756 ; 2851 ; 2920 ; 3378.

HR-MS (ESI+) m/z : 746,6059 [M-Cl]⁺ trouvée ; 746,6058 calculée pour (C₄₂H₈₅NO₇P⁺).

Pro-miltéfosine M₁₂ (**12**)

Le produit M₁₂ **12** (100 mg ; 84 %) est obtenu par *O*-alkylation de la miltéfosine **1** (80 mg ; 0,20 mmol) avec le triflate de dodécyle **35** (162 mg ; 0,53 mmol) selon la procédure **PG1**, mais à température ambiante.

$R_f = 0,70$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

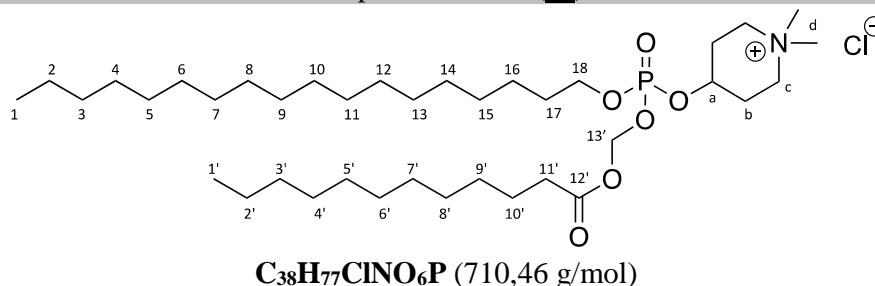
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 44H_{2-14,2'-10'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{15,11'}) ; 3,31 (s ; 9H_c) ; 3,83 (m ; 2H_b) ; 4,08 (m ; 4H_{16,12'}) ; 4,48 (m, 2H_a).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}) ; 22,9 (2C_{2,2'}) ; 25,6 (2C_{14,10'}) ; 29,4 (2C) ; 29,6 (2C) ; 29,7 (2C) ; 29,8 (4C) ; 29,9 (6C) ; 30,5 (2C_{15,11'}) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 54,6 (3C_c) ; 61,2 (C_a) ; 65,9 (C_b) ; 69,2 (2C_{16,12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 2,1.

IR ν_{\max} : 517 ; 574 ; 638 ; 1030 ; 1161 ; 1226 ; 1253 ; 1467 ; 2852 ; 2921 ; 3500.

HR-MS (ESI+) m/z : 576,5108 [M-Cl]⁺ trouvée ; 576,5115 calculée pour (C₃₃H₇₁NO₄P⁺).

Pro-pérfosine P_{E12} (**13**)

Le produit P_{E12} **13** (51 mg ; 22 %) est obtenu par *O*-alkylation la pérfosine **2** (150 mg ; 0,33 mmol) avec le dodécanoate de chlorométhyle **27** (675 mg ; 2,70 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,57$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 46H_{2-16,2'-9'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{10'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H₁₇) ; 2,10-2,32 (m ; 4H_b) ; 2,39 (t ; $J = 7,6$ Hz ; 2H_{11'}) ; 3,17 (s ; 3H_{d1}) ; 3,22 (s ; 3H_{d2}) ; 3,45-3,59 (m ; 4H_c) ; 4,08 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₁₈) ; 4,70 (m ; 1H_a) ; 5,62 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,8$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; 2H_{13'}).

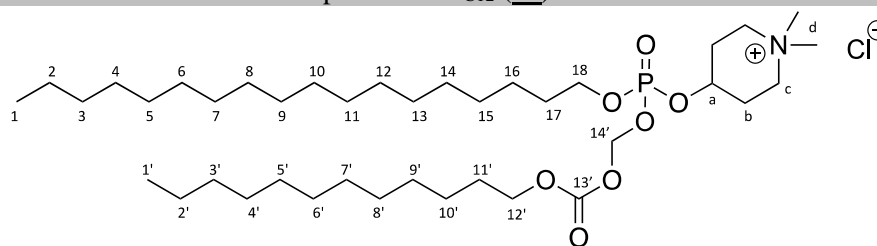
RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,5 ($2\text{C}_{1,1'}$); 23,4 ($2\text{C}_{2,2'}$); 25,3 ($\text{C}_{10'}$); 26,1 (C_{16}); 27,1 (2C_b); 29,8; 29,9; 30,0; 30,1 (2C); 30,2; 30,3 (5C); 30,4 (7C); 30,9 (C_{17}); 32,6 ($2\text{C}_{3,3'}$); 34,6 ($\text{C}_{11'}$); 54,7 (2C_d); 58,9 (2C_c); 69,9 (C_{18}); 70,0 (C_a); 83,5 ($\text{C}_{13'}$); 173,1 ($\text{C}_{12'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 4,2.

IR ν_{max} : 531; 666; 720; 760; 802; 923; 966; 1020; 1148; 1264; 1468; 1644 ; 1764 ; 2849 ; 2916 ; 2955 ; 3378.

HR-MS (ESI+) m/z : 674,5477 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 674,5483 calculée pour ($\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{NO}_6\text{P}^+$).

Pro-pérfosine $\text{P}_{\text{C}_{12}}$ (**14**)



$\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{ClNO}_7\text{P}$ (740,48 g/mol)

Le produit $\text{P}_{\text{C}_{12}}$ **14** (53,3 mg ; 22 %) est obtenu par *O*-alkylation de la pérfosine **2** (152,0 mg ; 0,33 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et de dodécyle **31** (738 mg ; 2,65 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,57$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

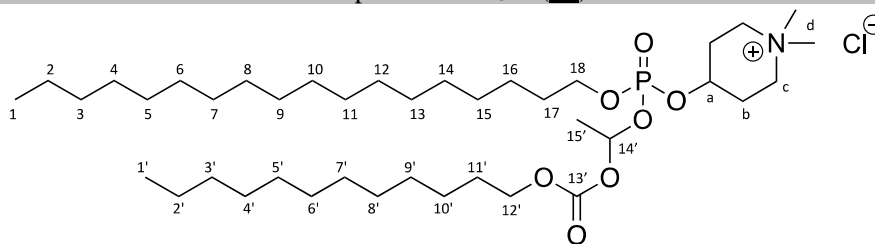
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$); 1,24 (m ; $48\text{H}_{2-16,2'-10'}$); 1,68 (m ; $4\text{H}_{17,11'}$); 2,10-2,34 (m ; 4H_b); 3,16 (s ; 3H_{d1}); 3,22 (s ; 3H_{d2}); 3,45-3,59 (m ; 4H_c); 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{18}); 4,19 (t ; $J = 6,8$ Hz ; $2\text{H}_{12'}$); 4,72 (m ; 1H_a); 5,65 (ABX ; $J_{AB} = 5,6$ Hz ; $J_{AX} = 11,6$ Hz ; $J_{BX} = 10,4$ Hz ; $2\text{H}_{14'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,4 ($2\text{C}_{1,1'}$); 23,3 ($2\text{C}_{2,2'}$); 26,1 ($\text{C}_{10'}$); 26,4 (C_{16}); 27,1 (2C_b); 29,2 ($\text{C}_{11'}$); 29,8 (2C); 29,9 (2C); 30,2 (4C); 30,4 (10C); 30,9 (C_{17}); 32,6 ($2\text{C}_{3,3'}$); 55,7 (2C_d); 58,8 (2C_c); 69,6 (C_{18}); 69,8 (C_a); 70,1 ($\text{C}_{12'}$); 86,5 ($\text{C}_{14'}$); 154,6 ($\text{C}_{13'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 4,0.

IR ν_{max} : 482; 529; 665; 720; 781; 850; 922; 944; 979; 1019; 1165; 1266; 1427; 1465; 1761; 2848; 2916; 2956; 3492.

HR-MS (ESI+) m/z : 704,5588 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 704,5589 calculée pour ($\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{NO}_7\text{P}^+$).

Pro-pérfosine P_{C12} (**15**)

C₄₀H₈₁ClNO₇P (754,51 g/mol)

Le produit P_{C12} **15** (38,4 mg ; 16 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de la pérfosine **2** (149,2 mg ; 0,32 mmol) avec le carbonate de chloro-1-éthyle et de dodécyle **32** (762 mg ; 2,60 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères n°1 :

$R_f = 0,57$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 48H_{2-16,2'-10'}) ; 1,60 (d ; $J = 5,3$ Hz ; 3H_{15'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{11'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,4$ Hz ; 2H₁₇) ; 2,10-2,34 (m ; 4H_b) ; 3,15 (s ; 3H_{d1}) ; 3,22 (s ; 3H_{d2}) ; 3,41-3,65 (m ; 4H_c) ; 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₁₈) ; 4,19 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{12'}) ; 4,72 (m ; 1H_a) ; 6,33 (m ; 1H_{14'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,6 (2C_{1,1'}) ; 21,9 (C_{15'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 25,9 (C_{10'}) ; 26,2 (C₁₆) ; 27,1 (2C_b) ; 29,1 (C_{11'}) ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 (2C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (4C) ; 30,4 (6C) ; 30,9 (C₁₇) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 55,7 (2C_d) ; 58,3 (2C_c) ; 68,9 (C₁₈) ; 69,3 (C_a) ; 69,6 (C_{12'}) ; 95,1 (C_{14'}) ; 153,8 (C_{13'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 6,1.

Diastéréoisomères n°2 :

$R_f = 0,48$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 48H_{2-16,2'-10'}) ; 1,58 (d ; $J = 5,3$ Hz ; 3H_{15'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{11'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,4$ Hz ; 2H₁₇) ; 2,10-2,34 (m ; 4H_b) ; 3,17 (s ; 3H_{d1}) ; 3,24 (s ; 3H_{d2}) ; 3,41-3,65 (m ; 4H_c) ; 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₁₈) ; 4,19 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{12'}) ; 4,72 (m ; 1H_a) ; 6,35 (m ; 1H_{14'}).

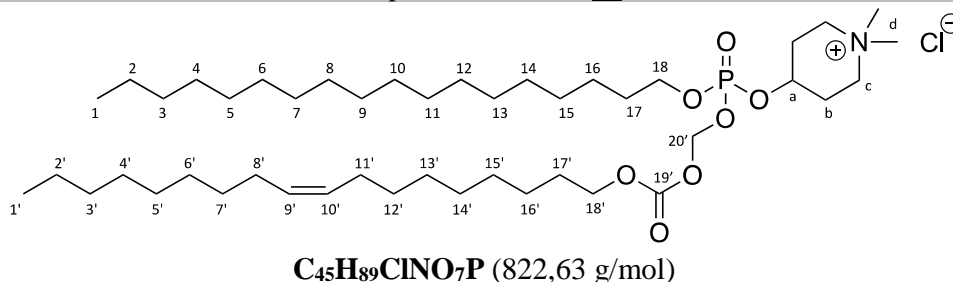
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,6 (2C_{1,1'}) ; 22,0 (C_{15'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 25,9 (C_{10'}) ; 26,2 (C₁₆) ; 27,1 (2C_b) ; 29,1 (C_{11'}) ; 29,8 (2C) ; 29,9 (2C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (5C) ; 30,4 (5C) ; 30,9 (C₁₇) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 55,7 (2C_d) ; 58,3 (2C_c) ; 68,9 (C₁₈) ; 69,3 (C_a) ; 69,6 (C_{12'}) ; 95,2 (C_{14'}) ; 153,8 (C_{13'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,9.

Diastéréoisomères 1 et 2 :

IR ν_{max} : 534 ; 720 ; 772 ; 924 ; 971 ; 1023 ; 1152 ; 1270 ; 1396 ; 1467 ; 2849 ; 2916 ; 2955 ; 3388.

HR-MS (ESI+) m/z : 718,5744 [M-Cl]⁺ trouvée ; 718,5745 calculée pour (C₄₀H₈₁NO₇P⁺).

Pro-pérfosine P_{C18:1} (**16**)

Le produit P_{C18:1} **16** (40 mg ; 15 %) est obtenu par *O*-alkylation de la pérfosine **2** (148 mg ; 0,32 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et d'oléyle **33** (930 mg ; 2,58 mmol) selon la procédure **PG1**.

R_f = 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

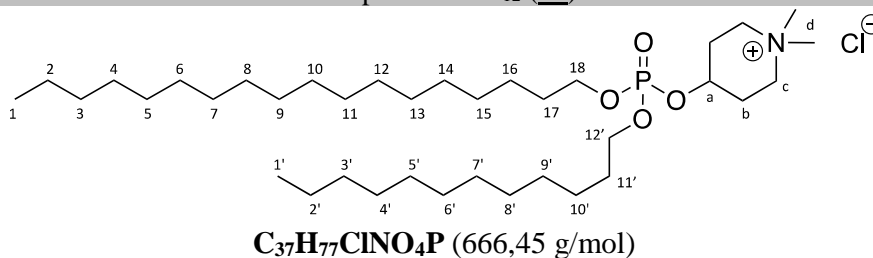
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; *J* = 6,8 Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 52H_{2-16,2'-7',12'-16'}) ; 1,68 (m ; 4H_{17,17'}) ; 2,00 (m ; 4H_{8',11'}) ; 2,10-2,34 (m ; 4H_b) ; 3,10 (s ; 3H_{d1}) ; 3,19 (s ; 3H_{d2}) ; 3,45-3,59 (m ; 4H_c) ; 4,10 (td ; *J*₁ = *J*₂ = 6,8 Hz ; 2H₁₈) ; 4,19 (t ; *J* = 6,8 Hz ; 2H_{18'}) ; 4,72 (m ; 1H_a) ; 5,31 (m ; 2H_{9',10'}) ; 5,65 (m ; 2H_{20'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 26,4 (C_{16'}) ; 26,5 (C₁₆) ; 27,0 (2C_b) ; 27,8 (2C_{8',11'}) ; 29,2 (C_{17'}) ; 30,0 (2C) ; 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,4 (15C) ; 30,9 (C₁₇) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 54,7 (2C_d) ; 58,8 (2C_c) ; 70,0 (C₁₈) ; 70,1 (C_a) ; 70,2 (C_{18'}) ; 86,6 (C_{20'}) ; 130,4 (2C_{9',10'}) ; 155,2 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 4,1.

IR ν_{max} : 516 ; 720 ; 968 ; 1027 ; 1251 ; 1465 ; 1646 ; 1764 ; 2851 ; 2919 ; 3387.

HR-MS (ESI+) *m/z* : 786,6355 [M-Cl]⁺ trouvée ; 786,6371 calculée pour (C₄₅H₈₉NO₇P⁺).

Pro-pérfosine P₁₂ (**17**)

Le produit P₁₂ **17** (54,6 mg ; 48 %) est obtenu par *O*-alkylation de la pérfosine **2** (79 mg ; 0,17 mmol) avec le triflate de dodécyle **35** (141 mg ; 0,44 mmol) selon la procédure **PG1**, mais à température ambiante.

R_f = 0,68 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

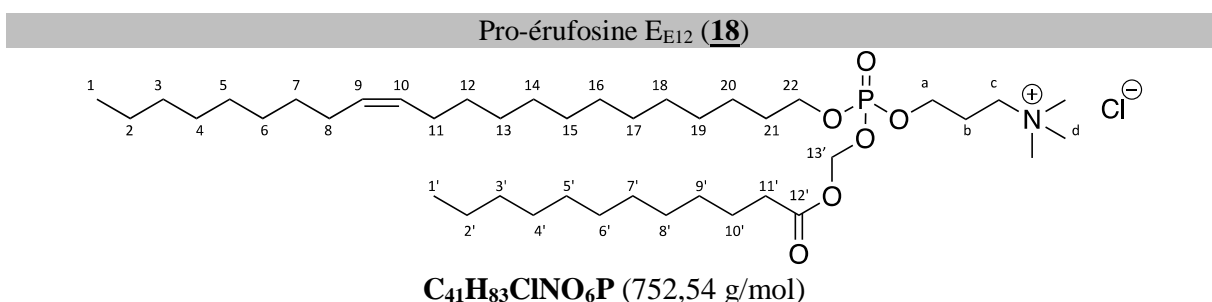
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,24 (m ; 48H_{2-16,2'-10'}); 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,0$ Hz ; 4H_{17,11'}); 2,10-2,32 (m ; 4H_b); 3,14 (s ; 3H_{d1}); 3,20 (s ; 3H_{d2}); 3,41-3,55 (m ; 4H_c); 4,06 (m ; 4H_{18,12'}); 4,70 (m ; 1H_a).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,4 (2C_{1,1'}); 23,3 (2C_{2,2'}); 26,1 (2C_{16,10'}); 27,1 (2C_b); 29,6 (2C); 29,8 (2C); 30,0 (2C); 30,1 (5C); 30,2 (6C); 30,3; 30,6 (2C_{17,11'}); 32,6 (2C_{3,3'}); 54,1 (2C_d); 58,9 (2C_c); 69,3 (C_a); 69,4 (2C_{18,12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 2,1.

IR ν_{\max} : 516; 573; 638; 721; 764; 923; 1029; 1161; 1245; 1467; 2851; 2920; 3252.

HR-MS (ESI+) m/z : 630,5581 [M-Cl]⁺ trouvée ; 630,5585 calculée pour (C₃₇H₇₇NO₄P⁺).



Le produit E_{E12} **18** (124,4 mg ; 41 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200,8 mg ; 0,40 mmol) avec le dodécanoate de chlorométhyle **27** (791 mg ; 3,17 mmol) selon la procédure **PG1**.

R_f = 0,45 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

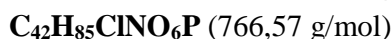
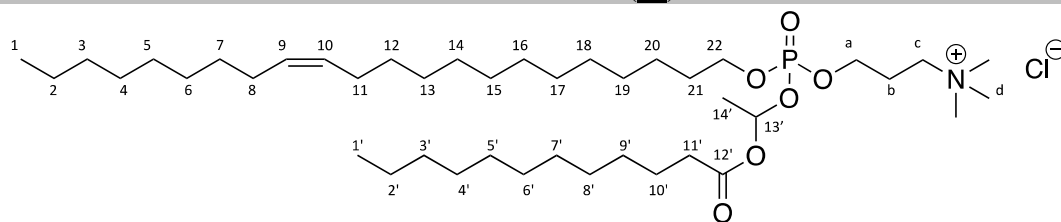
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,25 (m ; 46H_{2-7,12-20,2'-9'}); 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{10'}); 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz; 2H₂₁); 1,99 (m ; 4H_{8,11}); 2,19 (m ; 2H_b); 2,40 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{11'}); 3,16 (s ; 9H_d); 3,49 (m ; 2H_c); 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂); 4,17 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz , 2H_a); 5,31 (m ; 2H_{9,10}); 5,62 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,4$ Hz ; $J_{BX} = 11,4$ Hz ; 2H_{13'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}); 23,3 (2C_{2,2'}); 24,8 (C_b); 25,3 (C_{10'}); 26,1 (C₂₀); 27,8 (2C_{8,11}); 29,7; 29,8; 30,0 (5C); 30,2; 30,3 (6C); 30,4 (2C); 30,5 (2C); 30,9 (C₂₁); 32,6 (2C_{3,3'}); 34,6 (C_{11'}); 53,7 (3C_d); 64,3 (C_c); 65,5 (C_a); 69,9 (C₂₂); 83,5 (C_{13'}); 130,5 (C₉); 130,6 (C₁₀); 173,2 (C_{12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,4.

IR ν_{\max} : 491; 721; 757; 858; 968; 1029; 1116; 1157; 1261; 1466; 1760; 2850; 2919; 2956; 3389.

HR-MS (ESI+) : m/z 716,5954 [M-Cl]⁺ trouvée ; 716,5953 calculée pour (C₄₁H₈₃NO₆P⁺).

Pro-érufosine E_{E'12} (**19**)

Le produit E_{E'12} **19** (152,3 mg ; 50 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (201,4 mg ; 0,40 mmol) avec le dodécanoate de chloro-1-éthyle **28** (841 mg ; 3,20 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

$R_f = 0,44$ et $0,53$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

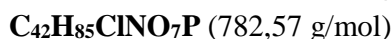
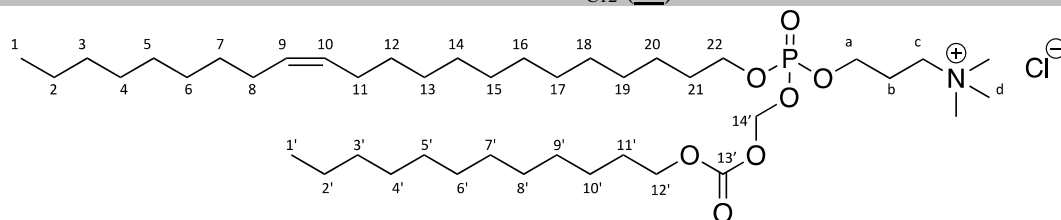
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 46H_{2-7,12-20,2'-9'}) ; 1,56 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{14'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{10'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 1,99 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,36 (t ; $J = 7,4$ Hz ; 2H_{11'}) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,52 (m ; 2H_c) ; 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,17 (m ; 2H_a) ; 5,30 (m ; 2H_{9,10}) ; 6,44 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 1H_{13'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,4 (2C_{1,1'}) ; 21,7 (C_{14'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,8 (C_b) ; 25,3 (C_{10'}) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,7 ; 29,8 ; 30,0 (5C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (5C) ; 30,4 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 34,7 (C_{11'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,2 (C_a) ; 69,6 (C₂₂) ; 92,0 (C_{13'}) ; 130,5 (2C_{9,10}) ; 173,7 (C_{12'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,2 et - 5,9.

IR ν_{max} : 515 ; 721 ; 850 ; 969 ; 1041 ; 1090 ; 1167 ; 1269 ; 1379 ; 1466 ; 1753 ; 2850 ; 2919 ; 3388.

HR-MS (ESI+) m/z : 730,6120 [M-Cl]⁺ trouvée ; 730,6109 calculée pour (C₄₂H₈₅NO₆P⁺).

Pro-érufosine E_{C12} (**20**)

Le produit E_{C12} **20** (97,4 mg ; 31 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200 mg ; 0,40 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et de dodécyle **31** (884 mg ; 3,17 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,45$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

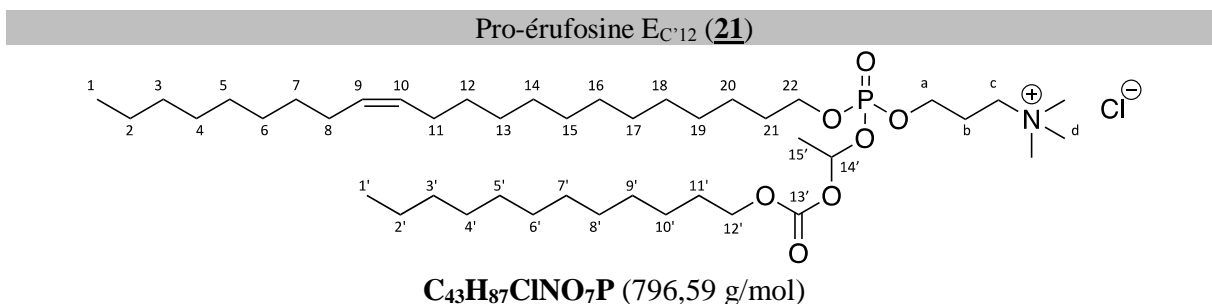
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,27 (m ; 48H_{2-7,12-20,2'-10'}); 1,68 (m ; 4H_{21,11'}); 2,00 (m ; 4H_{8,11}); 2,21 (m ; 2H_b); 3,17 (s ; 9H_d); 3,50 (m ; 2H_c); 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₂); 4,17 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H_{12'}); 4,25 (m ; 2H_a); 5,32 (m ; 2H_{9,10}); 5,65 (m ; 2H_{14'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,6 (2C_{1,1'}); 23,6 (2C_{2,2'}); 25,0 (C_b); 26,3 (C_{10'}); 26,6 (C₂₀); 28,0 (2C_{8,11}); 29,5 (C_{11'}); 30,1; 30,2 (2C); 30,3 (2C); 30,4; 30,5 (4C); 30,6 (6C); 30,7 (2C); 31,1 (C₂₁); 32,8 (2C_{3,3'}); 53,8 (3C_d); 64,5 (C_c); 65,5 (C_a); 70,2 (2C_{22,12'}); 86,8 (C_{14'}); 130,7 (C₉); 130,7 (C₁₀); 156,0 (C_{13'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,1.

IR ν_{\max} : 490; 721; 790; 860; 946; 1024; 1115; 1155; 1257; 1466; 1761; 2852; 2920; 3379.

HR-MS (ESI+) m/z : 746,6069 [M-Cl]⁺ trouvée ; 746,6058 calculée pour (C₄₂H₈₅NO₇P⁺).



Le produit E_{C¹²} **21** (128 mg ; 41 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (199 mg ; 0,39 mmol) avec le carbonate de chloro-1-éthyle et de dodécyle **32** (923 mg ; 3,15 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

$R_f = 0,44$ et $0,53$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

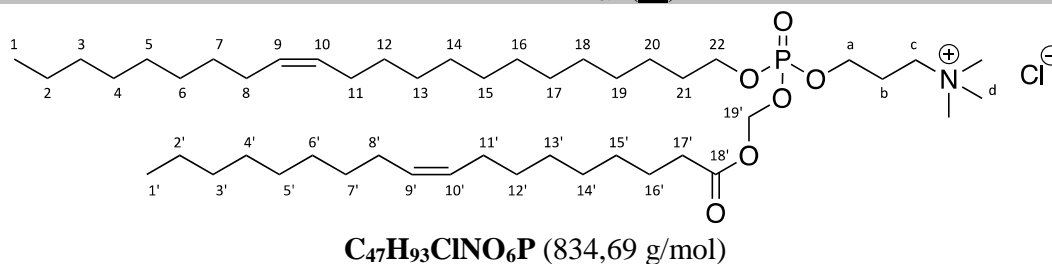
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}); 1,25 (m ; 48H_{2-7,12-20,2'-10'}); 1,59 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{15'}); 1,67 (m ; 4H_{21,11'}); 2,00 (m ; 4H_{8,11}); 2,19 (m ; 2H_b); 3,17 (s ; 9H_d); 3,50 (m ; 2H_c); 4,07 (m ; 2H₂₂); 4,16 (m ; 2H_{12'}); 4,20 (m ; 2H_a); 5,30 (m ; 2H_{9,10}); 6,34 (m ; 1H_{14'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,6 (2C_{1,1'}); 21,5 (C_{15'}); 23,6 (2C_{2,2'}); 25,0 (C_b); 26,3 (C_{10'}); 26,6 (C₂₀); 28,0 (2C_{8,11}); 29,5 (C_{11'}); 29,9 (3C); 30,0 (3C); 30,2 (2C); 30,3 (2C); 30,4 (6C); 30,5 (2C); 30,8 (C₂₁); 32,6 (2C_{3,3'}); 53,7 (3C_d); 64,3 (C_c); 65,3 (C_a); 69,8 (2C_{22,12'}); 95,5 (C_{14'}); 130,5 (2C_{9,10}); 156,8 (C_{13'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,2 et - 5,3.

IR ν_{\max} : 515; 720; 789; 889; 969; 1030; 1259; 1393; 1465; 1757; 2852; 2921; 3387.

HR-MS (ESI+) m/z : 760,6221 [M-Cl]⁺ trouvée ; 760,6215 calculée pour (C₄₃H₈₇NO₇P⁺).

Pro-érufosine E_{E18:1} (**22**)

Le produit E_{E18:1} **22** (115 mg ; 35 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (199,4 mg ; 0,40 mmol) avec l'oléate de chlorométhyle **29** (1,05 g ; 3,17 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,64$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

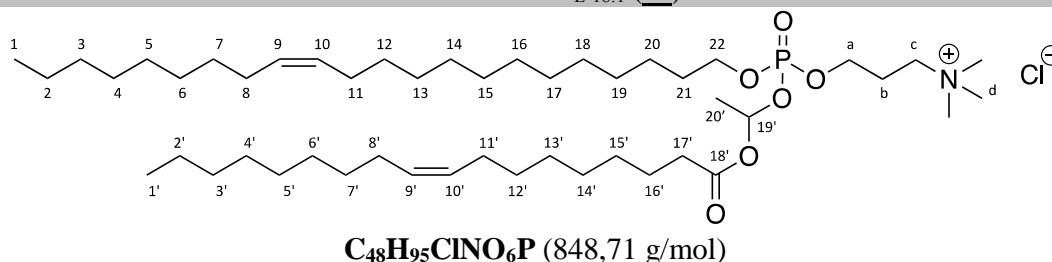
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 7,0$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 50H_{2-7,12-20,2'-7',12'-15'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{16'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,28 (m ; 2H_b) ; 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{17'}) ; 3,48 (s ; 9H_d) ; 3,81 (m ; 2H_c) ; 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,23 (m ; 2H_a) ; 5,34 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 5,62 (ABX ; $J_{AB} = 4,8$ Hz ; $J_{AX} = 12,7$ Hz ; $J_{BX} = 10,9$ Hz ; 2H_{19'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}) ; 22,9 (2C_{2,2'}) ; 24,5 (C_b) ; 24,7 (C_{16'}) ; 25,6 (C₂₀) ; 27,4 (4C_{8,8',11,11'}) ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 (7C) ; 29,7 (5C) ; 29,8 (3C) ; 29,9 (2C) ; 30,4 (C₂₁) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 34,2 (C_{17'}) ; 53,8 (3C_d) ; 63,7 (C_c) ; 64,7 (C_a) ; 69,1 (C₂₂) ; 82,8 (C_{19'}) ; 129,8 (C_{9'}) ; 130,0 (C₉) ; 130,1 (C₁₀) ; 130,3 (C_{10'}) ; 172,4 (C_{18'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 3,4.

IR ν_{max} : 495 ; 721 ; 796 ; 844 ; 970 ; 1055 ; 1146 ; 1241 ; 1465 ; 1647 ; 1750 ; 2852 ; 2921 ; 3387.

HR-MS (ESI+) m/z : 798,6739 [M-Cl]⁺ trouvée ; 798,6735 calculée pour (C₄₇H₉₃NO₆P⁺).

Pro-érufosine E_{E'18:1} (**23**)

Le produit E_{E'18:1} **23** (158 mg ; 47 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200 mg ; 0,40 mmol) avec l'oléate de chloro-1-éthyle **30** (995 mg ; 2,88 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères n°1 :

$R_f = 0,71$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 7,0$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 50H_{2-7,12-20,2'-7',12'-15'}) ; 1,55 (d ; $J = 5,3$ Hz ; 3H_{20'}) ; 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{16'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,18 (m ; 2H_b) ; 2,36 (t ; $J = 7,4$ Hz ; 2H_{17'}) ; 3,18 (s ; 9H_d) ; 3,52 (m ; 2H_c) ; 4,04 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,16 (m ; 2H_a) ; 5,31 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 6,44 (dq ; $J_1 = J_2 = 5,3$ Hz ; 1H_{19'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 21,7 (C_{20'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,8 (C_b) ; 25,3 (C_{16'}) ; 26,0 (C₂₀) ; 27,8 (4C_{8,8',11,11'}) ; 29,7 ; 29,8 (3C) ; 30,0 (3C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (5C) ; 30,4 (4C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 34,7 (C_{17'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,2 (C_a) ; 69,6 (C₂₂) ; 92,0 (C_{19'}) ; 130,3 (C_{9'}) ; 130,5 (C₁₀) ; 130,6 (C₁₀) ; 130,7 (C_{10'}) ; 173,0 (C_{18'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,2.

Diastéréoisomères n°2 :

$R_f = 0,66$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 7,0$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 50H_{2-7,12-20,2'-7',12'-15'}) ; 1,53 (d ; $J = 5,3$ Hz ; 3H_{20'}) ; 1,61 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{16'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,18 (m ; 2H_b) ; 2,36 (t ; $J = 7,4$ Hz ; 2H_{17'}) ; 3,18 (s ; 9H_d) ; 3,52 (m ; 2H_c) ; 4,08 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,16 (m ; 2H_a) ; 5,31 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 6,47 (dq ; $J_1 = J_2 = 5,3$ Hz ; 1H_{19'}).

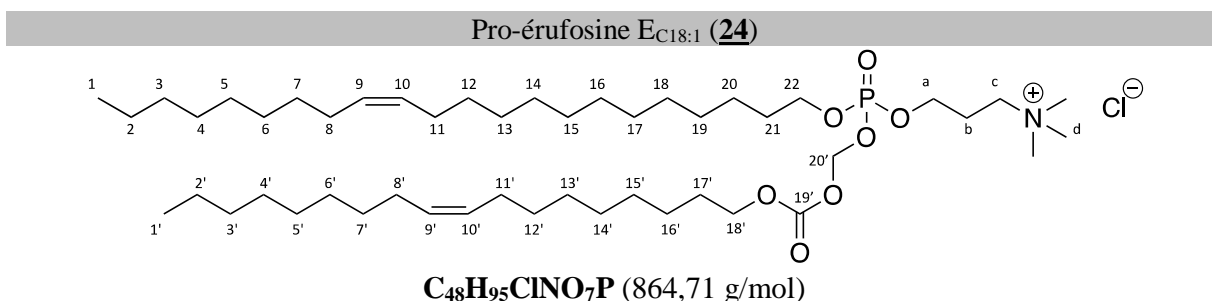
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 21,7 (C_{20'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,8 (C_b) ; 25,1 (C_{16'}) ; 26,0 (C₂₀) ; 27,8 (4C_{8,8',11,11'}) ; 29,7 ; 29,8 (3C) ; 30,0 (3C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (5C) ; 30,4 (4C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 34,5 (C_{17'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,2 (C_a) ; 69,6 (C₂₂) ; 92,0 (C_{19'}) ; 130,3 (C_{9'}) ; 130,5 (C₁₀) ; 130,6 (C₁₀) ; 130,7 (C_{10'}) ; 172,8 (C_{18'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 5,7.

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

IR ν_{max} : 516 ; 721 ; 849 ; 968 ; 1030 ; 1082 ; 1160 ; 1270 ; 1465 ; 1754 ; 2852 ; 2921 ; 3377.

HR-MS (ESI⁺) m/z : 812,6883 [M-Cl]⁺ trouvée ; 812,6892 calculée pour (C₄₈H₉₅NO₆P⁺).



Le produit E_{C18:1} **24** (200 mg ; 58 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200,4 mg ; 0,40 mmol) avec le carbonate d'oléyle et de chlorométhyle **33** (1,16 g ; 3,18 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,66$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

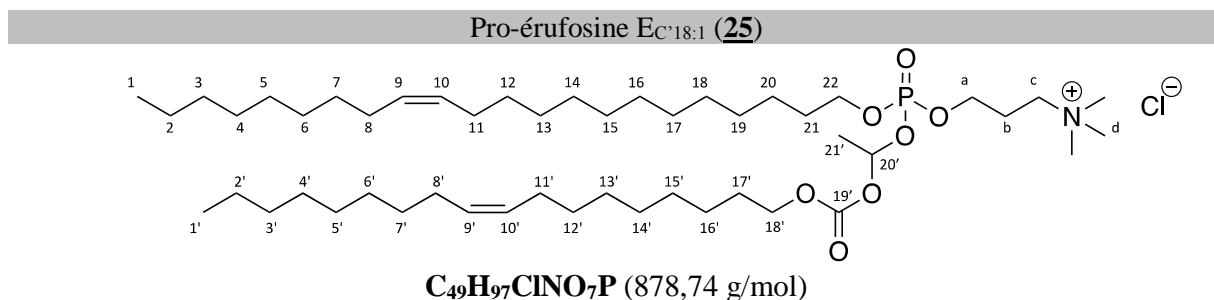
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,27 (m ; 52H_{2-7,12-20,2'-7',12'-16'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{21,17'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,28 (m ; 2H_b) ; 3,48 (s ; 9H_d) ; 3,77 (m ; 2H_c) ; 4,06 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,17 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{18'}) ; 4,22 (m ; 2H_a) ; 5,30 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 5,63 (m ; 2H_{20'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}) ; 22,9 (2C_{2,2'}) ; 24,6 (C_b) ; 25,4 (C_{16'}) ; 25,6 (C₂₀) ; 27,4 (4C_{8,11}) ; 28,7 (C_{17'}) ; 29,4 (3C) ; 29,5 (4C) ; 29,6 ; 29,8 (4C) ; 29,9 (4C) ; 30,0 (4C) ; 30,3 (C₂₁) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 53,7 (3C_d) ; 63,7 (C_c) ; 64,7 (C_a) ; 69,2 (C₂₂) ; 69,5 (C_{18'}) ; 85,8 (C_{20'}) ; 129,7 (C_{9'}) ; 129,8 (C₉) ; 129,9 (C₁₀) ; 130,0 (C_{10'}) ; 153,1 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 3,0.

IR ν_{\max} : 502 ; 721 ; 772 ; 858 ; 947 ; 1027 ; 1155 ; 1256 ; 1464 ; 1761 ; 2852 ; 2921 ; 3390.

HR-MS (ESI+) m/z : 828,6837 [M-Cl]⁺ trouvée ; 828,6841 calculée pour (C₄₈H₉₅NO₇P⁺).



Le produit EC^{18:1} **25** (169,8 mg ; 49 %) est obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (199,0 mg ; 0,40 mmol) avec le carbonate d'oléyle et de chloro-1-éthyle **34** (1,18 g ; 3,14 mmol) selon la procédure **PG1**.

Diastéréoisomères n°1 :

$R_f = 0,70$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 52H_{2-7,12-20,2'-7',12'-16'}) ; 1,58 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{21'}) ; 1,67 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{21,17'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,28 (m ; 2H_b) ; 3,49 (s ; 9H_d) ; 3,81 (m ; 2H_c) ; 4,02-4,23 (m ; 4H_{22,18'} et 2H_a) ; 5,33 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 6,34 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 1H_{20'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}) ; 21,6 (C_{21'}) ; 22,8 (2C_{2,2'}) ; 24,5 (C_b) ; 25,5 (C_{16'}) ; 25,8 (C₂₀) ; 27,4 (4C_{8,8',11,11'}) ; 28,7 (C_{17'}) ; 29,3 ; 29,4 (2C) ; 29,5 (6C) ; 29,6 (3C) ; 29,7 (2C) ; 29,8 (3C) ; 29,9 (3C) ; 30,1 (C₂₁) ; 31,9 (2C_{3,3'}) ; 53,7 (3C_d) ; 63,7 (C_c) ; 64,3 (C_a) ; 68,9 (C₂₂) ; 69,2 (C_{18'}) ; 94,7 (C_{20'}) ; 129,9 (C_{9'}) ; 130,0 (C₉) ; 130,1 (C₁₀) ; 130,2 (C_{10'}) ; 153,5 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 5,0.

HR-MS (ESI+) m/z : 842,7005 [M-Cl]⁺ trouvée ; 842,6997 calculée pour (C₄₉H₉₇NO₇P⁺).

Diastéréoisomères n°2 :

$R_f = 0,62$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 52H_{2-7,12-20,2'-7'-12'-16'}) ; 1,56 (d ; $J = 5,2$ Hz ; 3H_{21'}) ; 1,67 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{21,17'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,28 (m ; 2H_b) ; 3,49 (s ; 9H_d) ; 3,81 (m ; 2H_c) ; 4,02-4,23 (m ; 4H_{22,18'} et 2H_a) ; 5,33 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 6,41 (qd ; $J_1 = J_2 = 5,2$ Hz ; 1H_{20'}).

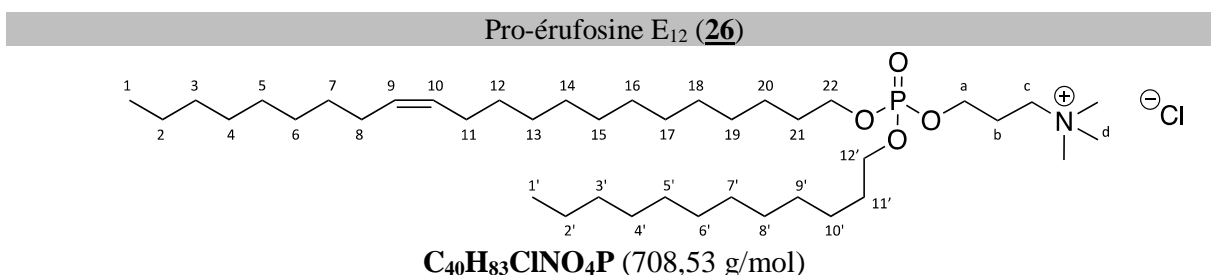
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (2C_{1,1'}) ; 21,6 (C_{21'}) ; 22,8 (2C_{2,2'}) ; 24,5 (C_b) ; 25,5 (C_{16'}) ; 25,8 (C₂₀) ; 27,4 (4C_{8,8',11,11'}) ; 28,8 (C_{17'}) ; 29,4 (3C) ; 29,5 (6C) ; 29,6 (3C) ; 29,7 (5C) ; 29,9 (3C) ; 30,1 (C₂₁) ; 31,9 (2C_{3,3'}) ; 53,7 (3C_d) ; 63,7 (C_c) ; 64,3 (C_a) ; 69,1 (2C_{22,18'}) ; 94,6 (C_{20'}) ; 129,9 (C_{9'}) ; 130,0 (C₉) ; 130,1 (C₁₀) ; 130,2 (C_{10'}) ; 153,3 (C_{19'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 5,7.

HR-MS (ESI+) m/z : 842,7001 [M-Cl]⁺ trouvée ; 842,6997 calculée pour (C₄₉H₉₇NO₇P⁺).

Diastéréoisomères 1 et 2 en mélange :

IR ν_{\max} : 512 ; 721 ; 787 ; 887 ; 969 ; 1032 ; 1259 ; 1392 ; 1465 ; 1757 ; 2852 ; 2921 ; 3379.



Le produit E₁₂ **26** (138,5 mg ; 97 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (102 mg ; 0,16 mmol) avec le triflate de dodécyle **35** (170 mg ; 0,53 mmol) selon la procédure **PG1**, mais à température ambiante.

$R_f = 0,70$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

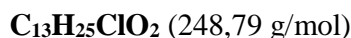
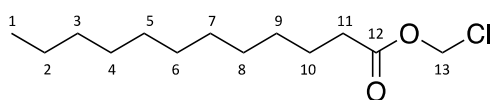
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 48H_{2-7,12-20,2'-10'}) ; 1,66 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{21,11'}) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 3,22 (s ; 9H_d) ; 3,54 (m ; 2H_c) ; 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{22,12'}) ; 4,12 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz , 2H_a) ; 5,33 (m ; 2H_{9,10}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,4 (2C_{1,1'}) ; 22,8 (2C_{2,2'}) ; 24,5 (C_b) ; 25,6 (2C_{20,10'}) ; 27,4 (2C_{8,11}) ; 29,3 (2C) ; 29,5 (4C) ; 29,8 (5C) ; 29,9 (5C) ; 30,0 (2C) ; 30,4 (2C_{21,11'}) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 53,6 (3C_d) ; 63,8 (C_c) ; 64,1 (C_a) ; 68,5 (2C_{22,12'}) ; 130,0 (C₉) ; 130,1 (C₁₀).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 1,4.

IR ν_{\max} : 516 ; 572 ; 638 ; 772 ; 866 ; 1030 ; 1158 ; 1225 ; 1257 ; 1465 ; 2852 ; 2921 ; 3500.

HR-MS (ESI+) m/z : 672,6039 [M-Cl]⁺ trouvée ; 672,6054 calculée pour (C₄₀H₈₃NO₄P⁺).

Dodécanoate de chlorométhyle : E12-Cl (**27**)

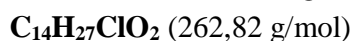
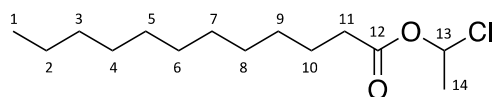
Du chlorure de dodécanoyle (3,5 mL ; 14,7 mmol) est additionné goutte à goutte, en 10 minutes, à un mélange de chlorure de zinc (45 mg ; 0,29 mmol) et de formaldéhyde (663 mg ; 22,1 mmol), à 0 °C et sous argon. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à 0 °C, puis 18 heures à température ambiante. Le brut réactionnel est directement purifié par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 100:0 à 98:2), pour donner le produit **27** (2,61 g ; 71 %) sous la forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,60$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 16H₂₋₉) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H₁₀) ; 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₁) ; 5,70 (s ; 2H₁₃).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₀) ; 29,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 (2C) ; 32,1 (C₃) ; 34,2 (C₁₁) ; 68,7 (C₁₃) ; 171,8 (C₁₂).

IR ν_{max} : 462 ; 718 ; 771 ; 1034 ; 1106 ; 1135 ; 1338 ; 1441 ; 1465 ; 1765 ; 2853 ; 2922.

Dodécanoate de chloro-1-éthyle : E'12-Cl (**28**)

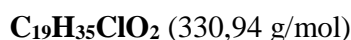
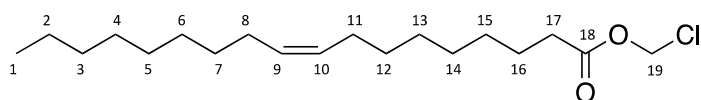
Le produit **28** (1,63 g ; 42 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure de dodécanoyle (3,5 mL ; 14,7 mmol), de chlorure de zinc (45 mg ; 0,29 mmol) et d'acétaldéhyde (1,24 mL ; 22,0 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**. Le milieu réactionnel a tendance à se solidifier à 0 °C lors de l'addition du chlorure d'acide.

$R_f = 0,61$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 16H₂₋₉) ; 1,64 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,3$ Hz ; 2H₁₀) ; 1,78 (d ; $J = 5,8$ Hz ; 3H₁₄) ; 2,34 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₁) ; 6,55 (q ; $J = 5,8$ Hz ; 1H₁₃).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,9 (C₂) ; 24,8 (C₁₀) ; 25,4 (C₁₄) ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,1 (C₃) ; 34,4 (C₁₁) ; 80,8 (C₁₃) ; 171,8 (C₁₂).

IR ν_{max} : 664 ; 721 ; 771 ; 934 ; 1019 ; 1084 ; 1110 ; 1142 ; 1219 ; 1272 ; 1378 ; 1465 ; 1760 ; 2853 ; 2923.

Oléate de chlorométhyle : E18:1 (**29**)

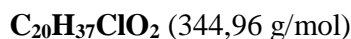
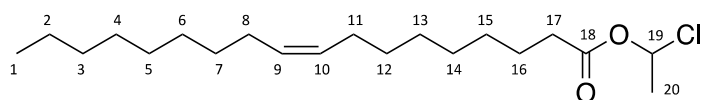
Le produit **29** (2,90 g ; 58 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'oléoyle (5 mL ; 15,1 mmol), de chlorure de zinc (209 mg ; 0,15 mmol) et de formaldéhyde (2,25 g ; 74,9 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

$R_f = 0,51$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,29 (m ; 20H_{2-7,12-15}) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,1$ Hz ; 2H₁₆) ; 2,01 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₇) ; 5,34 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,70 (s ; 2H₁₉).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₆) ; 27,3 (2C_{8,11}) ; 29,1 ; 29,2 (2C) ; 29,5 (2C) ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 32,1 (C₃) ; 34,1 (C₁₇) ; 68,7 (C₁₉) ; 129,9 (C₁₀) ; 130,2 (C₉) ; 171,9 (C₁₈).

IR ν_{max} : 462 ; 719 ; 771 ; 1036 ; 1093 ; 1114 ; 1219 ; 1260 ; 1338 ; 1440 ; 1463 ; 1766 ; 2853 ; 2922 ; 3003.

Oléate de chloro-1-éthyle : E'18:1-Cl (**30**)

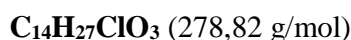
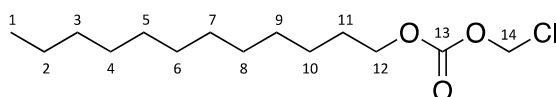
Le produit **30** (1,41 g ; 27 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'oléoyle (5 mL ; 15,1 mmol), de chlorure de zinc (200 mg ; 0,15 mmol) et d'acétaldéhyde (1,27 mL ; 22,7 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

$R_f = 0,51$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,28 (m ; 20H_{2-7,12-15}) ; 1,64 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,1$ Hz ; 2H₁₆) ; 1,78 (d ; $J = 5,8$ Hz ; 3H₂₀) ; 2,01 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,34 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₇) ; 5,34 (m ; 2H_{9,10}) ; 6,55 (q ; $J = 5,8$ Hz ; 1H₁₉).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₆) ; 25,4 (C₂₀) ; 27,4 (2C_{8,11}) ; 29,1 ; 29,2 (2C) ; 29,5 (2C) ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 32,1 (C₃) ; 34,3 (C₁₇) ; 80,7 (C₁₉) ; 129,9 (C₁₀) ; 130,2 (C₉) ; 171,6 (C₁₈).

IR ν_{max} : 666 ; 721 ; 772 ; 934 ; 1019 ; 1083 ; 1137 ; 1220 ; 1272 ; 1378 ; 1463 ; 1761 ; 2853 ; 2922 ; 3004.

Carbonate de chlorométhyle et de dodécyle : C12-Cl (**31**)

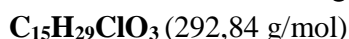
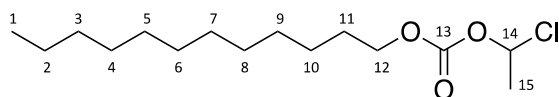
Du chloroformate de chlorométhyle (2,21 mL ; 25,1 mmol) en solution dans l'Et₂O anhydre (10 mL) est additionné goutte à goutte, en 15 minutes, à une solution de dodécanol (3,02 g ; 16,2 mmol) et de Et₃N (4,5 mL ; 32,4 mmol) dans l'Et₂O (35 mL), à 0 °C et sous argon. Le milieu réactionnel est réchauffé à température ambiante et agité 2 heures jusqu'à conversion complète (CCM : EP/Et₂O 95:5). Le milieu est filtré sur coton et lavé par Et₂O et concentré sous vide. Le produit attendu **31** (2,60 g ; 58 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 100:0 à 95:5).

$R_f = 0,48$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 18H₂₋₁₀) ; 1,70 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₁₁) ; 4,22 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 2H₁₂) ; 5,73 (s ; 2H₁₄).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,9 (C₂) ; 25,8 (C₁₀) ; 28,7 (C₁₁) ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 (2C) ; 32,1 ; 69,6 (C₁₂) ; 72,3 (C₁₄) ; 153,6 (C₁₃).

IR ν_{max} : 718 ; 787 ; 961 ; 1113 ; 1239 ; 1343 ; 1443 ; 1765 ; 2853 ; 2922.

Carbonate de chloro-1-éthyle et de dodécyle : C'12-Cl (**32**)

Du chloroformate de chloro-1-éthyle (2,5 mL ; 23,2 mmol) en solution dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est additionné goutte à goutte, en 15 minutes, à une solution de dodécanol (3,00 g ; 16,1 mmol) et de pyridine (1,93 mL ; 23,2 mmol) dans le CH₂Cl₂ (40 mL), à 0 °C et sous argon. Le milieu est réchauffé à température ambiante et agité jusqu'à conversion complète (CCM : EP/Et₂O 95:5). Le milieu est dilué dans CH₂Cl₂ (30 mL), lavé par une solution de HCl 1 % (2 x 50 mL), par une solution saturée de NaCl, séché sur MgSO₄, filtré et concentré sous vide. Le produit attendu **32** (4,60 g ; 97 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 100:0 à 95:5).

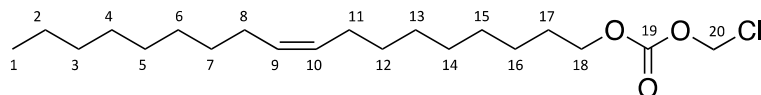
$R_f = 0,63$ (EP/Et₂O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 18H₂₋₁₀) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₁₁) ; 1,83 (d ; $J = 5,8$ Hz ; 3H₁₅) ; 4,20 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 2H₁₂) ; 6,43 (q ; $J = 5,8$ Hz ; 1H₁₄).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,3 (C_1); 22,9 (C_2); 25,4 (C_{15}); 25,8 (C_{10}); 28,7 (C_{11}); 29,3; 29,5; 29,6; 29,7; 29,8 (2C); 32,1; 69,3 (C_{12}); 84,7 (C_{14}); 153,1 (C_{13}).

IR ν_{max} : 662; 785; 892; 1008; 1067; 1111; 1243; 1348; 1385; 1466; 1762; 2853; 2923.

Carbonate de chlorométhyle et d'oléyle : $\text{C}_{18}:1\text{-Cl}$ (**33**)



$\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{ClO}_3$ (360,96 g/mol)

Le produit **33** (4,62 g ; 80 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir d'alcool oléique (4,30 g ; 16,0 mmol), de chloroformate de chlorométhyle (2,20 mL ; 24,7 mmol) et de Et_3N (4,46 mL ; 32,0 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **31**.

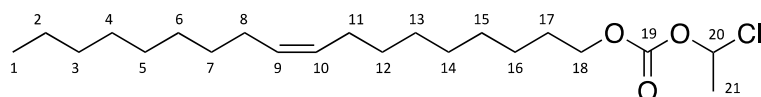
$R_f = 0,60$ (EP/ Et_2O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H_1); 1,28 (m ; $22\text{H}_{2-7,12-16}$); 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,0$ Hz ; 2H_{17}); 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$); 4,22 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{18}); 5,34 (m ; $2\text{H}_{9,10}$); 5,72 (s ; 2H_{20}).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,3 (C_1); 22,8 (C_2); 25,7 (C_{16}); 27,4 ($2\text{C}_{8,11}$); 28,6 (C_{17}); 29,3 (2C); 29,5 (2C); 29,7 (2C); 29,8; 29,9; 31,9 (C_3); 69,5 (C_{18}); 72,3 (C_{20}); 129,9 (C_9); 130,2 (C_{10}); 153,6 (C_{19}).

IR ν_{max} : 719; 759; 787; 965; 1114; 1243; 1343; 1443; 1766; 2853; 2922; 3004.

Carbonate de chloro-1-éthyle et d'oléyle : $\text{C}^18:1\text{-Cl}$ (**34**)



$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{ClO}_3$ (374,99 g/mol)

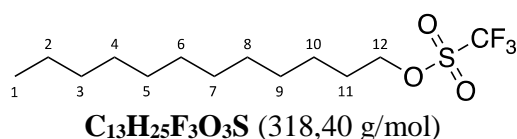
Le produit **34** (5,08 g ; 85 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir d'alcool oléique (4,30 g ; 16,0 mmol), de chloroformate de chloro-1-éthyle (2,60 mL ; 24,0 mmol) et de pyridine (2,60 mL ; 32,0 mmol) selon la procédure décrite pour la préparation du composé **32**.

$R_f = 0,63$ (EP/ Et_2O 95:5) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H_1); 1,29 (m ; $22\text{H}_{2-7,12-16}$); 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,0$ Hz ; 2H_{17}); 1,83 (d ; $J = 5,8$ Hz ; 3H_{21}); 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$); 4,20 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{18}); 5,34 (m ; $2\text{H}_{9,10}$); 6,43 (q ; $J = 5,8$ Hz ; 1H_{20}).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,3 (C_1); 22,8 (C_2); 25,4 (C_{21}); 25,8 (C_{16}); 27,4 ($2\text{C}_{8,11}$); 28,7 (C_{17}); 29,3 (2C); 29,5 (2C); 29,7; 29,9 (3C); 31,9 (C_3); 69,3 (C_{18}); 84,6 (C_{20}); 129,9 (C_9); 130,2 (C_{10}); 153,1 (C_{19}).

IR ν_{max} : 663; 722; 758; 894; 1008; 1111; 1245; 1348; 1384; 1464; 1763; 2853; 2922; 3004.

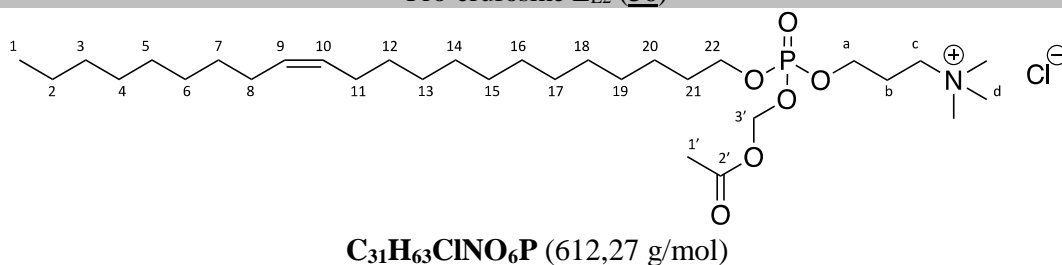
Triflate de dodécyle : 12-Cl (**35**)

De la pyridine (280 μ l ; 3,49 mmol) est ajoutée, à 0 °C et sous argon, à de l'anhydride trifluorométhanesulfonique (590 μ l ; 3,49 mmol) en solution dans le CH₂Cl₂ anhydre (5 mL), formant des fumées blanches et un précipité rose. Le précédent mélange est réchauffé à température ambiante et une solution de dodécanol (500 mg ; 2,68 mmol) dans CH₂Cl₂ (10 mL) est additionnée goutte à goutte en 15 minutes. Le milieu réactionnel est agité 2 heures à température ambiante (CCM : EP/Et₂O 1:1), puis il est décomposé par addition de H₂O (1 mL), dilué dans CH₂Cl₂ (5 mL) et lavé par H₂O (2 x 5 mL). Les phases sont séparées, la phase aqueuse résultante est ré-extraite avec CH₂Cl₂ (10 mL) et la phase organique résultante est lavée par une solution saturée de NaCl (10 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le brut réactionnel, sous la forme d'une huile marron avec une suspension, est filtré sur gel de silice (20 mL de SiO₂ = 3 cm de hauteur, EP/Et₂O 10:0 à 8:2). Le produit attendu **35** (586 mg ; 69 %), obtenu sous la forme d'une huile incolore, est engagé rapidement dans les étapes suivantes en raison de son instabilité.³⁵⁴

$R_f = 0,7$ (EP/Et₂O 100:0) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 16H₂₋₉) ; 1,42 (m ; 2H₁₀) ; 1,83 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,1$ Hz ; 2H₁₁) ; 4,53 (t ; $J = 6,5$ Hz ; 2H₁₂).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,9 (C₂) ; 25,2 (C₁₀) ; 29,0 ; 29,4 (2C) ; 29,5 ; 29,6 ; 29,8 (2C) ; 32,1 (C₃) ; 77,9 (C₁₂).

Pro-érufosine E_{E2} (**36**)

Le produit E_{E2} **36** (8,7 mg ; 6 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (120 mg ; 0,24 mmol) avec l'acétate de chlorométhyle **43** (215 mg ; 1,91 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,15$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

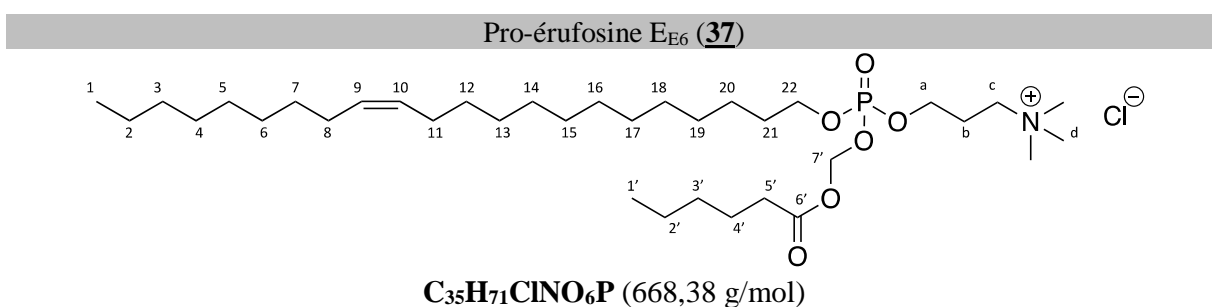
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,85 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H_1) ; 1,25 (m ; $30\text{H}_{2-7,12-20}$) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,14 (s ; 3H_1) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 4,18 (m ; 2H_a) ; 5,31 (m ; $2\text{H}_{9,10}$) ; 5,60 (ABX ; $J_{AB} = 5,6$ Hz ; $J_{AX} = 13,4$ Hz ; $J_{BX} = 12,2$ Hz ; $2\text{H}_{3'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,5 (C_1) ; 20,9 ($\text{C}_{1'}$) ; 23,2 (C_2) ; 24,8 (C_b) ; 26,0 (C_{20}) ; 27,8 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 29,9 ; 30,0 (2C) ; 30,2 (3C) ; 30,3 (4C) ; 30,4 (2C) ; 30,9 (C_{21}) ; 32,6 (C_3) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,5 (C_a) ; 69,8 (C_{22}) ; 83,4 ($\text{C}_{3'}$) ; 130,5 ($2\text{C}_{9,10}$) ; 171,8 ($\text{C}_{2'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 3,4.

IR ν_{max} : 671 ; 975 ; 1033 ; 1120 ; 1463 ; 1767 ; 2852 ; 2922 ; 3366.

HR-MS (ESI+) m/z : 576,4390 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ trouvée ; 576,4388 calculée pour ($\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{NO}_6\text{P}^+$).



Le produit E_{E6} **37** (47 mg ; 30 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (120 mg ; 0,24 mmol) avec l'hexanoate de chlorométhyle **44** (315 mg ; 1,89 mmol) selon la procédure **PG1**.

R_f = 0,30 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

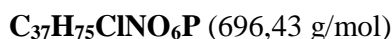
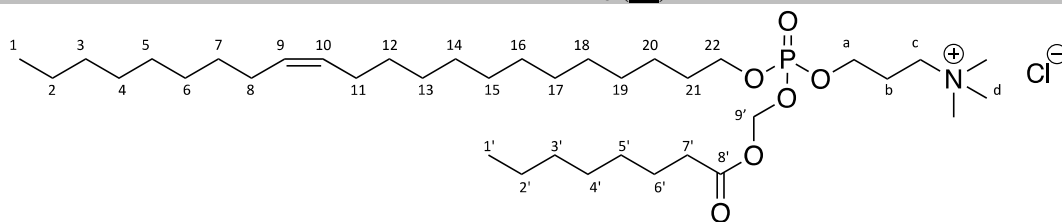
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,85 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H_1) ; 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; $3\text{H}_{1'}$) ; 1,25 (m ; $34\text{H}_{2-7,12-20,2',3'}$) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; $2\text{H}_{4'}$) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,41 (t ; $J = 7,5$ Hz ; $2\text{H}_{5'}$) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 4,20 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_a) ; 5,3 (m ; $2\text{H}_{9,10}$) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,5$ Hz ; $J_{BX} = 11,7$ Hz ; $2\text{H}_{7'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,2 ($\text{C}_{1'}$) ; 14,4 (C_1) ; 22,8 ($\text{C}_{2'}$) ; 23,2 (C_2) ; 24,6 (C_b) ; 24,7 ($\text{C}_{4'}$) ; 25,9 (C_{20}) ; 27,7 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 29,7 ; 29,8 (3C) ; 30,0 (3C) ; 30,1 ; 30,2 (2C) ; 30,3 (2C) ; 30,8 (C_{21}) ; 31,7 ($\text{C}_{3'}$) ; 32,4 (C_3) ; 34,3 ($\text{C}_{5'}$) ; 53,7 (3C_d) ; 64,1 (C_c) ; 65,2 (C_a) ; 69,7 (C_{22}) ; 83,2 ($\text{C}_{7'}$) ; 130,4 ($2\text{C}_{9,10}$) ; 173,0 ($\text{C}_{6'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 3,4.

IR ν_{max} : 493 ; 755 ; 857 ; 970 ; 1028 ; 1157 ; 1269 ; 1465 ; 1760 ; 2852 ; 2922 ; 3372.

HR-MS (ESI+) m/z : 632,5009 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ trouvée ; 632,5014 calculée pour ($\text{C}_{35}\text{H}_{71}\text{NO}_6\text{P}^+$).

Pro-érufosine E_{E8} (**38**)

Le produit E_{E8} **38** (192 mg ; 69 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (202 mg ; 0,40 mmol) avec l'octanoate de chlorométhyle **45** (620 mg ; 3,22 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,36$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

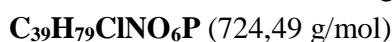
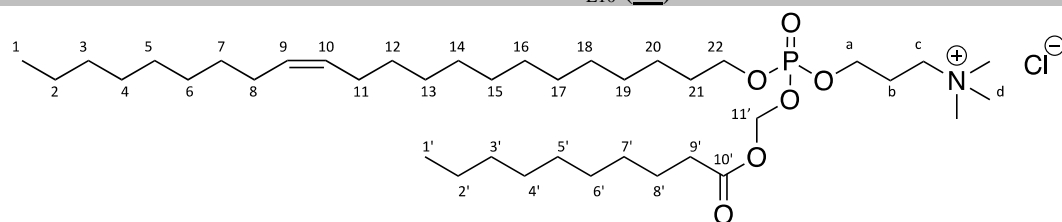
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 38H_{2-7,12-20,2'-5'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{6'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,01 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,41 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{7'}) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,20 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz , 2H_a) ; 5,32 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,8$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; 2H_{9'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,4 (C_{1'}) ; 14,5 (C₁) ; 23,2 (C_{2'}) ; 23,3 (C₂) ; 24,7 (C_b) ; 25,2 (C_{6'}) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,7 (2C_{4',5'}) ; 29,9 ; 30,0 (3C) ; 30,2 (3C) ; 30,3 (3C) ; 30,4 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,4 (C_{3'}) ; 32,6 (C₃) ; 34,5 (C_{7'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,5 (C_a) ; 69,9 (C₂₂) ; 83,4 (C_{9'}) ; 130,5 (C₉) ; 130,6 (C₁₀) ; 173,2 (C_{8'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,5.

IR ν_{max} : 506 ; 756 ; 858 ; 970 ; 1028 ; 1152 ; 1269 ; 1466 ; 1760 ; 2852 ; 2922 ; 3384.

HR-MS (ESI+) m/z : 660,5317 [M-Cl]⁺ trouvée ; 660,5327 calculée pour (C₃₇H₇₅NO₆P⁺).

Pro-érufosine E_{E10} (**39**)

Le produit E_{E10} **39** (220 mg ; 74 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (206 mg ; 0,41 mmol) avec le décanoate de chlorométhyle **46** (716 mg ; 3,27 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,43$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

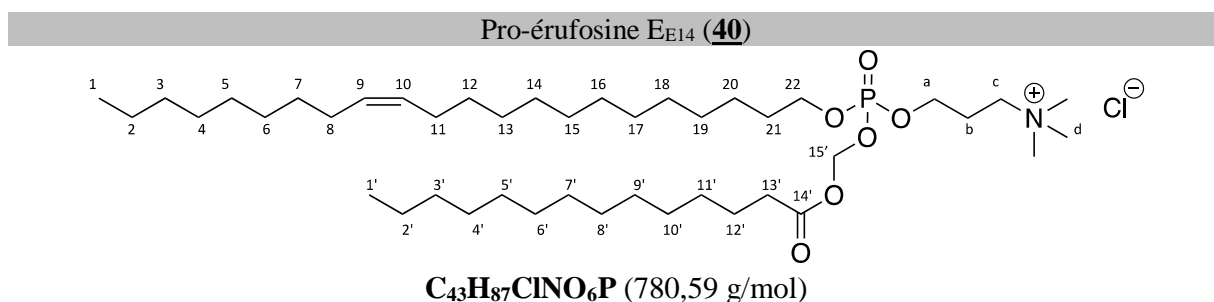
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$) ; 1,25 (m ; $42\text{H}_{2-7,12-20,2'-7'}$) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_8) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,41 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_9) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 4,20 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz , 2H_a) ; 5,32 (m ; $2\text{H}_{9,10}$) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,8$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; $2\text{H}_{11'}$).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,6 ($2\text{C}_{1,1'}$) ; 23,6 ($2\text{C}_{2,2'}$) ; 25,1 (C_b) ; 25,5 (C_8) ; 26,4 (C_{20}) ; 28,1 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 30,0 ; 30,2 (3C) ; 30,3 (3C) ; 30,4 (2C) ; 30,5 (2C) ; 30,6 (3C) ; 30,7 (2C) ; 31,2 (C_{21}) ; 32,9 ($2\text{C}_{3,3'}$) ; 34,8 (C_9) ; 53,9 (3C_d) ; 64,5 (C_c) ; 66,0 (C_a) ; 70,1 (C_{22}) ; 83,8 ($\text{C}_{11'}$) ; 130,8 ($2\text{C}_{9,10}$) ; 173,6 ($\text{C}_{10'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 3,2.

IR ν_{max} : 512 ; 752 ; 787 ; 858 ; 970 ; 1027 ; 1149 ; 1273 ; 1466 ; 1761 ; 2852 ; 2922 ; 3373.

HR-MS (ESI+) m/z : 688,5632 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 688,5640 calculée pour ($\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{NO}_6\text{P}^+$).



Le produit $\text{E}_{\text{E}14}$ **40** (100 mg ; 32 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200 mg ; 0,40 mmol) avec le tétradécanoate de chlorométhyle **47** (890 mg ; 3,17 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 75:22:3) ; révélateur : PMA.

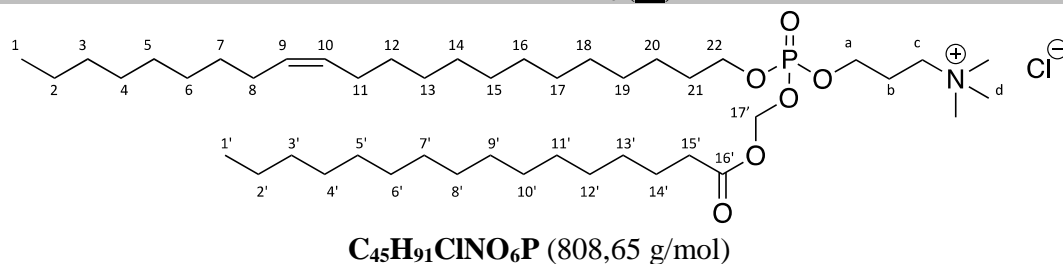
RMN ^1H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$) ; 1,25 (m ; $50\text{H}_{2-7,12-20,2'-11'}$) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{12}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,01 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,41 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{13}) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 4,20 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz , 2H_a) ; 5,32 (m ; $2\text{H}_{9,10}$) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,8$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; 2H_{15}).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : 14,5 ($2\text{C}_{1,1'}$) ; 23,4 ($2\text{C}_{2,2'}$) ; 24,9 (C_b) ; 25,3 (C_{12}) ; 26,2 (C_{20}) ; 27,9 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 (2C) ; 30,1 (2C) ; 30,3 (4C) ; 30,6 (8C) ; 30,5 (2C) ; 31,0 (C_{21}) ; 32,7 ($2\text{C}_{3,3'}$) ; 34,6 (C_{13}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,6 (C_a) ; 70,0 (C_{22}) ; 83,5 (C_{15}) ; 130,6 ($2\text{C}_{9,10}$) ; 173,3 (C_{14}).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl_3) : - 3,3.

IR ν_{max} : 515 ; 721 ; 772 ; 859 ; 966 ; 1030 ; 1160 ; 1269 ; 1467 ; 1760 ; 2849 ; 2918 ; 2956 ; 3395.

HR-MS (ESI+) m/z : 744,6259 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 744,6266 calculée pour ($\text{C}_{43}\text{H}_{87}\text{NO}_6\text{P}^+$).

Pro-érufosine E_{E16} (**41**)

Le produit E_{E16} **41** (236,8 mg ; 74 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (200 mg ; 0,40 mmol) avec l'hexadécanoate de chlorométhyle **48** (980 mg ; 3,21 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,45$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

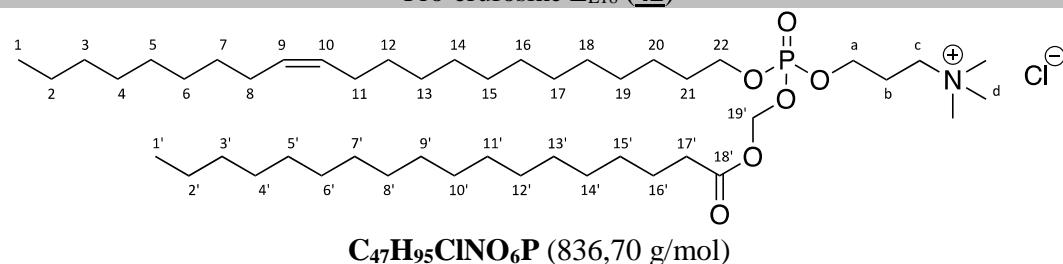
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,24 (m ; 54H_{2-7,12-20,2'-13'}) ; 1,63 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H_{14'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,01 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,41 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_{15'}) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,20 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz , 2H_a) ; 5,32 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 5,2$ Hz ; $J_{AX} = 13,8$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; 2H_{17'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,8 (C_b) ; 25,2 (C_{14'}) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,7 ; 29,8 ; 30,0 (6C) ; 30,2 (4C) ; 30,3 (8C) ; 30,4 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 34,5 (C_{15'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,3 (C_c) ; 65,4 (C_a) ; 69,9 (C₂₂) ; 83,4 (C_{17'}) ; 130,5 (2C_{9,10}) ; 173,2 (C_{16'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,3.

IR ν_{\max} : 506 ; 720 ; 758 ; 859 ; 969 ; 1021 ; 1159 ; 1272 ; 1467 ; 1760 ; 2850 ; 2918 ; 3379.

HR-MS (ESI+) m/z : 772,6569 [M-Cl]⁺ trouvée ; 772,6579 calculée pour (C₄₅H₉₁NO₆P⁺).

Pro-érufosine E_{E18} (**42**)

Le produit E_{E18} **42** (91,2 mg ; 55 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (100 mg ; 0,20 mmol) avec l'octadécanoate de chlorométhyle **49** (530 mg ; 1,59 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,49$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$) ; 1,24 (m ; $58\text{H}_{2-7,12-20,2'-15'}$) ; 1,62 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; $2\text{H}_{16'}$) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz ; 2H_{21}) ; 2,00 (m ; $4\text{H}_{8,11}$) ; 2,28 (m ; 2H_b) ; 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; $2\text{H}_{17'}$) ; 3,47 (s ; 9H_d) ; 3,80 (m ; 2H_c) ; 4,05 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H_{22}) ; 4,23 (m ; 2H_a) ; 5,34 (m ; $2\text{H}_{9,10}$) ; 5,63 (ABX ; $J_{AB} = 4,8$ Hz ; $J_{AX} = 12,9$ Hz ; $J_{BX} = 11,1$ Hz ; $2\text{H}_{17'}$).

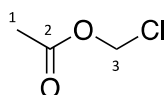
RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,3 ($2\text{C}_{1,1'}$) ; 22,8 ($2\text{C}_{2,2'}$) ; 24,5 (C_b) ; 24,7 ($\text{C}_{16'}$) ; 25,5 (C_{20}) ; 27,4 ($2\text{C}_{8,11}$) ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 (4C) ; 29,7 (3C) ; 29,8 (6C) ; 29,9 (6C) ; 30,0 (2C) ; 30,4 (C_{21}) ; 32,0 ($2\text{C}_{3,3'}$) ; 34,1 ($\text{C}_{17'}$) ; 53,8 (3C_d) ; 63,7 (C_c) ; 64,6 (C_a) ; 69,1 (C_{22}) ; 82,7 ($\text{C}_{19'}$) ; 130,0 ($2\text{C}_{9,10}$) ; 172,4 ($\text{C}_{18'}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; CDCl_3) : - 3,3.

IR ν_{max} : 508 ; 721 ; 771 ; 859 ; 967 ; 1032 ; 1161 ; 1267 ; 1467 ; 1761 ; 2849 ; 2917 ; 3377.

HR-MS (ESI+) m/z : 800,6891 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 800,6892 calculée pour ($\text{C}_{47}\text{H}_{95}\text{NO}_6\text{P}^+$).

Acétate de chlorométhyle : E2-Cl (**43**)



C₃H₅ClO₂ (108,52 g/mol)

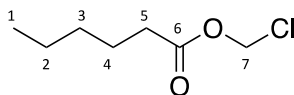
Le produit **43** (2,95 g ; 90 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'acétyle (2,14 mL ; 30 mmol), de chlorure de zinc (81 mg ; 0,6 mmol) et de formaldéhyde (905 mg ; 30 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 2,14 (s ; 3H_1) ; 5,68 (s ; 2H_3).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 20,8 (C_1) ; 68,7 (C_3) ; 172,0 (C_2).

IR ν_{max} : 461 ; 598 ; 713 ; 818 ; 982 ; 1015 ; 1041 ; 1194 ; 1371 ; 1712 ; 1762.

Hexanoate de chlorométhyle E6 (**44**)



C₇H₁₃ClO₂ (164,63 g/mol)

Le produit **44** (1,05 g ; 71 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'hexanoyle (1,20 g ; 8,92 mmol), de chlorure de zinc (28 mg ; 0,24 mmol) et de formaldéhyde (268 mg ; 8,92 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

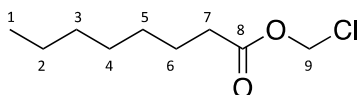
R_f = 0,74 (EP/Et₂O 75:25) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,90 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 3H_1) ; 1,32 (m ; $4\text{H}_{2,3}$) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H_4) ; 2,36 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H_5) ; 5,68 (s ; 2H_7).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,1 (C_1); 22,5 (C_2); 24,4 (C_4); 31,3 (C_3); 34,2 (C_5); 68,8 (C_7); 172,0 (C_6).

IR ν_{max} : 718; 773; 988; 1039; 1094; 1137; 1223; 1245; 1708; 1761; 2931; 2957.

Octanoate de chlorométhyle E8 (**45**)



C₉H₁₇ClO₂ (192,68 g/mol)

Le produit **45** (2,6 g ; 82 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'octanoyle (2,85 mL ; 16,6 mmol), de chlorure de zinc (45 mg ; 0,33 mmol) et de formaldéhyde (500 mg ; 16,6 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

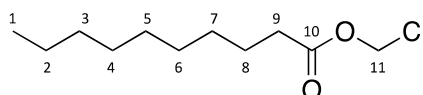
R_f = 0,75 (EP/Et₂O 90:10) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 3H₁); 1,30 (m ; 8H₂₋₅); 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H₆); 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₇); 5,68 (s ; 2H₉).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,2 (C_1); 22,7 (C_2); 24,7 (C_6); 30,0 (2C_{4,5}); 31,7 (C_3); 34,1 (C_7); 68,7 (C_9); 171,9 (C_8).

IR ν_{max} : 462; 716; 1038; 1102; 1136; 1260; 1441; 1763; 2856; 2926.

Décanoate de chlorométhyle E10 (**46**)



C₁₁H₂₁ClO₂ (220,74 g/mol)

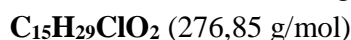
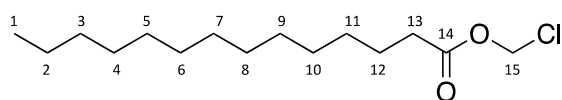
Le produit **46** (2,92 g ; 80 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure de décanoyle (3,43 mL ; 16,6 mmol), de chlorure de zinc (45 mg ; 0,33 mmol) et de formaldéhyde (500 mg ; 16,6 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

R_f = 0,74 (EP/Et₂O 90:10) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁); 1,26 (m ; 12H₂₋₇); 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,3$ Hz ; 2H₈); 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₉); 5,70 (s ; 2H₁₁).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,3 (C_1); 22,9 (C_2); 24,8 (C_8); 29,2 (C_7); 29,4 (2C_{4,6}); 29,6 (C_5); 32,1 (C_3); 34,2 (C_9); 68,8 (C_{11}); 172,0 (C_{10}).

IR ν_{max} : 463; 718; 758; 1034; 1105; 1135; 1260; 1338; 1441; 1465; 1764; 2854; 2924.

Tétradécanoate de chlorométhyle E14 (**47**)

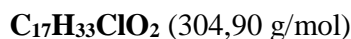
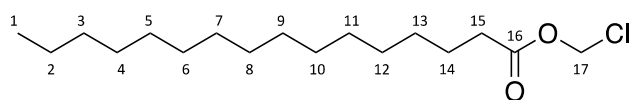
Le produit **47** (3,10 g ; 68 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure de tétradécanoyle (4,55 mL ; 16,6 mmol), de chlorure de zinc (45 mg ; 0,33 mmol) et de formaldéhyde (500 mg ; 16,6 mmol), selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

$R_f = 0,75$ (EP/Et₂O 90:10) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 20H₂₋₁₁) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H₁₂) ; 2,38 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₃) ; 5,70 (s ; 2H₁₅).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₂) ; 29,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 (3C) ; 32,1 (C₃) ; 34,2 (C₁₃) ; 68,7 (C₁₅) ; 172 (C₁₄).

IR ν_{max} : 463 ; 719 ; 758 ; 1036 ; 1108 ; 1135 ; 1217 ; 1340 ; 1441 ; 1465 ; 1765 ; 2853 ; 2922.

Hexadécanoate de chlorométhyle E16 (**48**)

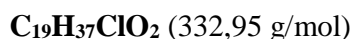
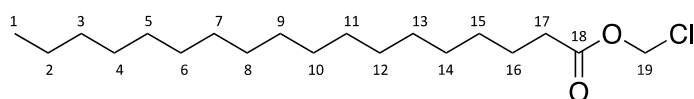
Le produit **48** (3,60 g ; 71 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'hexadécanoyle (5,05 mL ; 16,6 mmol), de chlorure de zinc (45 mg ; 0,33 mmol) et de formaldéhyde (500 mg ; 16,6 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

$R_f = 0,75$ (EP/Et₂O 90:10) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 24H₂₋₁₃) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,2$ Hz ; 2H₁₄) ; 2,38 (t ; $J = 7,6$ Hz ; 2H₁₅) ; 5,70 (s ; 2H₁₇).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₄) ; 29,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 (5C) ; 32,1 (C₃) ; 34,2 (C₁₅) ; 68,7 (C₁₇) ; 171,9 (C₁₆).

IR ν_{max} : 437 ; 686 ; 718 ; 772 ; 994 ; 1017 ; 1035 ; 1098 ; 1147 ; 1192 ; 1216 ; 1260 ; 1383 ; 1438 ; 1461 ; 1472 ; 1755 ; 2848 ; 2915 ; 2964.

Octadécanoate de chlorométhyle E18 (**49**)

Le produit **49** (4,38 g ; 76 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure d'octadécénoyle (5,4 g ; 17,6 mmol), de chlorure de zinc (50 mg ; 0,35 mmol) et de formaldéhyde (530 mg ; 17,6 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**.

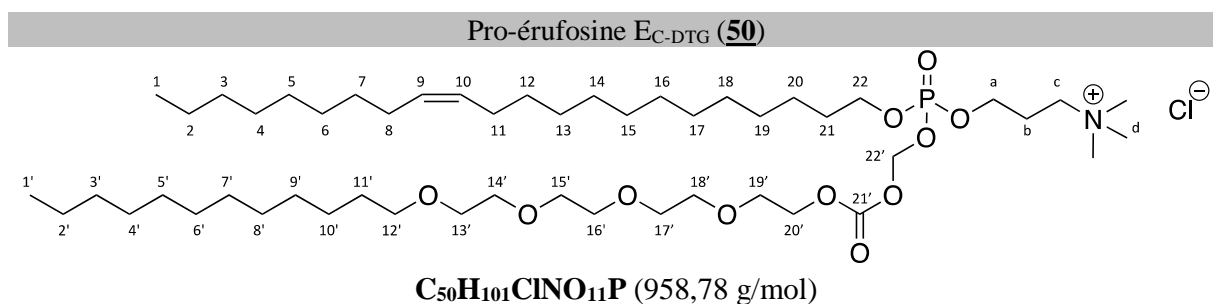
$R_f = 0,62$ (EP/Et₂O 90:10) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,90 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,32 (m ; 28H₂₋₁₅) ; 1,65 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,0$ Hz ; 2H₁₆) ; 2,36 (t ; $J = 7,5$ Hz ; 2H₁₇) ; 5,68 (s ; 2H₁₉).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,8 (C₂) ; 24,7 (C₁₆) ; 29,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 (7C) ; 32,1 (C₃) ; 34,2 (C₁₇) ; 68,7 (C₁₉) ; 171,9 (C₁₈).

IR ν_{max} : 686 ; 718 ; 793 ; 1017 ; 1035 ; 1045 ; 1099 ; 1147 ; 1191 ; 1259 ; 1383 ; 1438 ; 1462 ; 1472 ; 1755 ; 2848 ; 2916 ; 2959.

IV.6. Les pro-APLs de II^{ème} génération (E_{Yn})



Le produit E_{C-DTG} **50** (96 mg ; 51 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (100 mg ; 0,20 mmol) avec le carbonate de chlorométhyle et de C₁₂E₄ **52** (890 mg ; 1,95 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,40$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

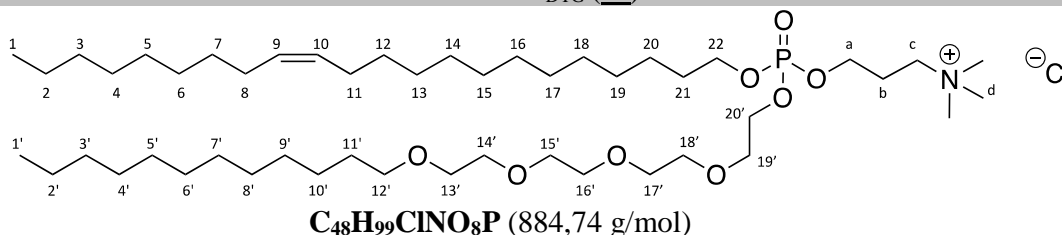
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 48H_{2-7,12-20,2'-10'}) ; 1,55 (m ; 2H_{11'}) ; 1,69 (m ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,21 (m ; 2H_b) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,43 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H_{12'}) ; 3,50 (m ; 2H_c) ; 3,57 (m ; 2H_{13'}) ; 3,65 (m ; 10H_{14'-18'}) ; 3,74 (m ; 2H_{19'}) ; 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,20 (m ; 2H_a) ; 4,36 (m ; 2H_{20'}) ; 5,31 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,64 (m ; 2H_{22'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,7 (C_b) ; 26,0 (C₂₀) ; 26,7 (C_{10'}) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,8 ; 30,0 (4C) ; 30,1 (2C) ; 30,2 (2C) ; 30,3 (8C) ; 30,4 (2C) ; 30,8 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 53,8 (3C_d) ; 64,4 (C_c) ; 65,5 (C_a) ; 68,7 (C_{19'}) ; 69,3 (C_{20'}) ; 69,9 (C₂₂) ; 70,6 (C_{18'}) ; 71,1 (5C_{13'-17'}) ; 72,2 (C_{12'}) ; 86,6 (C_{22'}) ; 130,5 (2C_{9,10}) ; 154,4 (C_{21'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,1.

IR ν_{max} : 507 ; 753 ; 860 ; 986 ; 1030 ; 1110 ; 1259 ; 1465 ; 1766 ; 2853 ; 2922 ; 3363.

HR-MS (ESI+) *m/z* : 922,7108 [M-Cl]⁺ trouvée ; 922,7107 calculée pour (C₅₀H₁₀₁NO₁₁P⁺).

Pro-érufosine E_{DTG} (**51**)

Le produit E_{DTG} **51** (130 mg ; 74 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (100 mg ; 0,16 mmol) avec le triflate de C₁₂E₄ **53** (350 mg ; 0,53 mmol) selon la procédure **PG1**, mais à température ambiante.

$R_f = 0,60$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

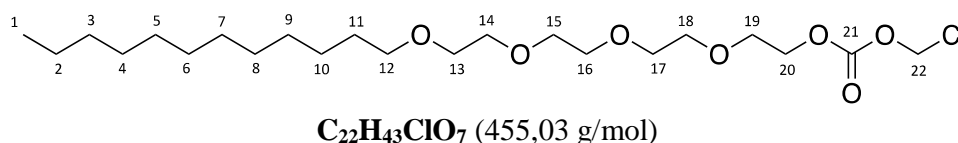
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,25 (m ; 48H_{2-7,12-20,2'-10'}) ; 1,55 (m ; 2H_{11'}) ; 1,68 (m ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,21 (m ; 2H_b) ; 3,14 (s ; 9H_d) ; 3,43-3,49 (m ; 2H_{12'} et 2H_c) ; 3,58 (m ; 2H_{13'}) ; 3,63 (m ; 10H_{14'-18'}) ; 3,70 (m ; 2H_{19'}) ; 4,05 (m ; 2H₂₂) ; 4,17 (m ; 2H_a et 2H_{20'}) ; 5,30 (m ; 2H_{9,10}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 23,3 (2C_{2,2'}) ; 24,7 (C_b) ; 26,1 (C₂₀) ; 26,7 (C_{10'}) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,8 ; 30,0 (4C) ; 30,1 (2C) ; 30,2 (2C) ; 30,3 (8C) ; 30,4 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 53,7 (3C_d) ; 64,4 (C_c) ; 65,1 (C_a) ; 68,0 (C_{19'}) ; 69,3 (C₂₂) ; 69,5 (C_{20'}) ; 70,6 (C_{18'}) ; 71,1 (5C_{13'-17'}) ; 72,2 (C_{12'}) ; 130,5 (2C_{9,10}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 1,5.

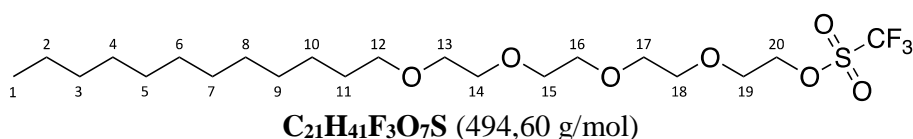
IR ν_{\max} : 517 ; 573 ; 638 ; 772 ; 969 ; 1030 ; 1079 ; 1158 ; 1225 ; 1255 ; 1466 ; 2852 ; 2922.

HR-MS (ESI+) m/z : 848,7092 [M-Cl]⁺ trouvée ; 848,7103 calculée pour (C₄₈H₉₉NO₈P⁺).

Carbonate de chlorométhyle et de C₁₂E₄ : C-DTG-Cl (**52**)

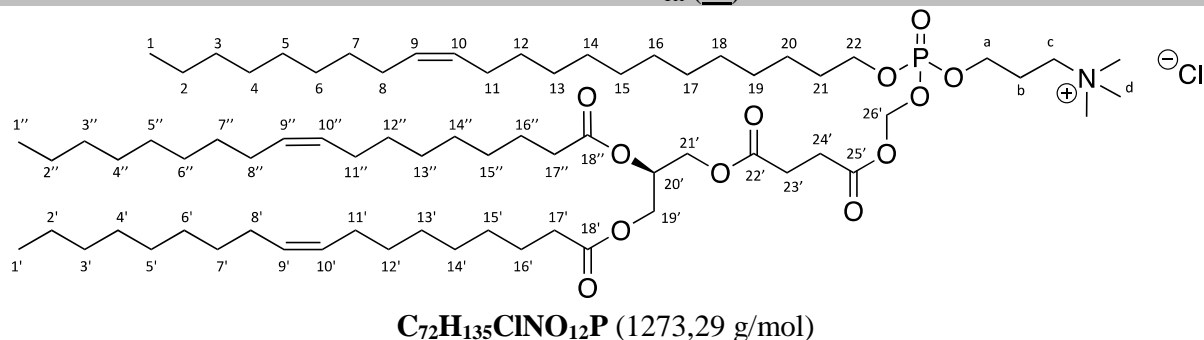
Le produit **52** (9,32 g ; 56 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de C₁₂E₄ (13,3 g ; 36,7 mmol), de chloroformate de chlorométhyle (3,9 mL ; 44,0 mmol) et de pyridine (4,43 mL ; 55,1 mmol) dans le CHCl₃, selon la procédure décrite pour la préparation du composé **31**. Le C₁₂E₄ est lui-même préparé à partir de tétraéthylène glycol et de bromododécane dans une solution d'hydroxyde de sodium à 50 %, selon une procédure précédemment publiée par le laboratoire.³⁰⁴

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,87 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 3H₁) ; 1,25 (m ; 18H₂₋₁₀) ; 1,56 (m ; 2H₁₁) ; 3,43 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 2H₁₂) ; 3,57 (m ; 2H₁₃) ; 3,65 (m ; 10H₁₄₋₁₈) ; 3,74 (m ; 2H₁₉) ; 4,36 (m ; 2H₂₀) ; 5,72 (s ; 2H₂₂).

Triflate de C₁₂E₄ : DTG-OTf (**53**)

L'anhydride trifluorométhanesulfonique (300 μ l ; 1,7 mmol) est additionnée goutte à goutte en 10 minutes à une solution de C₁₂E₄ (500 mg ; 1,3 mmol) et de pyridine (200 μ l ; 2,6 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (5 mL), à -50 °C et sous argon. Le milieu réactionnel est agité 2 heures à -50 °C, puis il est décomposé par addition dans H₂O à 0 °C (20 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse résultante est extraite avec CH₂Cl₂ (10 mL). La phase organique résultante est lavée deux fois par H₂O à 0 °C (2 x 20 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le brut réactionnel de **53** est engagé rapidement dans les étapes suivantes, sans purification préalable, en raison de son instabilité.³⁰⁴

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; J = 6,4 Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 18H₂₋₁₀) ; 1,57 (m ; 2H₁₁) ; 3,44 (t ; J = 6 Hz ; 2H₁₂) ; 3,57 (m ; 2H₁₃) ; 3,65 (m ; 10H₁₄₋₁₈) ; 3,83 (m ; 2H₁₉) ; 4,62 (m ; 2H₂₀).

Pro-érufosine E_{Tri} (**54**)

Le produit E_{Tri} **54** (96 mg ; 42 %) est obtenu par *O*-alkylation de l'érufosine **3** (90 mg ; 0,18 mmol) avec le (*R*)-2,3-bis(oleoyloxy)propyl (chlorométhyl) succinate **55** (770 mg ; 1,00 mmol) selon la procédure **PG1**.

R_f = 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; J = 6,8 Hz ; 9H_{1,1',1''}) ; 1,26 (m ; 70H_{2-7,2'-7'',2''-7'',12-20,12'-15',12''-15''}) ; 1,60 (m ; 4H_{16',16''}) ; 1,70 (tt ; $J_1 = J_2 = 7,0$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 12H_{8,8',8'',11,11',11''}) ; 2,19 (m ; 2H_b) ; 2,31 (t ; J = 7,4 Hz ; 2H_{17'}) ; 2,32 (t ; J = 7,4 Hz ; 2H_{17''}) ; 2,70 (m ; 4H_{23',24'}) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,49 (m ; 2H_c) ; 4,07 (td ; $J_1 = J_2 = 6,9$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,11-4,34 (m ; 4H_{19',21'} et 2H_a) ; 5,24 (m ; 1H_{20'}) ; 5,31 (m ; 6H_{9,9',9'',10,10',10''}) ; 5,71 (ABX ; $J_{AB} = 5,6$ Hz ; $J_{AX} = 10,7$ Hz ; $J_{BX} = 10,9$ Hz ; 2H_{26'}).

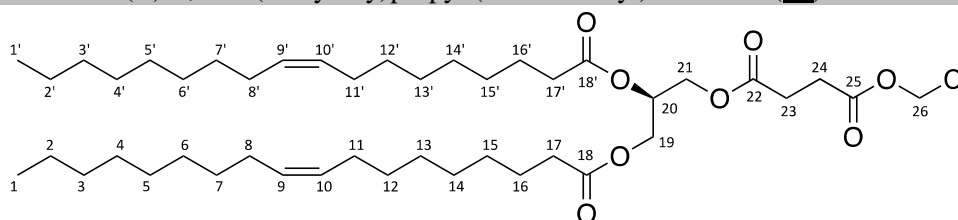
RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,5 ($3\text{C}_{1,1',1''}$); 23,3 ($3\text{C}_{2,2',2''}$); 24,8 (C_b); 25,6 ($2\text{C}_{16,16''}$); 26,1 (C_{20}); 27,8 ($6\text{C}_{8,8',8'',11,11',11''}$); 29,1 (C_{23}); 29,4 (C_{24}); 29,8 (3C); 29,9 (3C); 30,0 (8C); 30,2 (4C); 30,3 (2C); 30,4 (8C); 30,9 (C_{21}); 32,1 ($3\text{C}_{3,3',3''}$); 34,7 ($\text{C}_{17'}$); 34,9 ($\text{C}_{17''}$); 53,7 (3C_d); 62,9 ($\text{C}_{19'}$); 63,4 (C_c); 64,3 ($\text{C}_{21'}$); 65,5 (C_a); 69,8 ($\text{C}_{20'}$); 69,9 (C_{22}); 83,6 ($\text{C}_{26'}$); 129,8 ($2\text{C}_{9',9''}$); 130,2 (C_9); 129,8 (C_{10}); 130,2 ($2\text{C}_{10',10''}$); 171,8 ($\text{C}_{22'}$); 172,7 ($\text{C}_{25'}$); 174,1 ($\text{C}_{18'}$); 174,5 ($\text{C}_{18''}$).

RMN ^{31}P δ (162 MHz ; CDCl_3) : - 3,2.

IR ν_{max} : 514; 572 ; 758; 858; 977; 1031; 1146; 1265; 1464; 1742; 2852; 2922; 3351.

HR-MS (ESI+) m/z : 1236,9700 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$ trouvée ; 1236,9716 calculée pour ($\text{C}_{72}\text{H}_{135}\text{NO}_{12}\text{P}^+$).

(R)-2,3-bis(oleoyloxy)propyl (chloromethyl) succinate (**55**)³⁰⁴



C₄₄H₇₇ClO₈ (769,54 g/mol)

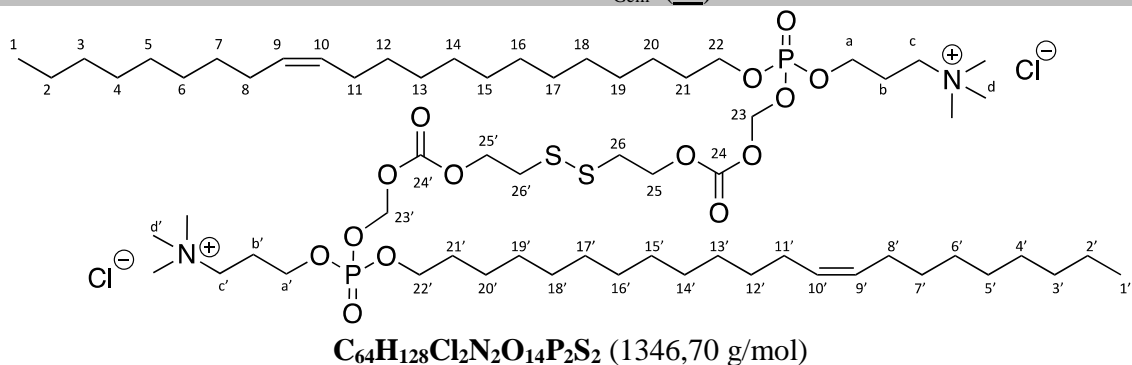
Du $n\text{Bu}_4\text{NHSO}_4$ (18 mg, 0,03mmol) et du Na_2CO_3 (61 mg, 0,6 mmol) sont ajoutés à une suspension de l'ester **70** (110 mg ; 0,15 mmol) dans l'eau (5 mL), et le milieu est agité pendant 20 minutes, à température ambiante, jusqu'à éclaircissement de la solution, puis placé à 0 °C. Une solution de chlorosulfate de chlorométhyle (19 μL ; 0,2 mmol) dans le (5 mL) est alors additionnée, goutte à goutte, en 10 minutes. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 1 heure à 0 °C, puis 18 heures à température ambiante. Les phases sont séparées, la phase aqueuse résultante est ré-extraite avec CHCl_3 (10 mL) et la phase organique résultante est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 100:0 à 70:30), pour donner le produit **55** (101 mg ; 86 %) sous la forme d'une huile incolore.

R_f = 0,58 (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; J = 6,4 Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$); 1,26 (m ; $40\text{H}_{2-7,2'-7',12-15,12'-15'}$); 1,60 (m ; $4\text{H}_{16,16'}$); 2,00 (m ; $8\text{H}_{8,8',11,11'}$); 2,31 (t ; J = 7,4 Hz ; 2H_{17}); 2,32 (t ; J = 7,4 Hz ; $2\text{H}_{17'}$); 2,70 (m ; $4\text{H}_{23,24}$); 4,11-4,34 (m ; $4\text{H}_{19,21}$); 5,26 (m ; 1H_{20}); 5,34 (m ; $4\text{H}_{9,9',10,10'}$); 5,71 (s ; 2H_{26}).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl_3) : 14,2 ($2\text{C}_{1,1'}$); 22,8 ($2\text{C}_{2,2'}$); 25,0 ($2\text{C}_{16,16'}$); 27,3 ($2\text{C}_{8,8'}$); 27,4 ($2\text{C}_{11,11'}$); 28,7 (C_{23}); 29,0 (C_{24}); 29,3 (6C); 29,5 (4C); 29,7 (2C); 29,9 (2C); 29,9 (2C); 32,1 ($2\text{C}_{3,3'}$); 34,2 (C_{17}); 34,3 ($\text{C}_{17'}$); 62,1 (C_{19}); 62,9 (C_{21}); 68,8 (C_{20}); 68,9 (C_{26}); 129,8 ($2\text{C}_{9,9'}$); 130,2 ($2\text{C}_{10,10'}$); 170,4 (C_{22}); 171,4 (C_{25}); 173,0 (C_{18}); 173,4 ($\text{C}_{18'}$).

IR ν_{max} : 721; 1002; 1020; 1130; 1162; 1367; 1463; 1741; 2852; 2922.

Pro-érufosine E_{Gem} (**58**)

Le produit E_{Gem} **58** (54 mg ; 7 %) est obtenu par double *O*-alkylation de l'érufosine **3** (640 mg ; 1,27 mmol) avec le Bis-carbonate de chlorométhyle et de 2-mercaptoéthyle **61** (200 mg ; 0,59 mmol) selon la procédure **PG1**.

$R_f = 0,37$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

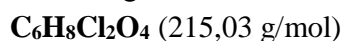
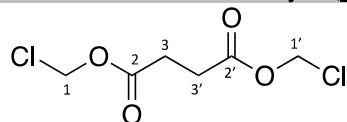
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 60H_{2-7,12-20,2'-7',12'-20'}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{21,21'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,20 (m ; 4H_{b,b'}) ; 3,01 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 4H_{26,26'}) ; 3,19 (s ; 18H_{d,d'}) ; 3,51 (m ; 4H_{c,c'}) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 4H_{22,22'}) ; 4,20 (m ; 4H_{a,a'}) ; 4,47 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 4H_{25,25'}) ; 5,31 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 5,65 (m ; 4H_{23,23'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (2C_{1,1'}) ; 23,4 (2C_{2,2'}) ; 24,9 (2C_{b,b'}) ; 26,0 (2C₂₀) ; 27,8 (4C_{8,8',11,11'}) ; 29,9 (2C) ; 30,0 (5C) ; 30,2 ; 30,3 (6C) ; 30,4 (7C) ; 30,5 (3C) ; 30,9 (2C_{21,21'}) ; 32,6 (2C_{3,3'}) ; 37,4 (2C_{26,26'}) ; 53,8 (6C_{d,d'}) ; 64,3 (2C_{c,c'}) ; 65,7 (2C_{a,a'}) ; 67,1 (2C_{25,25'}) ; 70,0 (2C_{22,22'}) ; 86,7 (2C_{23,23'}) ; 130,5 (2C_{9,9'}) ; 130,6 (2C_{10,10'}) ; 154,3 (2C_{24,24'}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,2.

IR ν_{\max} : 494 ; 720 ; 785 ; 859 ; 943 ; 968 ; 1016 ; 1056 ; 1255 ; 1378 ; 1465 ; 1764 ; 2852 ; 2921 ; 3394.

HR-MS (ESI+) m/z : 637,4134 [M-2Cl]²⁺ trouvée ; 637,4136 calculée pour (C₆₄H₁₂₈N₂O₁₄P₂S₂)²⁺.

Succinate de dichlorométhyle (**59**)

Le produit **59** (480 mg ; 27 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure de succinyle, de chlorure de zinc (24 mg ; 0,18 mmol) et de formaldéhyde (540 mg ; 18,2 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**. Le chlorure de succinyle est lui-même obtenu par addition, goutte à goutte, de chlorure d'oxalylyle (5,75 mL ; 67 mmol) sur une suspension d'acide succinique (1,0 g ; 8,4 mmol) dans le CHCl₃

anhydre (20 mL), en présence d'une goutte de DMF, à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité pendant la nuit à température ambiante, puis concentré sous vide.

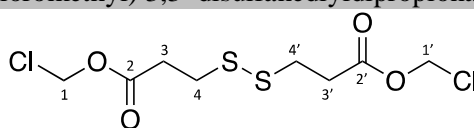
$R_f = 0,2$ (EP/Et₂O 9:1) ; révélateur : DCIP.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 2,75 (s ; 4H_{3,3'}) ; 5,72 (s ; 4H_{1,1'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 28,72 (2C_{3,3'}) ; 69,0 (2C_{1,1'}) ; 170,2 (2C_{2,2'}).

IR ν_{\max} : 441 ; 710 ; 771 ; 824 ; 995 ; 1022 ; 1068 ; 1117 ; 1260 ; 1365 ; 1442 ; 1755.

bis(chlorométhyle) 3,3'-disulfanediylidipropionate (**60**)



C₈H₁₂Cl₂O₄S₂ (307,20 g/mol)

Le produit **60** (1,15 mg ; 46 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de chlorure de 3,3'-disulfanediylidipropionyle, de chlorure de zinc (24 mg ; 0,18 mmol) et de formaldéhyde (540 mg ; 18,2 mmol) selon la procédure décrite pour préparer le composé **27**. Le chlorure de 3,3'-disulfanediylidipropionyle est lui-même obtenu par addition, goutte à goutte, de chlorure d'oxalyle (5,50 mL ; 64 mmol) sur une suspension d'acide 3,3'-disulfanediylidipropionyle (1,7 g ; 8,1 mmol) dans le CHCl₃ anhydre (20 mL), en présence d'une goutte de DMF, à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité pendant la nuit à température ambiante, puis concentré sous vide, avant d'être directement engagé dans la suite de la réaction.

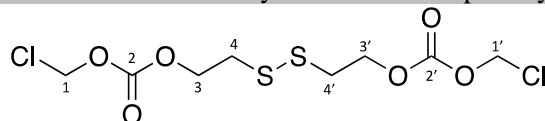
$R_f = 0,47$ (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 2,83 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 4H_{3,3'}) ; 2,94 (t ; $J = 6,6$ Hz ; 4H_{4,4'}) ; 5,72 (s ; 4H_{1,1'}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 32,6 (2C_{3,3'}) ; 34,2 (2C_{4,4'}) ; 69,0 (2C_{1,1'}) ; 170,0 (2C_{2,2'}).

IR ν_{\max} : 462 ; 666 ; 710 ; 755 ; 994 ; 1013 ; 1033 ; 1115 ; 1168 ; 1210 ; 1259 ; 1359 ; 1440 ; 1755.

Bis carbonate de chlorométhyle et de 2-mercaptoéthyle (**61**)



C₈H₁₂Cl₂O₆S₂ (339,20 g/mol)

Le produit **61** (400 mg ; 36 %) est obtenu sous la forme d'une huile incolore à partir de 2,2'-dithiodiéthanol (500 mg ; 3,2 mmol), de chloroformate de chlorométhyle (570 μ L ; 6,4 mmol) et de pyridine (1 mL ; 12,4 mmol) dans le CHCl₃, selon la procédure décrite pour préparer le composé **31**.

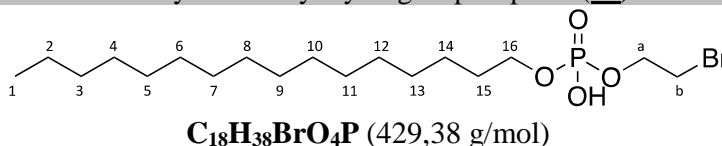
$R_f = 0,43$ (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 2,99 (t ; $J = 6,5$ Hz ; 4H₄) ; 4,48 (t ; $J = 6,5$ Hz ; 4H₃) ; 5,74 (s ; 4H₁).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 37,0 (2C₄) ; 66,8 (2C₃) ; 72,5 (2C₁) ; 153,4 (2C₂).

IR ν_{\max} : 537 ; 713 ; 755 ; 782 ; 897 ; 955 ; 1012 ; 1048 ; 1113 ; 1220 ; 1342 ; 1382 ; 1443 ; 1758.

2-Bromoéthyl hexadécyl hydrogénophosphate (**62**)



De la triéthylamine (822 μ L ; 5,90 mmol) est ajoutée à de l'oxychlorure de phosphore (500 μ L ; 5,36 mmol) en solution dans le THF anhydre (20 mL), à 0 °C et sous argon. Une solution d'hexadécanol (1,30 g ; 5,36 mmol) dans le THF (10 mL) est ensuite additionnée goutte à goutte, en 30 minutes, au mélange précédent. Le milieu réactionnel est réchauffé à température ambiante et agité jusqu'à disparition complète de l'alcool (CCM : EP/Et₂O 8:2). Le milieu est à nouveau refroidi à 0 °C et une seconde portion de triéthylamine (3,30 mL ; 21,4 mmol) est ajoutée, suivie d'une solution de 2-bromoéthanol (380 μ L ; 5,36 mmol) dans le THF (10 mL) additionnée goutte à goutte en 30 minutes. Le milieu est agité la nuit à température ambiante, puis il est décomposé par addition de HCl 10 % (10 mL) et agité pendant 2 heures à 40 °C. Le THF est ensuite éliminé sous vide et le résidu est extrait avec CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **62** (1,01 g ; 43 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 10:0 à 8:2).

$R_f = 0,43$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

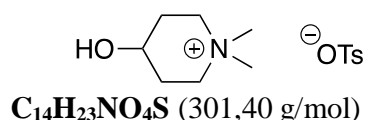
RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,85 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 3H₁) ; 1,24 (m ; 26H₂₋₁₄) ; 1,60 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,4$ Hz ; 2H₁₅) ; 3,51 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H_b) ; 3,86 (td ; $J_1 = J_2 = 6,5$ Hz ; 2H₁₆) ; 4,10 (td ; $J_1 = J_2 = 6,5$ Hz ; 2H_a).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 23,3 (C₂) ; 26,4 (C₁₄) ; 30,0 (C_b) ; 30,3 (10C₄₋₁₃) ; 31,3 (C₁₅) ; 32,6 (C₃) ; 66,0 (C_a) ; 66,7 (C₁₆).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 0,6.

IR ν_{\max} : 495 ; 596 ; 695 ; 733 ; 772 ; 879 ; 1007 ; 1218 ; 1270 ; 1456 ; 2852 ; 2921.

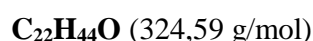
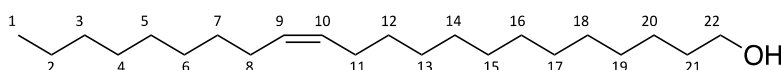
Tosylate de *N,N*-diméthyl-4-hydroxypipéridinium (**63**)



Du tosylate de méthyle (6,55 mL ; 43,4 mmol) est ajouté goutte à goutte, en 15 min et à 0 °C, à une solution de *N*-méthyl-4-piperidinol (5,0 g ; 43,4 mmol) dans CH₃CN (100 mL). Le milieu

réactionnel est agité jusqu'à complète disparition du tosylate de méthyle (4 heures), puis filtré, lavé à l'Et₂O et séché sous vide. Le produit attendu **63** (12,4 g ; 97 %) est engagé dans la réaction suivante sans purification supplémentaire.

$R_f = 0,28$ (EP/Et₂O 8:2) ; révélateur : PMA.

Alcool érucique (**64**)

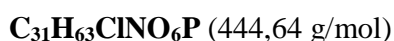
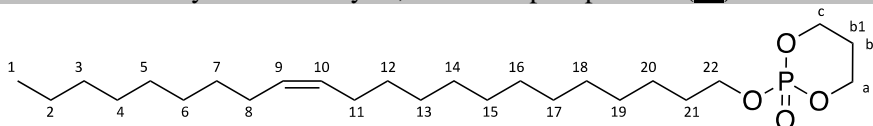
De l'acide érucique (10,0 g ; 29,5 mmol) en solution dans le THF anhydre (50 mL) est additionné goutte à goutte, en 20 minutes, à une solution d'hydrure d'aluminium et de lithium dans le THF (2,0 M ; 44,3 mL ; 44,3 mmol), à 0 °C et sous argon. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à conversion complète (CCM : EP/Et₂O 7:3), puis il est décomposé par addition d'acide acétique (10 mL) à 0 °C, puis d'un mélange H₂O/HCl 10 % à température ambiante. Le THF est ensuite éliminé sous vide et le résidu est extrait avec Et₂O. Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite avec Et₂O et la phase organique résultante est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **64** (9,06 g ; 94 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 3:1).

$R_f = 0,29$ (EP/Et₂O 3:1) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,7$ Hz, 3H₁) ; 1,27 (m ; 30H_{2-7,12-20}) ; 1,57 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,01 (m ; 4H_{8,11}) ; 3,64 (t ; $J = 6,7$ Hz ; 2H₂₂) ; 5,35 (m ; 2H_{9,10}).

RMN ¹³C δ (75,0 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,9 (C₂) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,4 (2C_{8,11}) ; 28,8 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 (2C) ; 29,8 (3C) ; 29,9 (3C) ; 30,0 (C₂₁) ; 32,1 (C₃) ; 64,9 (C₂₂) ; 130,1 (2C_{9,10}).

IR ν_{\max} : 722 ; 972 ; 1005 ; 1023 ; 1045 ; 1054 ; 1130 ; 1378 ; 1461 ; 2848 ; 2871 ; 2916 ; 2953 ; 3346.

Oxyde de 2-érucyl-1,3-dioxa-2-phosphinane (**65**)

De la triéthylamine (1,30 mL ; 9,27 mmol) est ajoutée à de l'oxychlorure de phosphore (474 mg ; 3,09 mmol) en solution dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL), à 0 °C et sous argon. Une solution d'alcool érucique **64** (1,00 g ; 3,09 mmol) dans le CH₂Cl₂ (15 mL) est ensuite additionnée goutte à goutte, en 90 minutes, à 0 °C au mélange précédent. Le milieu réactionnel est agité 30 minutes à température ambiante jusqu'à disparition complète de l'alcool (CCM : EP/Et₂O 7:3).

Le milieu réactionnel est à nouveau refroidi à 0 °C et une solution de propane-1,3-diol (235 mg ; 3,09 mmol) dans le CH₂Cl₂ (15 mL) est additionnée goutte à goutte en 60 minutes. Le milieu réactionnel est agité la nuit à température ambiante, puis il est décomposé par addition d'une solution de HCl 10 % (10 mL). Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ et la phase organique résultante est lavée par une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **65** (824 mg ; 60 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (Et₂O 10:0).

R_f = 0,30 (EP/Et₂O 0:10) ; révélateur : PMA.

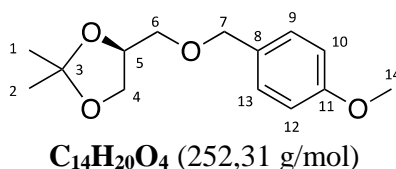
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; *J* = 6,6 Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 30H_{2-7,12-20}) ; 1,61 (m ; 0,5H_{b1}) ; 1,72 (m ; 2H₂₁) ; 1,77 (m ; 0,5H_{b1}) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,26 (dtt ; *J*₁ = 15,3 Hz ; *J*₂ = 10,3 Hz ; *J*₃ = 5,3 Hz ; 1H_{b2}) ; 4,09 (td ; *J*₁ = *J*₂ = 6,9 Hz ; 2H₂₂) ; 4,32-4,45 (m ; 4H_{a,c}) ; 5,34 (m ; 2H_{9,10}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,3 (C₁) ; 22,9 (C₂) ; 25,7 (C₂₀) ; 26,4 (C_b) ; 27,4 (2C_{8,11}) ; 29,4 ; 29,5 (3C) ; 29,7 (2C) ; 29,8 (4C) ; 30,0 (2C) ; 30,5 (C₂₁) ; 32,1 (C₃) ; 67,8 (C₂₂) ; 68,6 (2C_{a,c}) ; 130,1 (2C_{9,10}).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; CDCl₃) : - 7,1.

IR ν_{max} : 457 ; 594 ; 721 ; 771 ; 828 ; 883 ; 934 ; 966 ; 1029 ; 1141 ; 1237 ; 1297 ; 1464 ; 2852 ; 2921.

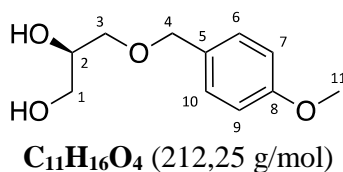
(*S*)-4-(((3-methoxybenzyl)oxy)methyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane (**66**)



De l'hydruide de sodium (1,3 g ; 54 mmol) est additionné goutte à goutte à une solution de (*S*)-(-)-diméthyl-2,2 dioxolanne-1,3 méthanol-4 (4,31 mL ; 29 mmol) dans le THF anhydre (50 mL), à 0 °C. Le milieu réactionnel est réchauffé à température ambiante et agité 10 minutes avant addition de chlorure de méthoxy-3 benzyle (4,31 mL ; 32 mmol) et d'iodure de sodium (245 mg ; 1,6 mmol). Le milieu est chauffé à reflux du solvant et agité pendant la nuit. Le THF est ensuite éliminé sous vide et le résidu est repris avec EtOAc. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le produit attendu **66** (5,32 g ; 73 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 9:1 à 8:2).

R_f = 0,42 (Et₂O 10:0) ; révélateur : PMA.

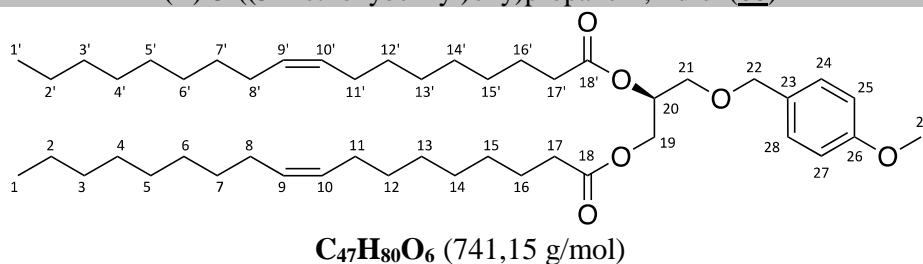
RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 1,35 (s ; 3H₁) ; 1,41 (s ; 3H₂) ; 3,41-3,54 (m ; 2H₆) ; 3,70-4,06 (m ; 2H₄) ; 3,80 (s ; 3H₁₄) ; 4,27 (m ; 1H₅) ; 4,49 (m ; 2H₇) ; 6,87 (d ; *J* = 8,4 Hz ; 2H_{10,12}) ; 7,25 (d ; *J* = 8,4 Hz ; 2H_{9,13}).

(S)-3-((3-methoxybenzyl)oxy)propane-1,2-diyl dioleate (67)

Le produit **66** (5,32 g ; 21,08 mmol) est dissous dans un mélange acide acétique/H₂O (80 % ; 25 mL) et le milieu réactionnel est chauffé à 80 °C et agité pendant la nuit. Le milieu est concentré sous vide à l'aide de toluène. Le produit attendu **67** (2,8 g ; 62 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EtOAc 10:0).

$R_f = 0,36$ (EtOAc 10:0) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 3,49-3,81 (m ; 2H₁, 1H₂, 2H₃) ; (s ; 3H₁₁) ; 4,48 (s ; 2H₄) ; 6,88 (d ; $J = 8,4$ Hz ; 2H_{7,9}) ; 7,25 (d ; $J = 8,4$ Hz ; 2H_{6,10}).

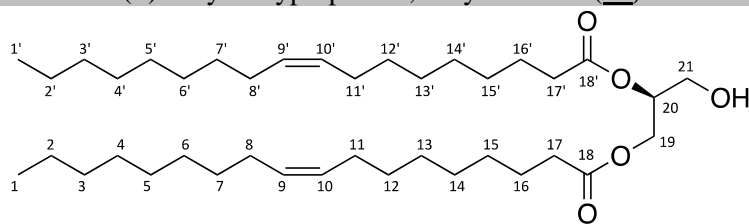
(R)-3-((3-methoxybenzyl)oxy)propane-1,2-diol (68)

De la pyridine (2,34 mL ; 28,4 mmol) est ajoutée au produit **67** (2,8 g ; 13,2 mmol) en solution dans le THF anhydre (100 mL), à 0 °C et sous argon. Le chlorure d'oléoyle (9,28 mL ; 28,4 mmol) est ensuite additionnée goutte à goutte au mélange précédent. Le milieu réactionnel est réchauffé à température ambiante et agité toute la nuit, puis il est décomposé par addition de méthanol (quelques gouttes) et concentré sous vide. Le produit attendu **68** (5,7 g ; 58 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (EP/Et₂O 10:0 à 9:1).

$R_f = 0,24$ (EP/Et₂O 9:1) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 40H_{2-7,2'-7',12-15,12'-15'}) ; 1,60 (m ; 4H_{16,16'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,27 (t ; $J = 8,1$ Hz ; 2H₁₇) ; 2,31 (t ; $J = 7,8$ Hz ; 2H_{17'}) ; 3,55 (m ; 2H₂₁) ; 3,80 (s ; 3H₂₉) ; 4,13-4,35 (m ; 2H₁₉) ; 4,46 (m ; 2H₂₂) ; 5,22 (m ; 1H₂₀) ; 5,34 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 6,87 (d ; $J = 8,4$ Hz ; 2H_{25,27}) ; 7,23 (d ; $J = 8,4$ Hz ; 2H_{24,28}).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,2 (2C_{1,1'}) ; 22,8 (2C_{2,2'}) ; 25,1 (2C_{16,16'}) ; 27,3 (2C_{8,8'}) ; 27,4 (2C_{11,11'}) ; 29,3 (5C) ; 29,5 (5C) ; 29,7 (2C) ; 29,9 (2C) ; 29,9 (2C) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 34,2 (C₁₇) ; 34,3 (C_{17'}) ; 55,4 (C₂₉) ; 62,9 (C₁₉) ; 68,1 (C₂₁) ; 70,2 (C₂₀) ; 73,1 (C₂₂) ; 114,0 (2C_{25,27}) ; 123,4 (C₂₃) ; 129,4 (2C_{24,28}) ; 129,8 (2C_{9,9'}) ; 130,2 (2C_{10,10'}) ; 161,6 (C₂₆) ; 173,0 (C₁₈) ; 173,4 (C_{18'}).

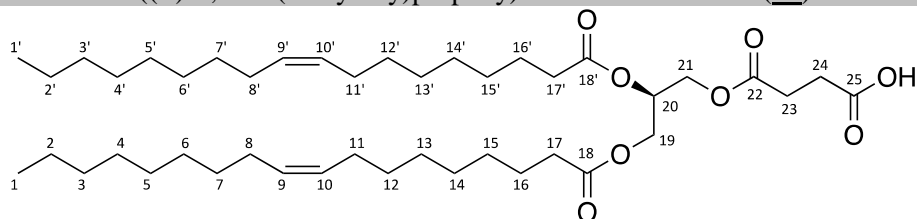
(S)-3-hydroxypropane-1,2-diyl dioleate (69)**C₃₉H₇₂O₅** (621,00 g/mol)

De la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ ; 153 mg ; 0,7 mmol) est ajoutée, en deux portions espacées de 30 minutes d'agitation, à température ambiante au produit **68** (500 mg ; 0,685 mmol) en solution dans un mélange de CH₂Cl₂ (10 mL) et H₂O (quelques gouttes). Le milieu réactionnel est agité pendant 5h, puis filtré sur célite et concentré sous vide. Le produit attendu **69** (310 mg ; 73 %) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/Et₂O 10:0 à 9:1).

R_f = 0,6 (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; *J* = 6,4 Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 40H_{2-7,2'-7',12-15,12'-15'}) ; 1,60 (m ; 4H_{16,16'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,33 (t ; *J* = 7,6 Hz ; 2H₁₇) ; 2,34 (t ; *J* = 7,6 Hz ; 2H_{17'}) ; 3,73 (m ; 2H₂₁) ; 4,21-4,34 (m ; 2H₁₉) ; 5,08 (m ; 1H₂₀) ; 5,34 (m ; 4H_{9,9',10,10'}).

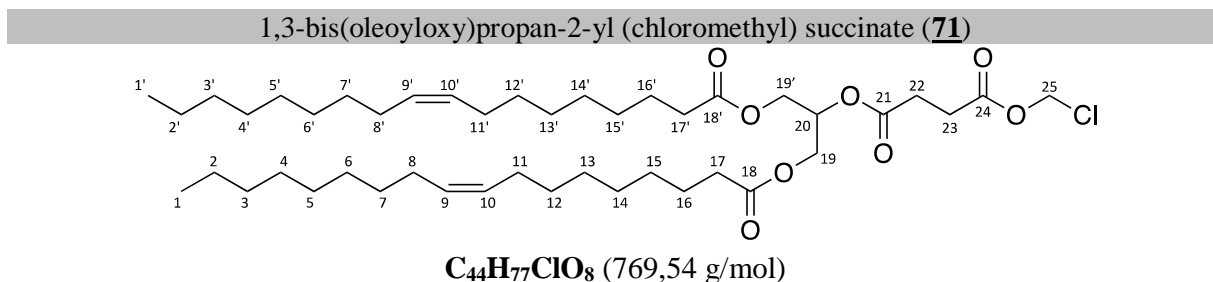
IR ν_{max} : 514 ; 596 ; 607 ; 722 ; 757 ; 831 ; 1027 ; 1107 ; 1158 ; 1214 ; 1258 ; 1313 ; 1461 ; 1510 ; 1578 ; 1598 ; 1698 ; 1740 ; 2852 ; 2923.

4-((R)-2,3-bis(oleoyloxy)propoxy)-4-oxobutanoic acid (70)**C₄₃H₇₆O₈** (721,07 g/mol)

De l'anhydride succinique (310 mg ; 3 mmol) est ajoutée au produit **69** (900 mg ; 1,44 mmol) en solution dans le THF anhydre (10 mL), à température ambiante et sous argon. De la triéthylamine (1,20 mL ; 8,64 mmol) est ensuite additionnée au mélange précédent et le milieu réactionnel est chauffé à reflux du solvant pendant la nuit. Le milieu est ensuite concentré sous vide, puis repris dans le AcOEt, lavé par une solution de HCl à 10 %, séché sur MgSO₄, filtré et à nouveau concentré sous vide. Le produit **70** (715 mg ; 69 %) est engagé dans la suite de la réaction sans purification supplémentaire.

R_f = 0,2 (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl_3) : 0,88 (t ; $J = 6,4$ Hz ; $6\text{H}_{1,1'}$) ; 1,26 (m ; $40\text{H}_{2-7,2'-7',12-15,12'-15'}$) ; 1,60 (m ; $4\text{H}_{16,16'}$) ; 2,00 (m ; $8\text{H}_{8,8',11,11'}$) ; 2,31 (t ; $J = 7,3$ Hz ; 2H_{17}) ; 2,32 (t ; $J = 7,3$ Hz ; $2\text{H}_{17'}$) ; 2,67 (m ; $4\text{H}_{23,24}$) ; 4,11-4,34 (m ; $4\text{H}_{19,21}$) ; 5,26 (m ; 1H_{20}) ; 5,34 (m ; $4\text{H}_{9,9',10,10'}$).



Le produit **71** (33 mg) est obtenu comme sous-produit de réaction lors de la préparation du composé **55**. Il est le résultat d'une isomérisation du centra symétrique du composé **69**.

Les différences structurales entre les composés avec une isomérisation *sn*-1,2 ou *rac*-1,3 sont assez caractéristiques. En effet, les deux diolelylglycérols (le *sn*-1,2 **69** en rose et le *rac*-1,3 en bleu) présentent la signature attendue pour ces motifs.³⁵⁵ La difficulté d'isoler la totalité du produit désiré conduit à l'obtention d'un mélange des deux acides diglycérosucciniques possibles, avec l'acide *sn*-1,2-diolelylglycérosuccinique souhaité (**70** en vert Majo) majoritairement représenté par rapport à l'acide *rac*-1,3-diolelylglycérosuccinique non désiré (en vert mino). La chlorométhylation de ce mélange conduit finalement à deux esters (le produit désiré **55** en noir et l'actuel sous-produit **71** en rouge) séparables et qui sont bien distincts en RMN du ^1H et du ^{13}C (Figure 95 et Figure 96). Les analyses de ce composé sont données à la suite des deux figures.

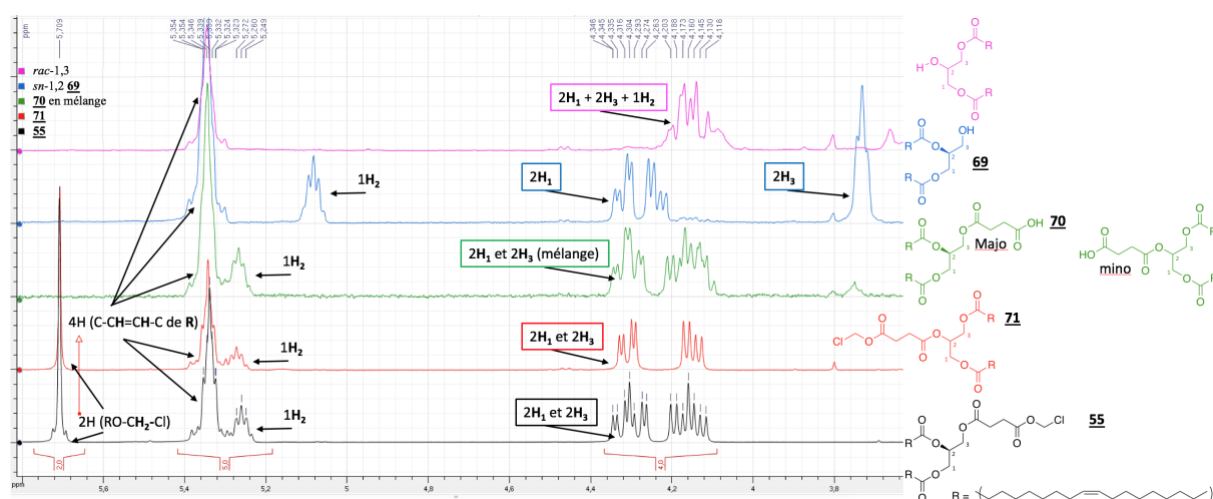


Figure 95. Caractérisation en ^1H RMN des isomères **55** (désiré) et **71** (non désiré), séparés par chromatographie.

En effet, la structure chimique symétrique du produit secondaire **71** (issu de l'isomérisation) conduit à des signaux avec une multiplicité moins complexe que pour le composé chiral **55**. En RMN du ^{13}C , cette symétrie induit une superposition des signaux des carbonyles des chaînes oléyle, ainsi que ceux du motif glycérol (le C_{21} de **55** devient alors le C_{19} de **71**).

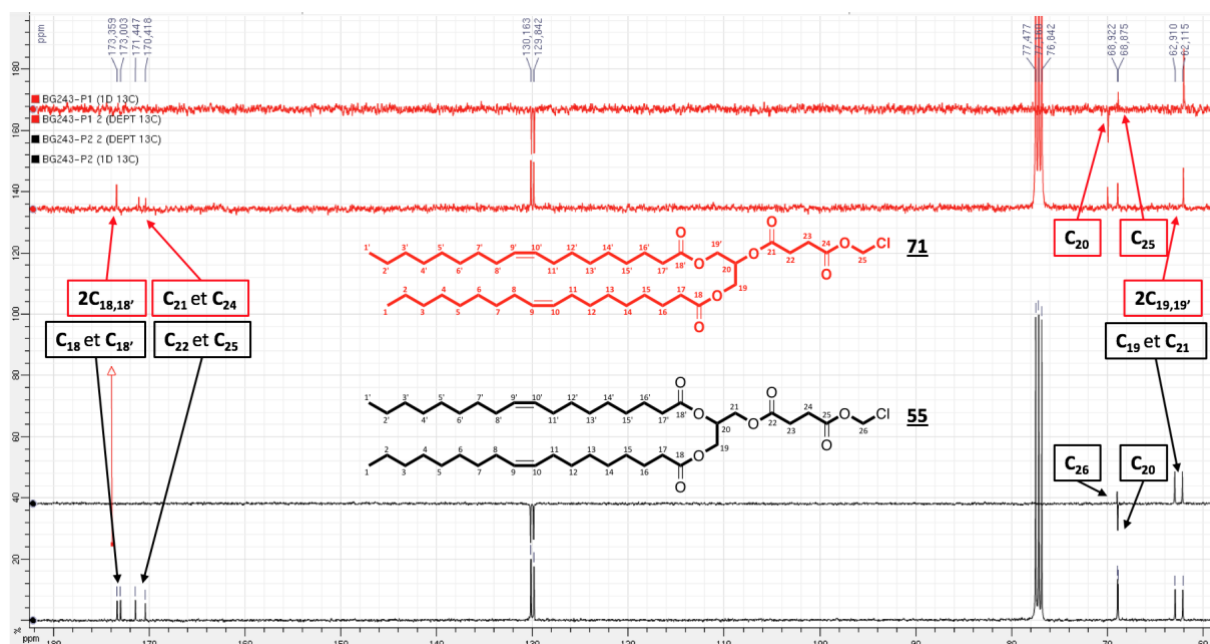


Figure 96. Caractérisation en ^{13}C RMN des isomères **55** (désiré) et **71** (non désiré), séparés par chromatographie.

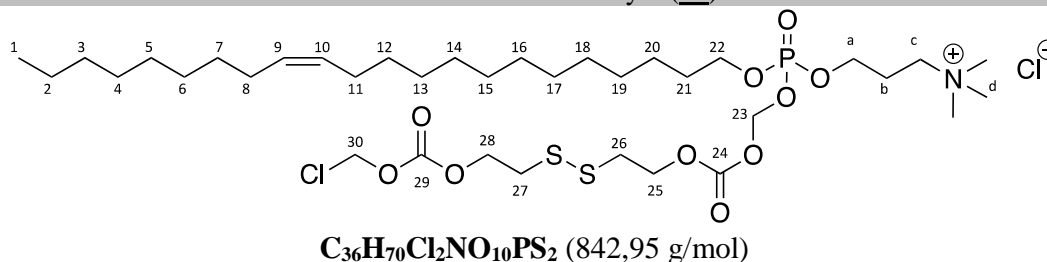
$R_f = 0,65$ (EP/Et₂O 1:1) ; révélateur : PMA.

RMN ^1H δ (400 MHz ; CDCl₃) : 0,88 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 6H_{1,1'}) ; 1,26 (m ; 40H_{2-7,2'-7',12-15,12'-15'}) ; 1,60 (m ; 4H_{16,16'}) ; 2,00 (m ; 8H_{8,8',11,11'}) ; 2,31 (t ; $J = 7,4$ Hz ; 4H_{17,17'}) ; 2,70 (m ; 4H_{22,23}) ; 4,12-4,33 (m ; 4H_{19,19'}) ; 5,26 (m ; 1H₂₀) ; 5,34 (m ; 4H_{9,9',10,10'}) ; 5,71 (s ; 2H₂₅).

RMN ^{13}C δ (100,7 MHz ; CDCl₃) : 14,2 (2C_{1,1'}) ; 22,8 (2C_{2,2'}) ; 25,0 (2C_{16,16'}) ; 27,3 (2C_{8,8'}) ; 27,4 (2C_{11,11'}) ; 28,7 (C₂₂) ; 29,0 (C₂₃) ; 29,3 (6C) ; 29,5 (4C) ; 29,7 (2C) ; 29,9 (2C) ; 29,9 (2C) ; 32,1 (2C_{3,3'}) ; 34,2 (2C_{17,17'}) ; 62,0 (2C_{19,19'}) ; 68,9 (C₂₅) ; 70,0 (C₂₀) ; 129,8 (2C_{9,9'}) ; 130,2 (2C_{10,10'}) ; 170,4 (C₂₁) ; 171,1 (C₂₄) ; 173,4 (2C_{18,18'}).

IR ν_{max} : 721 ; 1002 ; 1020 ; 1130 ; 1162 ; 1367 ; 1463 ; 1741 ; 2852 ; 2921.

Pro-érufosine mono alkylé (**72**)



Le produit **72** (66 mg) a été obtenu comme produit secondaire lors de la préparation du composé **58**.

Ce composé est donc le résultat d'une seule *O*-alkylation de l'érufosine par le précurseur électrophile homobifonctionnel. Le motif carbonate de chlorométhyle étant toujours fonctionnel, des tentatives d'une seconde *O*-alkylation de l'érufosine ont été réalisées avec ce composé, en vain.

$R_f = 0,41$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,86 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁) ; 1,26 (m ; 30H_{2-7,12-20}) ; 1,68 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,20 (m ; 2H_b) ; 3,00 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₇) ; 3,01 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₆) ; 3,17 (s ; 9H_d) ; 3,51 (m ; 2H_c) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,21 (m ; 2H_a) ; 4,46 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₈) ; 4,47 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₅) ; 5,31 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,65 (m ; 2H₂₃) ; 5,76 (s ; 2H₃₀).

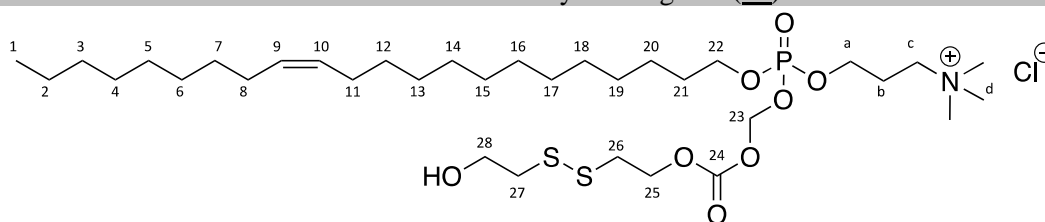
RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (C₁) ; 23,4 (C₂) ; 24,8 (C_b) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,9 ; 30,0 (3C) ; 30,3 (3C) ; 30,4 (3C) ; 30,5 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (C₃) ; 37,4 (2C_{26,27}) ; 53,8 (3C_d) ; 64,4 (C_c) ; 65,7 (C_a) ; 67,1 (C₂₅) ; 67,3 (C₂₈) ; 70,1 (C₂₂) ; 73,2 (C₃₀) ; 86,7 (C₂₃) ; 130,5 (C₉) ; 130,6 (C₁₀) ; 154,1 (C₂₉) ; 154,3 (C₂₄).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,1.

IR ν_{\max} : 490 ; 719 ; 785 ; 859 ; 883 ; 944 ; 1014 ; 1156 ; 1252 ; 1380 ; 1465 ; 1764 ; 2852 ; 2921 ; 3373.

HR-MS (ESI⁺) m/z : 806,3890 [M-Cl]⁺ trouvée ; 806,3862 calculée pour (C₃₆H₇₀ClNO₁₀PS₂⁺).

Pro-érufosine mono alkylé et dégradé (**73**)



C₃₄H₆₉ClNO₈PS₂ (750,47 g/mol)

Le produit **73** (15 mg) a été obtenu comme sous-produit de réaction lors de la préparation du composé **58**. Ce composé est également obtenu lorsqu'une seconde *O*-alkylation de l'érufosine est tenté à partir du produit **72**, à l'aide d'un excès d'érufosine (*vide supra*).

$R_f = 0,35$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75:22:3) ; révélateur : PMA.

RMN ¹H δ (400 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 0,84 (t ; $J = 6,8$ Hz ; 3H₁) ; 1,27 (m ; 30H_{2-7,12-20}) ; 1,69 (tt ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₁) ; 2,00 (m ; 4H_{8,11}) ; 2,20 (m ; 2H_b) ; 2,85 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₇) ; 2,98 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₆) ; 3,18 (s ; 9H_d) ; 3,51 (m ; 2H_c) ; 3,79 (t ; $J = 6,4$ Hz ; 2H₂₈) ; 4,09 (td ; $J_1 = J_2 = 6,8$ Hz ; 2H₂₂) ; 4,21 (m ; 2H_a) ; 4,48 (t ; $J = 6,2$ Hz ; 2H₂₅) ; 5,31 (m ; 2H_{9,10}) ; 5,65 (m ; 2H₂₃).

RMN ¹³C δ (100,7 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : 14,5 (C₁) ; 23,4 (C₂) ; 24,7 (C_b) ; 26,1 (C₂₀) ; 27,8 (2C_{8,11}) ; 29,9 ; 30,0 (3C) ; 30,3 (3C) ; 30,4 (3C) ; 30,5 (2C) ; 30,9 (C₂₁) ; 32,6 (C₃) ; 37,4 (2C_{26,27}) ; 53,8 (3C_d) ; 59,0 (C₂₈) ; 64,4 (C_c) ; 65,7 (C_a) ; 67,3 (C₂₅) ; 70,0 (C₂₂) ; 87,2 (C₂₃) ; 130,5 (C₉) ; 130,6 (C₁₀) ; 154,3 (C₂₄).

RMN ³¹P δ (162 MHz ; MeOD 1:1 CDCl₃) : - 3,1.

IR ν_{\max} : 490 ; 721 ; 785 ; 859 ; 944 ; 969 ; 1014 ; 1156 ; 1255 ; 1466 ; 1765 ; 2852 ; 2921 ; 3359.

HR-MS (ESI⁺) m/z : 714,4219 [M-Cl]⁺ trouvée ; 714,4197 calculée pour (C₃₄H₆₉NO₈PS₂⁺).

Références bibliographiques

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *The hallmarks of cancer*. Cell **2000**, *100*, 57.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell **2011**, *144*, 646.
3. Stewart, B. W.; Wild, C. *World Cancer Report 2014*; 2014.
4. *Les cancers en France*. INCa **2018**.
5. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, 1. publ.; World Cancer Research Fund International, American Institute for Cancer Research, Eds.; AICR: Washington, DC, 2007.
6. *Nutrition et prévention primaire des cancers : actualisation des données*. INCa **2015**.
7. Lasserre, A.; Gaillot, J.; Deutsch, A.; Chauvet, C.; Bessette, D.; Ancellin, R. *Prévention des cancers en France : quel rôle pour les professionnels de santé ?* Bull. Cancer (Paris) **2017**, *104*, 237.
8. Gérard, J.-P.; Thariat, J.; Giraud, P.; Cosset, J. M. *Histoire de l'évolution des techniques de radiothérapie*. Bull. Cancer (Paris) **2010**, *97*, 743.
9. Suci, D. *Cellular death by apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues*. Journal of theoretical biology. J. Theor. Biol. **1983**, *105*, 391–401.
10. Weber, D. C.; Abrunhosa-Branquinho, A.; Bolsi, A.; Kacperek, A.; Dendale, R.; Geismar, D.; Bachtary, B.; Hall, A.; Heufelder, J.; Herfarth, K.; et al. *Profile of european proton and carbon ion therapy centers assessed by the EORTC facility questionnaire*. Radiother. Oncol. **2017**, *124*, 185.
11. Pommier, P.; Hu, Y.; Baron, M.-H.; Chapet, O.; Balosso, J. *L'hadronthérapie: les ions carbone*. Bull. Cancer (Paris) **2010**, *97*, 819.
12. Mazal, A.; Habrand, J.-L.; Delacroix, S.; Datchary, J.; Dendale, R.; Desjardins, L.; Ferrand, R.; Malka, V.; Fourquet, A. *La protonthérapie: bases, indications et nouvelles technologies*. Bull. Cancer (Paris) **2010**, *97*, 831.
13. Thariat, J.; Habrand, J. L.; Lesueur, P.; Chaikh, A.; Kammerer, E.; Lecomte, D.; Batalla, A.; Balosso, J.; Tessonier, T. *Apports de la protonthérapie à la radiothérapie d'aujourd'hui, pourquoi, comment ?* Bull. Cancer (Paris) **2018**, *105*, 315.
14. Silvestri, I.; Cattarino, S.; Giantulli, S.; Nazzari, C.; Collalti, G.; Sciarra, A. *A perspective of immunotherapy for prostate cancer*. Cancers **2016**, *8*, 64.
15. Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R. A. *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*. Nat. Rev. Cancer **2008**, *8*, 193.
16. Ma, W. W.; Adjei, A. A. *Novel agents on the horizon for cancer therapy*. CA. Cancer J. Clin. **2009**, *59*, 111.
17. Sugiura, Y. *Bleomycin-iron complexes. Electron spin resonance study, ligand effect, and implication for action mechanism*. J. Am. Chem. Soc. **1980**, *102*, 5208.
18. Rancoule, C.; Guy, J.-B.; Vallard, A.; Ben Mrad, M.; Rehailia, A.; Magné, N. *Les 50 ans du cisplatine*. Bull. Cancer (Paris) **2017**, *104*, 167.
19. Ikegami, S.; Taguchi, T.; Ohashi, M.; Oguro, M.; Nagano, H.; Mano, Y. *Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α* . Nature **1978**, *275*, 458.
20. Swann, P. F.; Waters, T. R.; Moulton, D. C.; Xu, Y.-Z.; Zheng, Q.; Edwards, M.; Mace, R. *Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine*. Science **1996**, *273*, 1109.
21. Carpenter, G.; Cohen, S. *Epidermal growth factor*. J. Biol. Chem. **1990**, *265*, 7709.
22. Hudis, C. A. *Trastuzumab — mechanism of action and use in clinical practice*. N. Engl. J. Med. **2007**, *357*, 39.
23. Folkman, J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N. Engl. J. Med. **1971**, *285*, 1182.
24. Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J. Clin. Oncol. **2005**, *23*, 1011.
25. Sun, J.; Wei, Q.; Zhou, Y.; Wang, J.; Liu, Q.; Xu, H. *A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs*. BMC Syst. Biol. **2017**, *11*, 87.
26. Rusconi, P.; Caiola, E.; Brogгинi, M. *RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology*. Curr. Med. Chem. **2012**, *19*, 1164.
27. Liu, F.; Yang, X.; Geng, M.; Huang, M. *Targeting ERK, an Achilles' heel of the MAPK*

- pathway, in cancer therapy. Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8*, 552.
28. Devita, V. T.; Young, R. C.; Canellos, G. P. *Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. Cancer* **1975**, *35*, 98.
 29. Pujade-Lauraine, E.; Hilpert, F.; Weber, B.; Reuss, A.; Poveda, A.; Kristensen, G.; Sorio, R.; Vergote, I.; Witteveen, P.; Bamias, A.; et al. *Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: the AURELIA open-label randomized phase III trial. J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1302.
 30. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. *Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714.
 31. Longley, D.; Johnston, P. *Molecular mechanisms of drug resistance. J. Pathol.* **2005**, *205*, 275.
 32. Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. *Liposomal formulations in clinical use: an updated review. Pharmaceutics* **2017**, *9*, 12.
 33. Kemp, J. A.; Shim, M. S.; Heo, C. Y.; Kwon, Y. J. "Combo" nanomedicine: co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *98*, 3.
 34. Bergenheim, B.; Fahraeus, R. *Über spontane hämolysinbildung im blut unter besonderer berücksichtigung der physiologie der milz. Z. Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir.* **1936**, *97*, 555.
 35. Munder, P. G.; Modolell, M. *Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. Int. Arch. Allergy Immunol.* **1973**, *45*, 133.
 36. Munder, P. G.; Ferber, E.; Modolell, M.; Fischer, H. *The influence of various adjuvants on the metabolism of phospholipids in macrophages. Int. Arch. Allergy Immunol.* **1969**, *36*, 117.
 37. Mulder, E.; Van Deenen, L. L. M. *Metabolism of red-cell lipids I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *106*, 106.
 38. Eibl, H.; Arnold, D.; Weltzien, H. U.; Westphal, O. *Synthesen von cholinphosphatiden, I. Zur synthese von α - und β -lecithinen und ihren ätheranaloga. Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *709*, 226.
 39. Arnold, D.; Weltzien, H. U.; Westphal, O. *Synthesen von cholinphosphatiden, III. Über die synthese von lysolecithinen und ihren ätheranaloga. Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *709*, 234.
 40. Weltzien, H. U.; Westphal, O. *Synthesen von cholinphosphatiden, IV. O-methylierte und O-acetylierte lysolecithine. Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *709*, 240.
 41. Andreesen, R.; Modolell, M.; Weltzien, H. U.; Eibl, H.; Common, H. H.; Löhr, G. W.; Munder, P. G. *Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids. Cancer Res.* **1978**, *38*, 3894.
 42. Munder, P. G.; Modolell, M.; Andreesen, R.; Weltzien, H. U.; Westphal, O. *Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects. Springer Semin. Immunopathol.* **1979**, *2*, 187.
 43. Runge, M. H.; Andreesen, R.; Pfeleiderer, A.; Munder, P. G. *Destruction of human solid tumors by alkyl lysophospholipids. J. Natl. Cancer Inst.* **1980**, *64*, 1301.
 44. Mollinedo, F.; Fernández-Luna, J. L.; Gajate, C.; Martín-Martín, B.; Benito, A.; Martínez-Dalmau, R.; Modolell, M. *Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. Cancer Res.* **1997**, *57*, 1320.
 45. Berger, M. R.; Munder, P. G.; Schmähl, D.; Westphal, O. *Influence of the alkyl lysophospholipid ET-18-OCH₃ on methylnitrosourea-induced rat mammary carcinomas. Oncology* **1984**, *41*, 109.
 46. Berdel, W. E.; Fink, U.; Rastefler, J. *Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃. Lipids* **1987**, *22*, 967.
 47. Vogler, W. R.; Berdel, W. E.; Olson, A. C.; Winton, E. F.; Heffner, L. T.; Gordon, D. S. *Autologous bone marrow transplantation in acute leukemia with marrow purged with alkyl-lysophospholipid. Blood* **1992**, *80*, 1423.

48. Vogler, W. R.; Berdel, W. E.; Geller, R. B.; Brochstein, J. A.; Beveridge, R. A.; Dalton, W. S.; Miller, K. B.; Lazarus, H. M. *A Phase II trial of autologous bone marrow transplantation (ABMT) in acute leukemia with edelfosine purged bone marrow*. In *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2*; Nigam, S., Kunkel, G., Prescott, S. M., Eds.; Springer: Boston, MA, 1996; Vol. 416, p 389.
49. Breiser, A.; Kim, D.-J.; Fleer, E. A. M.; Damenz, W.; drube, A.; Berger, M.; Nagel, G. A.; Eibl, H.; Unger, C. *Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice*. *Lipids* **1987**, *22*, 925.
50. Eibl, H.; Unger, C. *Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug*. *Cancer Treat. Rev.* **1990**, *17*, 233.
51. Yanapirut, P.; Berger, M.; Reinhardt, M.; Schmähl, D. *In vitro investigations on the antineoplastic effect of hexadecylphosphocholine*. *Arzneimittelforschung.* **1991**, *41*, 652.
52. Eibl, H.; Hilgard, P.; Stekar, J.; Voegeli, R.; Harleman, J. H. *Experimental therapeutic studies with miltefosine in rats and mice*. *Prog. Exp. Tumor Res.* **1992**, *34*, 116.
53. Wang, Y. Z.; Liu, X. Y.; Wu, L. J.; Zhang, Y. B.; Hou, L.; Xu, Q. S. *Antiproliferation effects of hexadecylphosphocholine on solid tumour and leukaemia selectively in vitro*. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1997**, *23*, 97.
54. Kötting, J.; Marschner, N. W.; Neumuller, W.; Unger, C.; Eibl, H. *Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution*. *Prog. Exp. Tumor Res.* **1992**, *34*, 131.
55. Kaufmann-Kollea, P.; Fleerb, E. A. M.; Kottunga, J. *Liposomal hexadecylphosphocholine: characterization and effects on adherent tumor cells*. *Journnal Liposome Res.* **1994**, *4*, 1115.
56. Verweij, J.; Krzemieniecki, K.; Kok, T.; Poveda, A.; van Pottelsberghe, C.; van Glabbeke, M.; Mouridsen, H. *Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult — an EORTC soft tissue and bone sarcoma group study*. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29*, 208.
57. Planting, A. S. T.; Stoter, G.; Verweij, J. *Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer*. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29*, 518.
58. Verweij, J.; Planting, A. S. Th.; Stoter, G.; Gandia, D.; Armand, J. P. *Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer*. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29*, 778.
59. Dummer, R.; Krasovec, M.; Röger, J.; Sindermann, H.; Burg, G. *Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, *29*, 963.
60. Unger, C.; Peukert, M.; Sindermann, H.; Hilgard, P.; Nagel, G.; Eibl, H. *Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients*. *Cancer Treat. Rev.* **1990**, *17*, 243.
61. Terwogt, J. M. M.; Mandjes, I. A. M.; Sindermann, H.; Beijnen, J. H.; ten Bokkel Huinink, W. W. *Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer*. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1158.
62. Croft, S. L.; Neal, R. A.; Pendergast, W.; Chan, J. I. *The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633.
63. Calogeropoulou, T.; Angelou, P.; Detsi, A.; Fragiadaki, I.; Scoulica, E. *Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives*. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 897.
64. Hilgard, P.; Klenner, T.; Stekar, J.; Nössner, G.; Kutscher, B.; Engel, J. *D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity*. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 442.
65. Stekar, J.; Hilgard, P.; Voegeli, R.; Maurer, H. R.; Engel, J.; Kutscher, B.; Nösner, G.; Schumacher, W. *Antineoplastic activity and tolerability of a novel heterocyclic alkylphospholipid, D-20133*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1993**, *32*, 437.
66. Hideshima, T.; Catley, L.; Yasui, Hiroshi; Ishitsuka, K.; Raje, N.; Mitsiades, C.; Podar, K.; Munshi, N. C.; Chauhan, D.; et al. *Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells*. *Blood* **2006**, *107*, 4053.

67. Vink, S. R.; Schellens, J. H. M.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. *Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid*. Invest. New Drugs **2005**, *23*, 279.
68. Crul, M.; Rosing, H.; de Klerk, G. J.; Dubbelman, R.; Traiser, M.; Reichert, S.; Knebel, N. G.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; ten Bokkel Huinink, W. W. *Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours*. Eur. J. Cancer **2002**, *38*, 1615.
69. van Ummersen, L.; Binger, K.; Volkman, J.; Marnocha, R.; Tutsch, K.; Kolesar, J.; Arzoomanian, R.; Alberti, D.; Wilding, G. *A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer*. Clin. Cancer Res. **2004**, *10*, 7450.
70. Leighl, N. B.; Dent, S.; Clemons, M.; Vandenberg, T. A.; Tozer, R.; Warr, D. G.; Crump, R. M.; Hedley, D.; Pond, G. R.; Dancey, J. E.; et al. *A Phase II study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res. Treat. **2008**, *108*, 87.
71. Argiris, A.; Cohen, E.; Karrison, T.; Esparaz, B.; Mauer, A.; Ansari, R.; Wong, S.; Lu, Y.; Pins, M.; Dancey, J.; et al. *A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer*. Cancer Biol. Ther. **2006**, *5*, 766.
72. Posadas, E. M.; Gulley, J. L.; Arlen, P. M.; Trout, A.; Parnes, H. L.; Wright, J.; Lee, M.-J.; Chung, E. J.; Trepel, J. B.; Sparreboom, A.; et al. *A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer*. Cancer Biol. Ther. **2005**, *4*, 1133.
73. Ernst, D. S.; Eisenhauer, E.; Wainman, N.; Davis, M.; Lohmann, R.; Baetz, T.; Belanger, K.; Smylie, M. *Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma*. Invest. New Drugs **2005**, *23*, 569.
74. Verheij, M.; H Moolenaar, W.; J van Blitterswijk, W. *Combining anti-tumor alkyl-phospholipid analogs and radiotherapy: rationale and clinical outlook*. Anticancer Agents Med. Chem. **2014**, *14*, 618.
75. Cirstea, D.; Hideshima, T.; Rodig, S.; Santo, L.; Pozzi, S.; Vallet, S.; Ikeda, H.; Perrone, G.; Gorgun, G.; Patel, K.; et al. *Dual inhibition of Akt/mammalian target of rapamycin pathway by nanoparticle albumin-bound-rapamycin and perifosine induces antitumor activity in multiple myeloma*. Mol. Cancer Ther. **2010**, *9*, 963.
76. Eibl, H. *Neue eucyl-, brassidyl- und nervonylderivate*. EP0507337 A2, April 3, 1992.
77. Berger, M.; Sobottka, S.; Konstantinov, S. M.; Eibl, H. *Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines*. Drugs Today **1998**, *34*, 73.
78. Kötting, J.; Berger, M. R.; Unger, C.; Eibl, H. *Alkylphosphocholines: influence of structural variation on biodistribution at antineoplastically active concentrations*. Cancer Chemother. Pharmacol. **1992**, *30*, 105.
79. Eibl, H.; Kaufmann-Kolle, P. *Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs*. J. Liposome Res. **1995**, *5*, 131.
80. Erdlenbruch, B.; Jendrossek, V.; Gerriets, A.; Vetterlein, F.; Eibl, H.; Lakomek, M. *Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration*. Cancer Chemother. Pharmacol. **1999**, *44*, 484.
81. Jendrossek, V.; Erdlenbruch, B.; Hunold, A.; Kugler, W.; Eibl, H.; Lakomek, M. *Erucylphosphocholine, a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines in vitro*. Int. J. Oncol. **1999**, *14*, 15.
82. Dineva, I. K.; Zaharieva, M. M.; Konstantinov, S. M.; Eibl, H.; Berger, M. R. *Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **2012**, *138*, 1909.
83. Konstantinov, S. M.; Berger, M. R. *Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines*. Cancer Lett. **1999**, *144*, 153.
84. Königs, S. K.; Pallasch, C. P.; Lindner, L. H.; Schwamb, J.; Schulz, A.; Brinker, R.; Claasen, J.; Veldurthy, A.; Eibl, H.; Hallek, M.; et al. *Erufosine, a novel alkylphosphocholine, induces apoptosis in CLL through a caspase-dependent pathway*. Leuk. Res. **2010**, *34*, 1064.
85. Jendrossek, V.; Hammersen, K.; Erdlenbruch, B.; Kugler, W.; Krügener, R.; Eibl, H.; Lakomek, M. *Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives:*

- antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *50*, 71.
86. Lindner, L.; Eibl, H.; Hossann, M.; Vogeser, M. *Quantification of erufosine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, in human plasma by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a deuterated internal standard*. *J. Chromatogr. B* **2008**, *869*, 16.
 87. Fiegl, M.; Lindner, L. H.; Juergens, M.; Eibl, H.; Hiddemann, W.; Braess, J. *Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *62*, 321.
 88. Yosifov, D. Y.; Konstantinov, S. M.; Berger, M. R. *Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium shows substantial cytotoxicity in multiple myeloma cells*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 350.
 89. Kostadinova, A.; Topouzova-Hristova, T.; Momchilova, A.; Tzoneva, R.; Berger, M. R. *Antitumor lipids — structure, functions, and medical applications*. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Elsevier, 2015; Vol. 101, p 27.
 90. de Almeida Pachioni, J.; Magalhães, J. G.; Lima, E. J. C.; de Moura Bueno, L.; Barbosa, J. F.; de Sá, M. M.; Rangel-Yagui, C. O. *Alkylphospholipids – a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum*. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *16*, 742.
 91. van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. *Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 663.
 92. van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. *Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects*. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2061.
 93. Mollinedo, F.; Fernández, M.; Hornillos, V.; Delgado, J.; Amat-Guerri, F.; Acuña, A. U.; Nieto-Miguel, T.; Villa-Pulgarín, J. A.; González-García, C.; Ceña, V.; et al. *Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria*. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, 158.
 94. Jaffrès, P.-A.; Gajate, C.; Bouchet, A. M.; Couthon-Gourvès, H.; Chantôme, A.; Potier-Cartreau, M.; Besson, P.; Bougnoux, P.; Mollinedo, F.; Vandier, C. *Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy*. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *165*, 114.
 95. Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Gálvez, X.; Jiménez-López, J. M.; Carrasco, M. P. *Alkylphospholipids: an update on molecular mechanisms and clinical relevance*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859*, 1657.
 96. Gajate, C.; Fonteriz, R. I.; Cabaner, C.; Alvarez-Noves, G.; Alvarez-Rodriguez, Y.; Modolell, M.; Mollinedo, F. *Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis*. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 674.
 97. van der Luit, A. H.; Budde, M.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. *Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine*. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 747.
 98. van der Luit, A. H.; Budde, M.; Ruurs, P.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. *Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39541.
 99. Tartakoff, A. M. *Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin*. *Cell* **1983**, *32*, 1026.
 100. van der Luit, A. H.; Vink, S. R.; Klarenbeek, J. B.; Perrissoud, D.; Solary, E.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. *A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells*. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2337.
 101. Vink, S. R.; van der Luit, A. H.; Klarenbeek, J. B.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. *Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells*. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1456.
 102. Muñoz-Martínez, F.; Torres, C.; Castanys, S.; Gamarro, F. *CDC50A plays a key role in the uptake of the anticancer drug perifosine in human carcinoma cells*. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 793.
 103. Muñoz-Martínez, F.; Torres, C.; Castanys, S.; Gamarro, F. *The anti-tumor alkylphospholipid*

- perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells.* Biochim. Biophys. Acta **2008**, 1778, 530.
104. Riekhof, W. R.; Voelker, D. R. *The yeast plasma membrane P4-ATPases are major transporters for lysophospholipids.* Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids **2009**, 1791, 620.
 105. Pérez-Victoria, F. J.; Gamarro, F.; Ouellette, M.; Castanys, S. *Functional cloning of the miltefosine transporter: a novel p-type phospholipid translocase from leishmania involved in drug resistance.* J. Biol. Chem. **2003**, 278, 49965.
 106. Chen, R.; Brady, E.; McIntyre, T. M. *Human TMEM30a promotes uptake of antitumor and bioactive choline phospholipids into mammalian cells.* J. Immunol. **2011**, 186, 3215.
 107. van der Luit, A. H.; Budde, M.; Zerp, S.; Caan, W.; Klarenbeek, J. B.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. *Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts.* Biochem. J. **2007**, 401, 541.
 108. Jiménez-López, J. M.; Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Segovia, J. L.; Carrasco, M. P. *Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids.* Lipids Health Dis. **2010**, 9, 33.
 109. van der Sanden, M. H. M.; Houweling, M.; van Golde, L. M. G.; Vaandrager, A. B. *Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153).* Biochem. J. **2003**, 369, 643.
 110. Testerink, N.; van der Sanden, M. H. M.; Houweling, M.; Helms, J. B.; Vaandrager, A. B. *Depletion of phosphatidylcholine affects endoplasmic reticulum morphology and protein traffic at the Golgi complex.* J. Lipid Res. **2009**, 50, 2182.
 111. Cui, Z.; Houweling, M.; Chen, M. H.; Record, M.; Chap, H.; Vance, D. E.; Tercé, F. *A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in chinese hamster ovary cells.* J. Biol. Chem. **1996**, 271, 14668.
 112. Jiménez-López, J. M.; Carrasco, M. P.; Segovia, J. L.; Marco, C. *Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells.* Eur. J. Biochem. **2002**, 269, 4649.
 113. Vogler, W. R.; Shoji, M.; Hayzer, D. J.; Xie, Y. P.; Renshaw, M. *The effect of edelfosine on CTP:cholinephosphate cytidyltransferase activity in leukemic cell lines.* Leuk. Res. **1996**, 20, 947.
 114. van der Sanden, M. H. M.; Houweling, M.; Duijsings, D.; Vaandrager, A. B.; van Golde, L. M. G. *Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis.* Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids **2004**, 1636, 99.
 115. Boggs, K. P.; Rock, C. O.; Jackowski, S. *Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step.* J. Biol. Chem. **1995**, 270, 7757.
 116. Jiménez-López, J. M.; Carrasco, M. P.; Segovia, J. L.; Marco, C. *Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine synthesis via both the methylation of phosphatidylethanolamine and CDP-choline pathways in HepG2 cells.* Int. J. Biochem. Cell Biol. **2004**, 36, 153.
 117. Sugii, S.; Reid, P. C.; Ohgami, N.; Du, H.; Chang, T.-Y. *Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol.* J. Biol. Chem. **2003**, 278, 27180.
 118. Jiménez-López, J. M.; Carrasco, M. P.; Marco, C.; Segovia, J. L. *Hexadecylphosphocholine disrupts cholesterol homeostasis and induces the accumulation of free cholesterol in HepG2 tumour cells.* Biochem. Pharmacol. **2006**, 71, 1114.
 119. Carrasco, M. P.; Jiménez-López, J. M.; Ríos-Marco, P.; Segovia, J. L.; Marco, C. *Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues.* Br. J. Pharmacol. **2010**, 160, 355.
 120. Kondapaka, S. B.; Singh, S. S.; Dasmahapatra, G. P.; Sausville, E. A.; Roy, K. K. *Perifosine,*

- a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation.* Mol. Cancer Ther. **2003**, *2*, 1093.
121. Bagley, R. G.; Kurtzberg, L.; Rouleau, C.; Yao, M.; Teicher, B. A. *Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells.* Cancer Chemother. Pharmacol. **2011**, *68*, 1537.
 122. Ruiter, G. A.; Zerp, S. F.; Bartelink, H.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. *Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt/PKB survival pathway.* Anticancer. Drugs **2003**, *14*, 167.
 123. Zhou, X.; Lu, X.; Richard, C.; Xiong, W.; Litchfield, D. W.; Bittman, R.; Arthur, G. *1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells.* J. Clin. Invest. **1996**, *98*, 937.
 124. Ruiter, G. A.; Zerp, S. F.; Bartelink, H.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. *Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis.* Cancer Res. **1999**, *59*, 2457.
 125. Gajate, C.; Santos-Beneit, A.; Modolell, M.; Mollinedo, F. *Involvement of c-Jun NH2-terminal kinase activation and c-Jun in the Induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine.* Mol. Pharmacol. **1998**, *53*, 602.
 126. Nieto-Miguel, T.; Fonteriz, R. I.; Vay, L.; Gajate, C.; Lopez-Hernandez, S.; Mollinedo, F. *Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells.* Cancer Res. **2007**, *67*, 10368.
 127. Kugler, W.; Erdlenbruch, B.; Otten, K.; Jendrossek, V.; Eibl, H.; Lakomek, M. *MAP kinase pathways involved in glioblastoma response to erucylphosphocholine.* Int. J. Oncol. **2004**, *25*, 1721.
 128. Krammer, P. H. *The CD95 (APO-1/Fas) CD95L system.* Toxicol. Lett. **1998**, *102*, 131.
 129. Faustino Mollinedo; Consuelo Gajate; Sonsoles Martin-Santamaria and Federico Gago. *ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor.* Curr. Med. Chem. **2004**, *11*, 3163.
 130. Gajate, C.; Mollinedo, F. *Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts.* Blood **2007**, *109*, 711.
 131. Cuvillier, O.; Mayhew, E.; Janoff, A. S.; Spiegel, S. *Liposomal ET-18-OCH3 induces cytochrome c-mediated apoptosis independently of CD95 (APO-1/Fas) signaling.* Blood **1999**, *94*, 3583.
 132. Gajate, C.; del Canto-Jañez, E.; Acuña, A. U.; Amat-Guerri, F.; Geijo, E.; Santos-Beneit, A. M.; Veldman, R. J.; Mollinedo, F. *Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis.* J. Exp. Med. **2004**, *200*, 353.
 133. van Blitterswijk, W. J.; Klarenbeek, J. B.; van der Luit, A. H.; Alderliesten, M. C.; van Lummel, M.; Verheij, M. *Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyl-lysophospholipid resistance: partial role of associated sphingomyelin deficiency.* Biochem. J. **2010**, *425*, 225.
 134. Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. *Another way to die: autophagic programmed cell death.* Cell Death Differ. **2005**, *12*, 1528.
 135. Singh, R.; Kaushik, S.; Wang, Y.; Xiang, Y.; Novak, I.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Cuervo, A. M.; Czaja, M. J. *Autophagy regulates lipid metabolism.* Nature **2009**, *458*, 1131.
 136. Fu, L.; Kim, Y.-A.; Wang, X.; Wu, X.; Yue, P.; Lonial, S.; Khuri, F. R.; Sun, S.-Y. *Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy.* Cancer Res. **2009**, *69*, 8967.
 137. Kapoor, V.; Zaharieva, M. M.; Das, S. N.; Berger, M. R. *Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt–mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma.* Cancer Lett. **2012**, *319*, 39.
 138. Ríos-Marco, P.; Martín-Fernández, M.; Soria-Bretones, I.; Ríos, A.; Carrasco, M. P.; Marco, C. *Alkylphospholipids deregulate cholesterol metabolism and induce cell-cycle arrest and autophagy in U-87 MG glioblastoma cells.* Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids

- 2013**, 1831, 1322.
139. Ríos-Marco, P.; Ríos, A.; Jiménez-López, J. M.; Carrasco, M. P.; Marco, C. *Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines*. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, 96, 10.
 140. Nieto-Miguel, T.; Gajate, C.; Mollinedo, F. *Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells*. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 14833.
 141. Mollinedo, F.; Martinezdalmau, R.; Modolell, M. *Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH₃*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 603.
 142. Diomedede, L.; Colotta, F.; Piovani, B.; Re, F.; Modest, E. J.; Salmona, M. *Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action*. *Int. J. Cancer* **1993**, 53, 124.
 143. Rudner, J.; Ruiner, C.-E.; Handrick, R.; Eibl, H.; Belka, C.; Jendrossek, V. *The Akt-inhibitor erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation*. *Radiat. Oncol.* **2010**, 5, 108.
 144. Rübél, A.; Handrick, R.; Lindner, L. H.; Steiger, M.; Eibl, H.; Budach, W.; Belka, C.; Jendrossek, V. *The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro*. *Radiat. Oncol.* **2006**, 1, 6.
 145. Vink, S. R.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sindermann, H.; Engel, J.; Dubbelman, R.; Moppi, G.; Hillebrand, M. J. X.; Bartelink, H.; Verheij, M. *Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours*. *Radiother. Oncol.* **2006**, 80, 207.
 146. Verheij, M.; Karchmit, Y.; Bakardjiev, S.; Beliaukouski, V.; Savu, M.; Smickoska, S.; Sindermann, H.; Markivskyy, A. *Daily oral perifosine in combination with radiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer: first results of a randomized double-blind, placebo-controlled multicenter phase II study*. *Radiother. Oncol.* **2010**, 96, 167.
 147. Thakur, A.; Joshi, N.; Shanmugam, T.; Banerjee, R. *Proapoptotic miltefosine nanovesicles show synergism with paclitaxel: implications for glioblastoma multiforme therapy*. *Cancer Lett.* **2013**, 334, 274.
 148. Bendell, J. C.; Nemunaitis, J.; Vukelja, S. J.; Hagenstad, C.; Campos, L. T.; Hermann, R. C.; Sportelli, P.; Gardner, L.; Richards, D. A. *Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer*. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 4394.
 149. <https://www.medscape.com/viewarticle/719787> (consulté le 22, Feb 2019).
 150. Orłowski, R. Z. *Novel agents for multiple myeloma to overcome resistance in phase III clinical trials*. *Semin. Oncol.* **2013**, 40, 634.
 151. Ginn, S. L.; Amaya, A. K.; Alexander, I. E.; Edelstein, M.; Abedi, M. R. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update*. *J. Gene Med.* **2018**, 20, 3015.
 152. Kaufmann, K. B.; Büning, H.; Galy, A.; Schambach, A.; Grez, M. *Gene therapy on the move*. *EMBO Mol. Med.* **2013**, 5, 1642.
 153. Lin, X.; Huang, H.; Li, S.; Li, H.; Li, Y.; Cao, Y.; Zhang, D.; Xia, Y.; Guo, Y.; Huang, W.; et al. *A phase I clinical trial of an adenovirus-mediated endostatin gene (E10A) in patients with solid tumors*. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, 6, 648.
 154. Ye, W.; Liu, R.; Pan, C.; Jiang, W.; Zhang, L.; Guan, Z.; Wu, J.; Ying, X.; Li, L.; Li, S.; et al. *Multicenter randomized phase II clinical trial of a recombinant human endostatin adenovirus in patients with advanced head and neck carcinoma*. *Mol. Ther.* **2014**, 22, 1221.
 155. Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. *Cell* **2001**, 104, 487.
 156. Wiley, S. R.; Schooley, K.; Smolak, P. J.; Din, W. S.; Huang, C.-P.; Nicholl, J. K.; Sutherland, G. R.; Smith, T. D.; Rauch, C.; Smith, C. A.; et al. *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. *Immunity* **1995**, 3, 673.
 157. Walczak, H.; Miller, R. E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T. S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones,

- J.; Woodward, A.; Le, T.; et al. *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157.
158. Wu, X.; Wang, S.; Li, M.; Wang, A.; Zhou, Y.; Li, P.; Wang, Y. *Nanocarriers for TRAIL delivery: driving TRAIL back on track for cancer therapy*. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13879.
159. Pan, G.; O'Rourke, K.; Chinnaiyan, A. M.; Gentz, R.; Ebner, R.; Ni, J.; Dixit, V. M. *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. *Science* **1997**, *276*, 111.
160. Chaudhary, P. M.; Eby, M.; Jasmin, A.; Bookwalter, A.; Murray, J.; Hood, L. *Death Receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway*. *Immunity* **1997**, *7*, 821.
161. Schug, Z. T.; Gonzalvez, F.; Houtkooper, R. H.; Vaz, F. M.; Gottlieb, E. *BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane*. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 538.
162. Jacquemin, G. *Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses : restauration de la sensibilité à TRAIL par la chimiothérapie conventionnelle ou par un polyphénol, la quercétine*, **2010**.
163. MacFarlane, M.; Inoue, S.; Kohlhaas, S. L.; Majid, A.; Harper, N.; Kennedy, D. B. J.; Dyer, M. J. S.; Cohen, G. M. *Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1*. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 773.
164. Kelley, R. F.; Totpal, K.; Lindstrom, S. H.; Mathieu, M.; Billeci, K.; DeForge, L.; Pai, R.; Hymowitz, S. G.; Ashkenazi, A. *Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2205.
165. Degli-Esposti, M. A.; Smolak, P. J.; Walczak, H.; Waugh, J.; Huang, C.-P.; DuBose, R. F.; Goodwin, R. G.; Smith, C. A. *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1165.
166. Marsters, S. A.; Sheridan, J. P.; Pitti, R. M.; Huang, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Yuan, J.; Gurney, A.; Goddard, A. D.; Godowski, P.; et al. *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 1003.
167. Emery, J. G.; McDonnell, P.; Burke, M. B.; Deen, K. C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E. R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; et al. *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14363.
168. Ehrhardt, H.; Fulda, S.; Schmid, I.; Hiscott, J.; Debatin, K.-M.; Jeremias, I. *TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B*. *Oncogene* **2003**, *22*, 3842.
169. Morel, J.; Audo, R.; Hahne, M.; Combe, B. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15709.
170. Zauli, G.; Sancilio, S.; Cataldi, A.; Sabatini, N.; Bosco, D.; Di Pietro, R. *PI-3K/Akt and NF- κ B/I κ B α pathways are activated in jurkat T cells in response to TRAIL treatment*. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *202*, 900.
171. Hymowitz, S. G.; Christinger, H. W.; Fuh, G.; Ultsch, M.; O'Connell, M.; Kelley, R. F.; Ashkenazi, A.; de Vos, A. M. *Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5*. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 563.
172. Ashkenazi, A.; Pai, R. C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D. A.; Marsters, S. A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A. E.; Hebert, A.; et al. *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 155.
173. Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P. J.; Gordon, M. S.; Novotny, W.; Goldwasser, M. A.; Tohny, T. M.; Lum, B. L.; et al. *Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer*. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2839.
174. Ouyang, X.; Shi, M.; Jie, F.; Bai, Y.; Shen, P.; Yu, Z.; Wang, X.; Huang, C.; Tao, M.; Wang, Z.; et al. *Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients*

- with advanced non-small-cell lung cancer*. Invest. New Drugs **2018**, *36*, 315.
175. Soria, J.-C.; Smit, E.; Khayat, D.; Besse, B.; Yang, X.; Hsu, C.-P.; Reese, D.; Wietzorek, J.; Blackhall, F. *Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer*. J. Clin. Oncol. **2010**, *28*, 1527.
 176. Trivedi, R.; Mishra, D. P. *Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells*. Front. Oncol. **2015**, *5*, 69.
 177. Pukac, L.; Kanakaraj, P.; Humphreys, R.; Alderson, R.; Bloom, M.; Sung, C.; Riccobene, T.; Johnson, R.; Fiscella, M.; Mahoney, A.; et al. *HGS-ETRI, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo*. Br. J. Cancer **2005**, *92*, 1430.
 178. Younes, A.; Vose, J. M.; Zelenetz, A. D.; Smith, M. R.; Burris, H. A.; Ansell, S. M.; Klein, J.; Halpern, W.; Miceli, R.; Kumm, E.; et al. *A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma*. Br. J. Cancer **2010**, *103*, 1783.
 179. Belkahla, H.; Herlem, G.; Picaud, F.; Gharbi, T.; Hémadi, M.; Ammar, S.; Micheau, O. *TRAIL-NP hybrids for cancer therapy: a review*. Nanoscale **2017**, *9*, 5755.
 180. Lu, W.; Sun, Q.; Wan, J.; She, Z.; Jiang, X.-G. *Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumors via intravenous administration*. Cancer Res. **2006**, *66*, 11878.
 181. Miao, L.; Liu, Q.; Lin, C. M.; Luo, C.; Wang, Y.; Liu, L.; Yin, W.; Hu, S.; Kim, W. Y.; Huang, L. *Targeting tumor-associated fibroblasts for therapeutic delivery in desmoplastic tumors*. Cancer Res. **2017**, *77*, 719.
 182. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans*. Nature **1998**, *391*, 806.
 183. Couzin, J. *Method to silence genes earns loud praise*. Science **2006**, *314*, 34.
 184. Dominska, M.; Dykxhoorn, D. M. *Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape*. J. Cell Sci. **2010**, *123*, 1183.
 185. Barata, P.; Sood, A. K.; Hong, D. S. *RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: current status and future directions*. Cancer Treat. Rev. **2016**, *50*, 35.
 186. Tamm, I.; Wang, Y.; Sausville, E.; Scudiero, D. A.; Vigna, N.; Oltersdorf, T.; Reed, J. C. *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs*. Cancer Res. **1998**, *58*, 5315.
 187. Altieri, D. C. *Targeting survivin in cancer*. Cancer Lett. **2013**, *332* (2), 225–228.
 188. Han, Z.; Lee, S.; Je, S.; Eom, C.-Y.; Choi, H. J.; Song, J. J.; Kim, J.-H. *Survivin silencing and TRAIL expression using oncolytic adenovirus increase anti-tumorigenic activity in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells*. Apoptosis **2016**, *21*, 351.
 189. Suh, M. S.; Shim, G.; Lee, H. Y.; Han, S.-E.; Yu, Y.-H.; Choi, Y.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Weon, K. Y.; Kim, Y. B.; et al. *Anionic amino acid-derived cationic lipid for siRNA delivery*. J. Controlled Release **2009**, *140*, 268.
 190. Tang, S.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Gu, W.; Chen, L.; Yu, H.; Huang, Y.; Chen, X.; Xu, M.; Li, Y. *Co-delivery of doxorubicin and RNA using pH-sensitive poly (β -amino ester) nanoparticles for reversal of multidrug resistance of breast cancer*. Biomaterials **2014**, *35*, 6047.
 191. Bi, Y.; Zhang, Y.; Cui, C.; Ren, L.; Jiang, X. *Gene-silencing effects of anti-survivin siRNA delivered by RGDV-functionalized nanodiamond carrier in the breast carcinoma cell line MCF-7*. Int. J. Nanomedicine **2016**, *11*, 5771.
 192. Wang, H.-J.; He, X.; Luo, T.-Y.; Zhang, J.; Liu, Y.-H.; Yu, X.-Q. *Amphiphilic carbon dots as versatile vectors for nucleic acid and drug delivery*. Nanoscale **2017**, *9*, 5935.
 193. Riehle, R.; Pattni, B.; Jhaveri, A.; Kulkarni, A.; Thakur, G.; Degterev, A.; Torchilin, V. *Combination nanopreparations of a novel proapoptotic drug — NCL-240, TRAIL and siRNA*. Pharm. Res. **2016**, *33*, 1587.
 194. Ewe, A.; Panchal, O.; Pinnapireddy, S. R.; Bakowsky, U.; Przybylski, S.; Temme, A.; Aigner, A. *Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo*. Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. **2017**, *13*, 209.

195. Goroshchuk, O.; Kolosenko, I.; Vidarsdottir, L.; Azimi, A.; Palm-Apergi, C. *Polo-like kinases and acute leukemia*. *Oncogene* **2018**, *38*, 1.
196. Loukinov, D. I.; Pugacheva, E.; Vatolin, S.; Pack, S. D.; Moon, H.; Chernukhin, I.; Mannan, P.; Larsson, E.; Kanduri, C.; Vostrov, A. A.; et al. *BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 6806.
197. Martin-Kleiner, I. *BORIS in human cancers — a review*. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 929.
198. Dougherty, C. J.; Ichim, T. E.; Liu, L.; Reznik, G.; Min, W.-P.; Ghochikyan, A.; Agadjanyan, M. G.; Reznik, B. N. *Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 109.
199. Bettencourt, B. *Methods of treating transthyretin (TTR) mediated amyloidosis*. WO2016/033326A2, 2016.
200. <http://news.ufl.edu/articles/2018/08/approval-of-first-rna-interference-drug--why-the-excitement.php> (consulté le 22, Feb 2019).
201. Mockey, M.; Bourseau, E.; Chandrashekar, V.; Chaudhuri, A.; Lafosse, S.; Le Cam, E.; Quesniaux, V. F. J.; Ryffel, B.; Pichon, C.; Midoux, P. *mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes*. *Cancer Gene Ther.* **2007**, *14*, 802.
202. Andreev, D. E.; Terenin, I. M.; Dmitriev, S. E.; Shatsky, I. N. *Pros and cons of pDNA and mRNA transfection to study mRNA translation in mammalian cells*. *Gene* **2016**, *578*, 1.
203. Youn, H.; Chung, J.-K. *Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy*. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1337.
204. Cho, W. C. S. *MicroRNAs in cancer — from research to therapy*. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2010**, *1805*, 209.
205. Kasinski, A. L.; Slack, F. J. *MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy*. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 849.
206. Song, M.-S.; Rossi, J. J. *The anti-miR21 antagomir, a therapeutic tool for colorectal cancer, has a potential synergistic effect by perturbing an angiogenesis-associated miR30*. *Front. Genet.* **2014**, *4*, 301.
207. Ginn, S. L.; Alexander, I. E.; Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2012: an update*. *J. Gene Med.* **2013**, *15*, 65.
208. Al-Dosari, M. S.; Gao, X. *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress*. *AAPS J.* **2009**, *11*, 671.
209. Herweijer, H.; Wolff, J. A. *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy*. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 453.
210. Wolff, J. A.; Budker, V. *The mechanism of naked DNA uptake and expression*. In *Non-Viral Vectors for Gene Therapy*; Academic Press, 2005; Vol. 54, p 1.
211. Rubenstrunk, A.; Mahfoudi, A.; Scherman, D. *Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes*. *Cell Biol. Toxicol.* **2004**, *20*, 25.
212. Golzio, M.; Mazzolini, L.; Ledoux, A.; Paganin, A.; Izard, M.; Hellaudais, L.; Bieth, A.; Pillaire, M. J.; Cazaux, C.; Hoffmann, J. S.; et al. *In vivo gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery*. *Gene Ther.* **2007**, *14*, 752.
213. C. Heller, L.; Heller, R. *Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma*. *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 312.
214. Lentacker, I.; De Cock, I.; Deckers, R.; De Smedt, S. C.; Moonen, C. T. W. *Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 49.
215. Zeira, E.; Manevitch, A.; Khatchaturiants, A.; Pappo, O.; Hyam, E.; Darash-Yahana, M.; Tavor, E.; Honigman, A.; Lewis, A.; Galun, E. *Femtosecond infrared laser — an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression*. *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 342.
216. Nakatsuji, H.; Kawabata Galbraith, K.; Kurisu, J.; Imahori, H.; Murakami, T.; Kengaku, M. *Surface chemistry for cytosolic gene delivery and photothermal transgene expression by gold*

- nanorods*. Sci. Rep. **2017**, 7, 4694.
217. Uchida, M.; Natsume, H.; Kobayashi, D.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. *Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a helios gun system*. Biol. Pharm. Bull. **2002**, 25, 690.
 218. Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. *Non-viral vectors for gene-based therapy*. Nat. Rev. Genet. **2014**, 15, 541.
 219. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Nonviral vectors for gene delivery*. Chem. Rev. **2009**, 109, 259.
 220. Kapoor, M.; Burgess, D. J. *Physicochemical characterization of anionic lipid-based ternary siRNA complexes*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **2012**, 1818, 1603.
 221. Tros de Ilarduya, C.; Sun, Y.; Düzgüneş, N. *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. Eur. J. Pharm. Sci. **2010**, 40, 159.
 222. Ewert, K.; Evans, H. M.; Ahmad, A.; Slack, N. L.; Lin, A. J.; Martin-Herranz, A.; Safinya, C. R. *Lipoplex structures and their distinct cellular pathways*. In *Advances in Genetics*; Elsevier, 2005; Vol. 53, p 119.
 223. Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science **1997**, 275, 810.
 224. Koltover, I.; Salditt, T.; Rädler, J. O.; Safinya, C. R. *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science **1998**, 281, 78.
 225. Batzri, S.; Korn, E. D. *Single bilayer liposomes prepared without sonication*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1973**, 298, 1015.
 226. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc. Natl. Acad. Sci. **1987**, 84, 7413.
 227. Remy, J.-S.; Sirlin, C.; Vierling, P.; Behr, J.-P. *Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules*. Bioconjug. Chem. **1994**, 5, 647.
 228. Kulkarni, J. A.; Cullis, P. R.; van der Meel, R. *Lipid nanoparticles enabling gene therapies: from concepts to clinical utility*. Nucleic Acid Ther. **2018**, 28, 146.
 229. Kulkarni, J. A.; Myhre, J. L.; Chen, S.; Tam, Y. Y. C.; Danescu, A.; Richman, J. M.; Cullis, P. R. *Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA*. Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. **2017**, 13, 1377.
 230. Du, Z.; Munye, M. M.; Tagalakis, A. D.; Manunta, M. D. I.; Hart, S. L. *The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations*. Sci. Rep. **2014**, 4, 7107.
 231. Mochizuki, S.; Kanegae, N.; Nishina, K.; Kamikawa, Y.; Koiwai, K.; Masunaga, H.; Sakurai, K. *The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **2013**, 1828, 412.
 232. Nguyen, J.; Szoka, F. C. *Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle?* Acc. Chem. Res. **2012**, 45, 1153.
 233. Zhou, X.; Klibanov, A. L.; Huang, L. *Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1991**, 1065, 8.
 234. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.-P. *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc. Natl. Acad. Sci. **1995**, 92, 7297.
 235. Behr, J.-P. *The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit*. Chimia **1997**, 51, 34.
 236. Nelson, N. *Structure and pharmacology of the proton-ATPases*. Trends Pharmacol. Sci. **1991**, 12, 71.
 237. Forrest, M. L.; Meister, G. E.; T Koerber, J. T.; Pack, D. W. *Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery*. Pharm. Res. **2004**, 21, 365.
 238. Ito, T.; Yoshihara, C.; Hamada, K.; Koyama, Y. *DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice*. Biomaterials **2010**, 31, 2912.

239. Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. *Design and development of polymers for gene delivery*. Nat. Rev. Drug Discov. **2005**, *4*, 581.
240. Haensler, J.; Szoka, F. C. *Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture*. Bioconjug. Chem. **1993**, *4*, 372.
241. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. *Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1990**, *29*, 138.
242. Wang, Y.; Li, L.; Shao, N.; Hu, Z.; Chen, H.; Xu, L.; Wang, C.; Cheng, Y.; Xiao, J. *Triazine-modified dendrimer for efficient TRAIL gene therapy in osteosarcoma*. Acta Biomater. **2015**, *17*, 115.
243. Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. *Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **2006**, *1758*, 404.
244. Liu, Z.; Winters, M.; Holodniy, M.; Dai, H. *SiRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters*. Angew. Chem. Int. Ed. **2007**, *46*, 2023.
245. Han, G.; You, C.-C.; Kim, B.; Turingan, R. S.; Forbes, N. S.; Martin, C. T.; Rotello, V. M. *Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles*. Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, *45*, 3165.
246. Czugala, M.; Mykhaylyk, O.; Böhrer, P.; Onderka, J.; Stork, B.; Wesselborg, S.; Kruse, F. E.; Plank, C.; Singer, B. B.; Fuchsluger, T. A. *Efficient and safe gene delivery to human corneal endothelium using magnetic nanoparticles*. Nanomed. **2016**, *11*, 1787.
247. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. Nat. Biotechnol. **2015**, *33*, 941.
248. White, P. J.; Anastasopoulos, F.; Pouton, C. W.; Boyd, B. J. *Overcoming biological barriers to in vivo efficacy of antisense oligonucleotides*. Expert Rev. Mol. Med. **2009**, *11*, 10.
249. Saffari, M.; Moghimi, H. R.; Dass, C. R. *Barriers to liposomal gene delivery: from application site to the target*. Iran. J. Pharm. Res. **2016**, *15*, 3.
250. Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. *To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J. Controlled Release **2010**, *148*, 135.
251. Vermeulen, L. M. P.; Brans, T.; De Smedt, S. C.; Remaut, K.; Braeckmans, K. *Methodologies to investigate intracellular barriers for nucleic acid delivery in non-viral gene therapy*. Nano Today **2018**, *21*, 74.
252. Hong, J.; Huang, Y.; Li, J.; Yi, F.; Zheng, J.; Huang, H.; Wei, N.; Shan, Y.; An, M.; Zhang, H.; et al. *Comprehensive analysis of sequence-specific stability of siRNA*. FASEB J. **2010**, *24*, 4844.
253. Pierrat, P.; Kereselidze, D.; Lux, M.; Lebeau, L.; Pons, F. *Enhanced gene delivery to the lung using biodegradable polyunsaturated cationic phosphatidylcholine-detergent conjugates*. Int. J. Pharm. **2016**, *511*, 205.
254. Les aérosols pour l'application thérapeutique. <http://www.dtf.fr/fr/66-la-nebulisation-en-quelques-mots> (consulté le 21, Sep 2018).
255. Santel, A.; Aleku, M.; Keil, O.; Endruschat, J.; Esche, V.; Fisch, G.; Dames, S.; Löffler, K.; Fechtner, M.; Arnold, W.; et al. *A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium*. Gene Ther. **2006**, *13*, 1222.
256. Simberg, D.; Weisman, S.; Talmon, Y.; Faerman, A.; Shoshani, T.; Barenholz, Y. *The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection*. J. Biol. Chem. **2003**, *278*, 39858.
257. Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C.; Wagner, E. *Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery*. Hum. Gene Ther. **1996**, *7*, 1437.
258. Lavoie, P. M.; Levy, O. *Mononuclear phagocyte system*. In *Fetal and Neonatal Physiology*; Elsevier, 2017; Vol. 2, p 1208.
259. Hillaireau, H.; Couvreur, P. *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. Cell. Mol. Life Sci. **2009**, *66*, 2873.

260. Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R. *Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *32*, 3.
261. Harris, J. M.; Chess, R. B. *Effect of pegylation on pharmaceuticals*. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214.
262. Rodriguez, P. L.; Harada, T.; Christian, D. A.; Pantano, D. A.; Tsai, R. K.; Discher, D. E. *Minimal "self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles*. *Science* **2013**, *339*, 971.
263. Ishida, T.; Ichihara, M.; Wang, X.; Yamamoto, K.; Kimura, J.; Majima, E.; Kiwada, H. *Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes*. *J. Controlled Release* **2006**, *112*, 15.
264. Matsumura, Y.; Maeda, H. *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387.
265. Nguone, R.; Peters, A.; von Elverfeldt, D.; Winkler, K.; Pütz, G. *Accumulating nanoparticles by EPR: a route of no return*. *J. Controlled Release* **2016**, *238*, 58.
266. Noguchi, Y.; Wu, J.; Duncan, R.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Akaike, T.; Maeda, H. *Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues*. *Jpn. J. Cancer Res.* **2005**, *89*, 307.
267. Gradishar, W. J.; Tjulandin, S.; Davidson, N.; Shaw, H.; Desai, N.; Bhar, P.; Hawkins, M.; O'Shaughnessy, J. *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 7794.
268. Gordon, A. N.; Fleagle, J. T.; Guthrie, D.; Parkin, D. E.; Gore, M. E.; Lacave, A. J. *Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan*. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3312.
269. Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751.
270. O'Brien, M. E. R.; Wigler, N.; Inbar, M.; Rosso, R.; Grischke, E.; Santoro, A.; Catane, R.; Kieback, D. G.; Tomczak, P.; Ackland, S. P.; et al. *Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer*. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 440.
271. Danhier, F. *To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?* *J. Controlled Release* **2016**, *244*, 108.
272. Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; et al. *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815.
273. Nakamura, Y.; Mochida, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nanodrug delivery: is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer?* *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2225.
274. Jain, R. K.; Stylianopoulos, T. *Delivering nanomedicine to solid tumors*. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 653.
275. Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules*. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685.
276. Sano, K.; Nakajima, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Markedly enhanced permeability and retention effects induced by photo-immunotherapy of tumors*. *ACS Nano* **2013**, *7*, 717.
277. Kobayashi, H.; Choyke, P. L. *Super enhanced permeability and retention (SUPR) effects in tumors following near infrared photoimmunotherapy*. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12504.
278. Renoux, B.; Raes, F.; Legigan, T.; Péraudeau, E.; Eddhif, B.; Poinot, P.; Tranoy-Opalinski, I.; Alsarraf, J.; Koniev, O.; Kolodych, S.; et al. *Targeting the tumour microenvironment with an enzyme-responsive drug delivery system for the efficient therapy of breast and pancreatic*

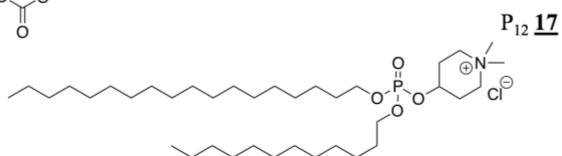
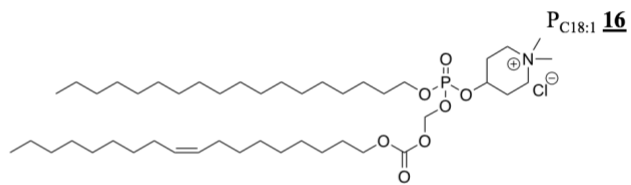
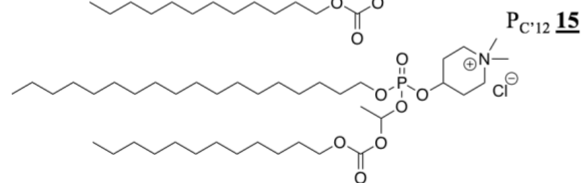
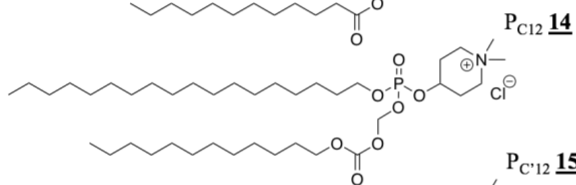
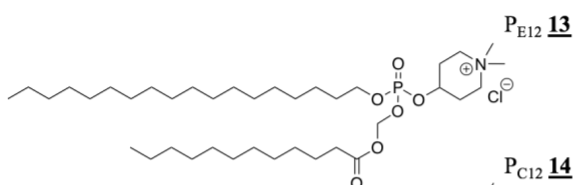
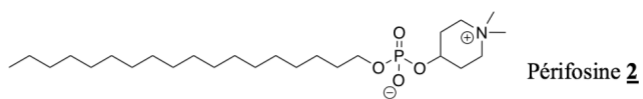
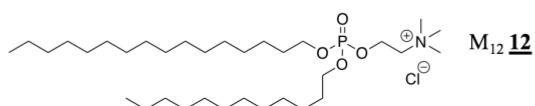
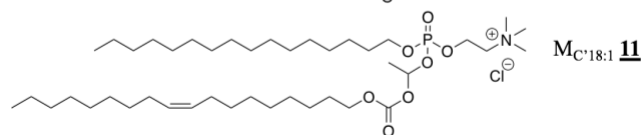
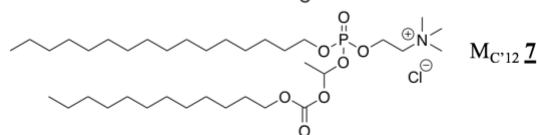
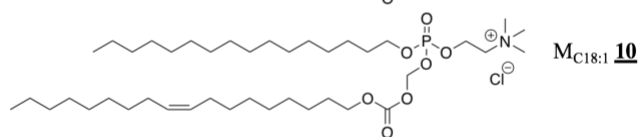
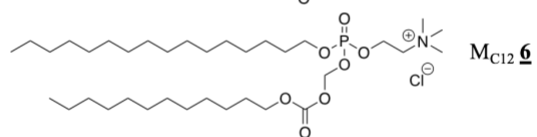
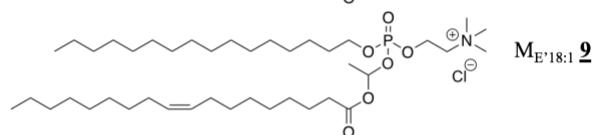
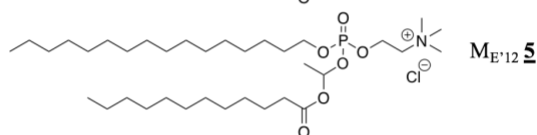
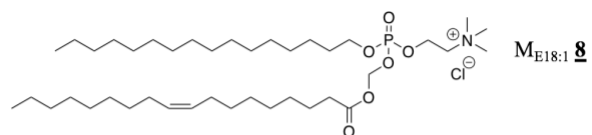
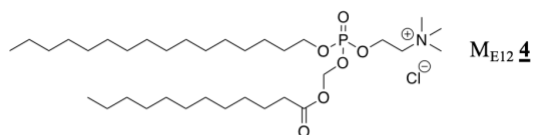
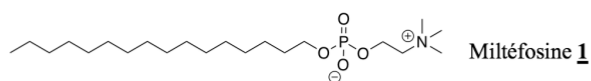
- cancers*. Chem. Sci. **2017**, *8*, 3427.
279. Tasciotti, E.; Molinaro, R.; Taraballi, F.; Toledano Furman, N.; Sherman, M.; Parodi, A.; Salvatore, F.; Corbo, C. *Effects of the protein corona on liposome-liposome and liposome-cell interactions*. Int. J. Nanomedicine **2016**, *11*, 3049.
280. Monopoli, M. P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials*. Nat. Nanotechnol. **2012**, *7*, 779.
281. Sahay, G.; Alakhova, D. Y.; Kabanov, A. V. *Endocytosis of nanomedicines*. J. Controlled Release **2010**, *145*, 182.
282. Liang, W.; W. Lam, J. K. *Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems*. In *Molecular Regulation of Endocytosis*; Ceresa, B., Ed.; InTech, 2012; Vol. 1, p 429.
283. Sonawane, N. D.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S. *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-dna polyplexes*. J. Biol. Chem. **2003**, *278*, 44826.
284. Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. *Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1998**, *1414*, 127.
285. Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Høgset, A.; Norum, O.-J.; Berstad, M. B.; Vikdal, M.; Berg, K. *Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules*. J. Controlled Release **2010**, *148*, 2.
286. Suh, J.; Wirtz, D.; Hanes, J. *Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus*. Proc. Natl. Acad. Sci. **2003**, *100*, 3878.
287. Bausinger, R.; von Gersdorff, K.; Braeckmans, K.; Ogris, M.; Wagner, E.; Bräuchle, C.; Zumbusch, A. *The transport of nanosized gene carriers unraveled by live-cell imaging*. Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, *45*, 1568.
288. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc. Natl. Acad. Sci. **1999**, *96*, 5177.
289. Capecchi, M. R. *High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells*. Cell **1980**, *22*, 479.
290. Luo, C.; Miao, L.; Zhao, Y.; Musetti, S.; Wang, Y.; Shi, K.; Huang, L. *A novel cationic lipid with intrinsic antitumor activity to facilitate gene therapy of TRAIL DNA*. Biomaterials **2016**, *102*, 239.
291. Morales, D. R.; Morris, A. D. *Metformin in cancer treatment and prevention*. Annu. Rev. Med. **2015**, *66*, 17.
292. Krylov, I. S.; McKenna, C. E. *Enzymatically activated phosphate and phosphonate prodrugs*. In *Enzyme Technologies*; Yang, H.-C., Yeh, W.-K., McCarthy, J. R., Eds.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, 2013; p 253.
293. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs*. Chem. Rev. **2014**, *114*, 9154.
294. Abet, V.; Filace, F.; Recio, J.; Alvarez-Builla, J.; Burgos, C. *Prodrug approach: an overview of recent cases*. Eur. J. Med. Chem. **2017**, *127*, 810.
295. Hecker, S. J.; Erion, M. D. *Prodrugs of Phosphates and Phosphonates*. J. Med. Chem. **2008**, *51* (8), 2328–2345.
296. Jessen, H. J.; Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. *Bioreversible protection of nucleoside diphosphates*. Angew. Chem. Int. Ed. **2008**, *47*, 8719.
297. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. *Acyloxyalkyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo anti-malarial activity*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2003**, *13*, 2163.
298. Yang, Y.; Babiak, P.; Reymond, J.-L. *New monofunctionalized fluorescein derivatives for the efficient high-throughput screening of lipases and esterases in aqueous media*. Helv. Chim. Acta **2006**, *89*, 404.
299. Tang, Y.; Peng, Z.; Liu, Z.; Li, Y.; Jiang, J.; Li, Z. *Some new acyclic nucleotide analogues as antiviral prodrugs: synthesis and bioactivities in vitro*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2007**,

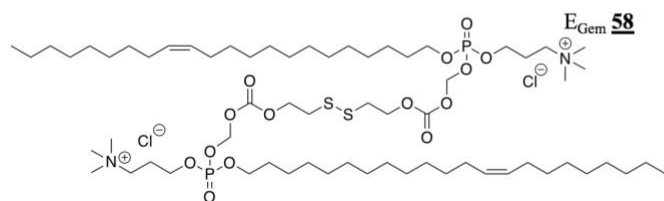
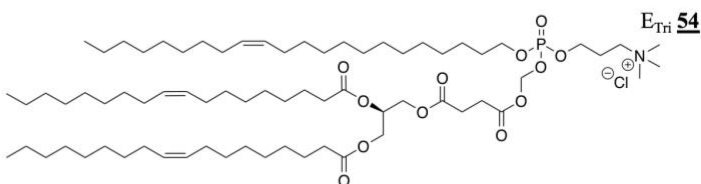
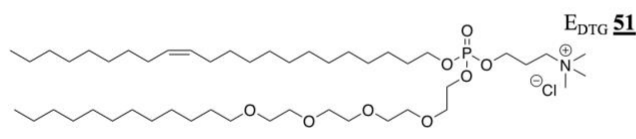
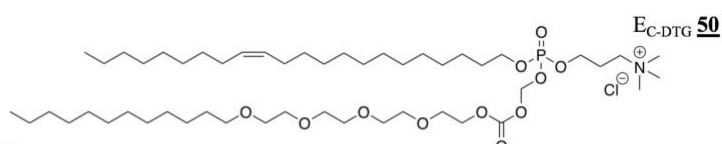
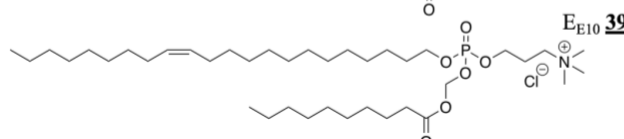
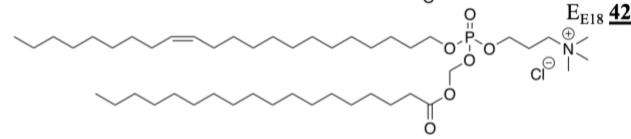
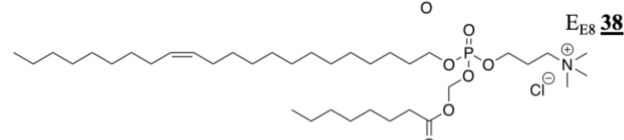
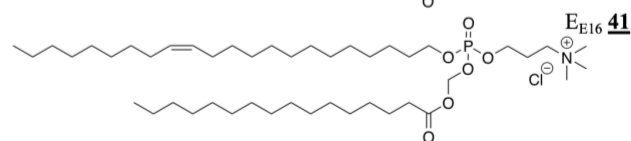
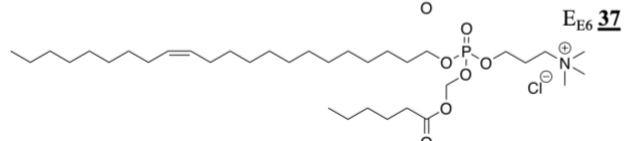
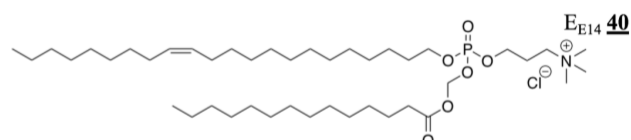
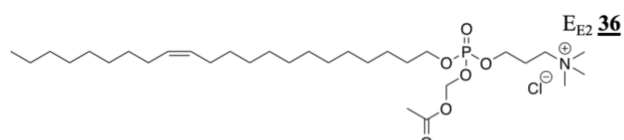
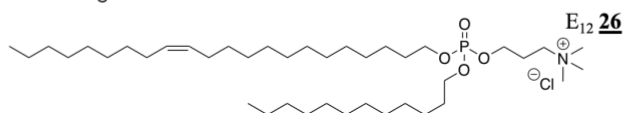
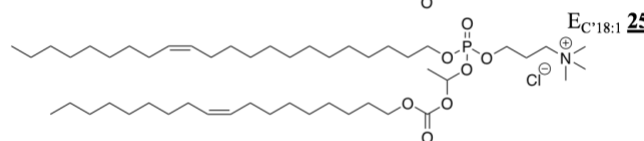
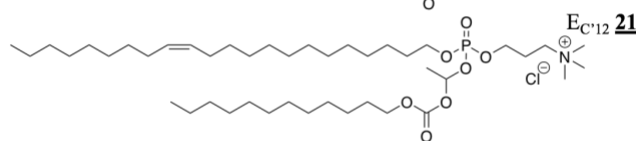
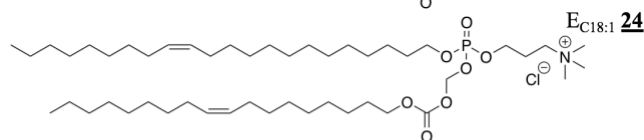
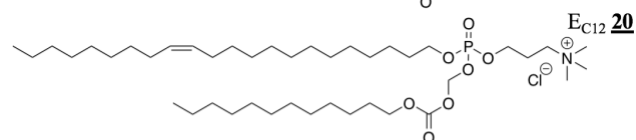
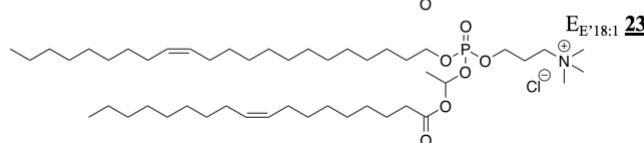
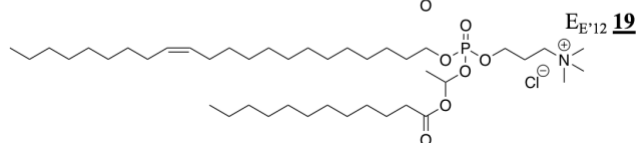
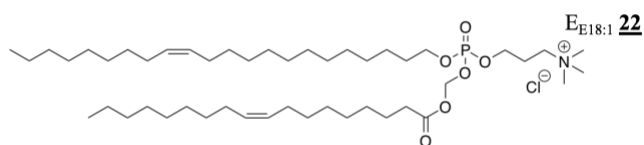
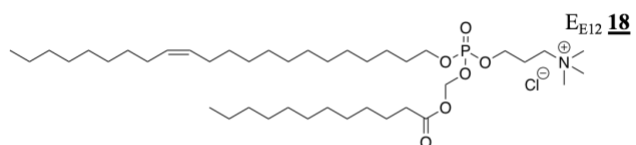
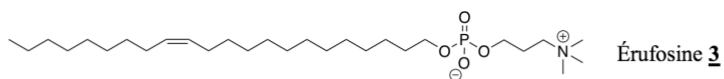
- 17, 6350.
300. Bensel, N.; Reymond, M. T.; Reymond, J.-L. *Pivalase catalytic antibodies: towards abzymatic activation of prodrugs*. Chem. - Eur. J. **2001**, 7, 4604.
 301. Pierrat, P.; Laverny, G.; Creusat, G.; Wehrung, P.; Strub, J.-M.; VanDorsseleer, A.; Pons, F.; Zuber, G.; Lebeau, L. *Phospholipid-detergent conjugates as novel tools for siRNA delivery*. Chem. - Eur. J. **2013**, 19, 2344.
 302. Pierrat, P.; Kereselidze, D.; Wehrung, P.; Zuber, G.; Pons, F.; Lebeau, L. *Bioresponsive deciduous-charge amphiphiles for liposomal delivery of DNA and siRNA*. Pharm. Res. **2013**, 30, 1362.
 303. Pierrat, P.; Creusat, G.; Laverny, G.; Pons, F.; Zuber, G.; Lebeau, L. *A cationic phospholipid-detergent conjugate as a new efficient carrier for siRNA delivery*. Chem. - Eur. J. **2012**, 18, 3835.
 304. Pierrat, P.; Casset, A.; Didier, P.; Kereselidze, D.; Lux, M.; Pons, F.; Lebeau, L. *Cationic DOPC-detergent conjugates for safe and efficient in vitro and in vivo nucleic acid delivery*. ChemBioChem **2016**, 17, 1771.
 305. Pierrat, P.; Casset, A.; Kereselidze, D.; Lux, M.; Pons, F.; Lebeau, L. *DOPC-detergent conjugates: fusogenic carriers for improved in vitro and in vivo gene delivery*. Macromol. Biosci. **2016**, 16, 984.
 306. MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S.; Pantazatos, D. P.; Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Baker, K. A.; Jones, R. D.; et al. *Physical and biological properties of cationic triesters of phosphatidylcholine*. Biophys. J. **1999**, 77, 2612.
 307. Gorman, C. M.; Aikawa, M.; Fox, B.; Fox, E.; Lapuz, C.; Michaud, B.; Nguyen, N.; Roche, E.; Sawa, T.; Wiener-Kronish, J. P. *Efficient in vivo delivery of DNA to pulmonary cells using the novel lipid EDMPC*. Gene Ther. **1997**, 4, 983.
 308. Hostetler, K. Y.; Beadle, J. R.; Kini, G. D.; Gardner, M. F.; Wright, K. N.; Wu, T.-H.; Korba, B. A. *Enhanced oral absorption and antiviral activity of 1-O-octadecyl-sn-glycero-3-phospho-acyclovir and related compounds in hepatitis B virus infection, in vitro*. Biochem. Pharmacol. **1997**, 53, 1815.
 309. Farquhar, D.; Khan, S.; Wilkerson, M. C.; Anderson, B. S. *Biologically-cleavable phosphate protective groups: 4-acyloxy-1,3,2-dioxaphosphorinanes as neutral latent precursors of dianionic phosphates*. Tetrahedron Lett. **1995**, 36, 655.
 310. Shpirt, A. M.; Kononov, L. O.; Maltsev, S. D.; Shibaev, V. N. *Chemical synthesis of polyprenyl sialyl phosphate, a probable biosynthetic intermediate of bacterial polysialic acid*. Carbohydr. Res. **2011**, 346, 2849.
 311. Crich, D.; Picard, S. *Highly stereoselective synthesis of α -D-mannopyranosyl phosphosugars*. J. Org. Chem. **2009**, 74, 9576.
 312. Puech, F.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Kirn, A.; Imbach, J.-L. *Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase-mediated activation process*. Antiviral Res. **1993**, 22, 155.
 313. Egron, D.; Lefebvre, I.; Périgaud, C.; Beltran, T.; Pompon, A.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Imbach, J.-L. *Anti-HIV pronucleotides: decomposition pathways and correlation with biological activities*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **1998**, 8, 1045.
 314. Lannuzel, M.; Egron, D.; Imbach, J. L.; Gosselin, G.; Perigaud, C. *Synthesis of the tBuSATE pronucleotide of AZT by two different synthetic approaches*. Nucleosides Nucleotides **1999**, 18, 1001.
 315. Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Girardet, J.-L.; Kirn, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L. *Mononucleoside phosphotriester derivatives with S-acyl-2-thioethyl bioreversible phosphate-protecting groups: intracellular delivery of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-monophosphate*. J. Med. Chem. **1995**, 38, 3941.
 316. Hait, S. K.; Moulik, S. P. *Gemini surfactants: a distinct class of self-assembling molecules*. Curr. Sci. **2002**, 82, 1101.
 317. Menger, F. M.; Littau, C. A. *Gemini surfactants: a new class of self-assembling molecules*. J. Am. Chem. Soc. **1993**, 115, 10083.

318. Timko, L.; Fischer-Fodor, E.; Garajová, M.; Mrva, M.; Chereches, G.; Ondriska, F.; Bukovský, M.; Lukáč, M.; Karlovská, J.; Kubincová, J.; et al. *Synthesis of structural analogues of hexadecylphosphocholine and their antineoplastic, antimicrobial and amoebicidal activity*. Eur. J. Med. Chem. **2015**, *93*, 263.
319. Hendrickson, E. K.; Hendrickson, H. S. *Efficient synthesis of the cholinephosphate phospholipid headgroup*. Chem. Phys. Lipids **2001**, *109*, 203.
320. Magolda, R. L.; Johnson, P. R. *A new efficient and versatile synthesis of alkyl proosphorylcholines*. Tetrahedron Lett. **1985**, *26*, 1167.
321. Mravljak, J.; Reiner Zeisig; Pečar, S. *Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholipid analogs*. J. Med. Chem. **2005**, *48*, 6393.
322. Huttunen, K. M.; Mähönen, N.; Leppänen, J.; Vepsäläinen, J.; Juvonen, R. O.; Raunio, H.; Kumpulainen, H.; Järvinen, T.; Rautio, J. *Novel cyclic phosphate prodrug approach for cytochrome P450-activated drugs containing an alcohol functionality*. Pharm. Res. **2007**, *24*, 679.
323. Kim, M.; Pitchaiah, A.; Park, N.-J.; Hwang, I. T.; Lee, K.-I. *Practical and scalable synthesis of (Z)-9-tricosene, the housefly sex pheromone*. Lett. Org. Chem. **2012**, *9*, 628.
324. Tyndall, G. S.; Wallington, T. J.; Hurley, M. D.; Schneider, W. F. *Rate coefficient for the reaction of hydroxymethyl radicals with chlorine and infrared spectra of chloromethanol and dichloromethanol*. J. Phys. Chem. **1993**, *97*, 1576.
325. Power, N. P.; Bethell, D.; Proctor, L.; Latham, E.; Dawson, P. *Chloromethyl chlorosulfate: a new, catalytic method of preparation and reactions with some nucleophiles*. Org. Biomol. Chem. **2004**, *2*, 1554.
326. Binderup, E.; Hansen, E. T. *Chlorosulfates as reagents in the synthesis of carboxylic acid esters under phase-transfer conditions*. Synth. Commun. **1984**, *14*, 857.
327. Adams, R.; Vollweiler, E. H. *The reaction between acid halides and aldehydes. I*. J. Am. Chem. Soc. **1918**, *40*, 1732.
328. Azéma, J.; Guidetti, B.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Roques, C. *Efficient approach to acyloxymethyl esters of nalidixic acid and in vitro evaluation as intra-ocular prodrugs*. Bioorg. Med. Chem. **2006**, *14*, 2569.
329. Senet, J.-P.; Sennyey, G.; Wooden, G. P. *A convenient new route to 1-haloalkyl carbonates*. Synthesis **1988**, *5*, 407.
330. Thomas, J. D.; Sloan, K. B. *Overcoming steric effects in the coupling reaction of alkyloxycarbonyloxymethyl (AOCOM) halides with phenols: an efficient synthesis of AOCOM phenolic prodrugs*. Tetrahedron Lett. **2007**, *48*, 109.
331. Lebeau, L.; Oudet, P.; Mioskowski, C. *Synthesis of new phospholipids linked to steroid-hormone derivatives designed for two-dimensional crystallization of proteins*. Helv. Chim. Acta **1991**, *74*, 1697.
332. Eichmann, T. O.; Lass, A. *DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol-stereochemistry, metabolism and signaling*. Cell. Mol. Life Sci. **2015**, *72*, 3931.
333. Ostergaard, J.; Larsen, C. *Bioreversible derivatives of phenol. 2. Reactivity of carbonate esters with fatty acid-like structures towards hydrolysis in aqueous solutions*. Molecules **2007**, *12*, 2396.
334. van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; van Steenberg, M. J.; Underberg, W. J. M.; Hennink, W. E. *Degradation kinetics of methacrylated dextrans in aqueous solution*. J. Pharm. Sci. **1997**, *86*, 413.
335. Scholz, N.; Behnke, T.; Resch-Genger, U. *Determination of the critical micelle concentration of neutral and ionic surfactants with fluorometry, conductometry, and surface tension-a method comparison*. J. Fluoresc. **2018**, *28*, 465.
336. Yaseen, M.; Wang, Y.; Su, T. J.; Lu, J. R. *Surface adsorption of zwitterionic surfactants: n-alkyl phosphocholines characterised by surface tensiometry and neutron reflection*. J. Colloid Interface Sci. **2005**, *288*, 361.
337. Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Mohr, P. C.; Khot, G.; Rabe, J. P.; Mohr, A. *Nile red dye in aqueous surfactant and micellar solution*. Langmuir **2015**, *31*, 2639.
338. Nakahara, Y.; Kida, T.; Nakatsuji, Y.; Akashi, M. *New fluorescence method for the*

- determination of the critical micelle concentration by photosensitive monoazacryptand derivatives. *Langmuir* **2005**, *21*, 6688.
339. Chattopadhyay, A.; London, E. *Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge*. *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 408.
340. Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuo, P. L.; Ananthapadmanabhan, K. P. *Fluorescence probes for critical micelle concentration determination*. *Langmuir* **1985**, *1*, 352.
341. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems*. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039.
342. Bains, G.; Patel, A. B.; Narayanaswami, V. *Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes*. *Molecules* **2011**, *16*, 7909.
343. Piñeiro, L.; Novo, M.; Al-Soufi, W. *Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions*. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *215*, 1.
344. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method*. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116.
345. Topel, Ö.; Çakır, B. A.; Budama, L.; Hoda, N. *Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering*. *J. Mol. Liq.* **2013**, *177*, 40.
346. Bondì, M. L.; Ferraro, M.; Di Vincenzo, S.; Gerbino, S.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Botto, C.; Gjomarkaj, M.; Pace, E. *Effects in cigarette smoke stimulated bronchial epithelial cells of a corticosteroid entrapped into nanostructured lipid carriers*. *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 46.
347. Petit, K.; Suwalsky, M.; Colina, J. R.; Aguilar, L. F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. *In vitro effects of the antitumor drug miltefosine on human erythrocytes and molecular models of its membrane*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2019**, *1861*, 17.
348. Alonso, L.; Alonso, A. *Hemolytic potential of miltefosine is dependent on cell concentration: implications for in vitro cell cytotoxicity assays and pharmacokinetic data*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, *1858*, 1160.
349. Azijli, K.; van Roosmalen, I. A. M.; Smit, J.; Pillai, S.; Fukushima, M.; de Jong, S.; Peters, G. J.; Bijnsdorp, I. V.; Kruyt, F. A. E. *The novel thymidylate synthase inhibitor trifluorothymidine (TFT) and TRAIL synergistically eradicate non-small cell lung cancer cells*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *73*, 1273.
350. Beyrath, J.; Chekkat, N.; Smulski, C. R.; Lombardo, C. M.; Lechner, M.-C.; Seguin, C.; Decossas, M.; Spanedda, M. V.; Frisch, B.; Guichard, G. *Synthetic ligands of death receptor 5 display a cell-selective agonistic effect at different oligomerization levels*. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64942.
351. Chekkat, N.; Lombardo, C. M.; Seguin, C.; Lechner, M.-C.; Dufour, F.; Nominé, Y.; De Giorgi, M.; Frisch, B.; Micheau, O.; Guichard, G.; et al. *Relationship between the agonist activity of synthetic ligands of TRAIL-R2 and their cell surface binding modes*. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15566.
352. Gentine, P.; Bubel, A.; Crucifix, C.; Bourel-Bonnet, L.; Frisch, B. *Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method*. *J. Liposome Res.* **2012**, *22*, 18.
353. Evans, B. C.; Nelson, C. E.; Yu, S. S.; Beavers, K. R.; Kim, A. J.; Li, H.; Nelson, H. M.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L. *Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs*. *J. Vis. Exp.* **2013**, *73*, e50166.
354. Heyes, J. A.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J. *Synthesis of novel cationic lipids: effect of structural modification on the efficiency of gene transfer*. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 99.
355. Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Manzanos, M. J.; Guillén, M. D. *A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures*. *Food Res. Int.* **2014**, *66*, 379.

Annexe





Boris GAILLARD

Prodrogues d'alkylphospholipides (pro-APLs) pour une nouvelle approche thérapeutique du cancer par les lipides antitumoraux

Résumé

Les précédents travaux menés au laboratoire avaient permis d'obtenir des lipides cationiques biolabiles dérivés d'un constituant naturel des membranes cellulaires, la DOPC, en masquant temporairement sa charge négative par l'introduction d'un substituant, clivable sous stimuli acide ou enzymatique. Ce concept s'était révélé efficace pour la délivrance, *in vitro* et *in vivo*, d'acides nucléiques, avec un impact toxicologique minimisé.

Ce doctorat est la transposition de ce système à une approche thérapeutique du cancer, à l'aide de constructions dérivées d'alkylphospholipides (APLs), des lipides antitumoraux. De nombreuses prodrogues biolabiles (pro APLs) ont été développées à partir de trois APLs prometteurs : miltéfosine, périfosine et érufosine.

L'évaluation et l'optimisation de l'activité biologique des pro-APLs ont conduit à des formulations performantes pour la délivrance *in vitro* d'un ADN thérapeutique TRAIL et la production *in situ* d'APLs, pour une combothérapie antitumorale.

Mots clés : Thérapie génique, Chimiothérapie, Combothérapie antitumorale, alkylphospholipides, APLs, TRAIL, prodrogues.

Résumé en anglais

Previous work in the laboratory had resulted in biolabile cationic lipids derived from a naturally cell membrane component, DOPC, by temporarily masking its negative charge by the introduction of a cleavable substituent, under acidic or enzymatic stimuli. This concept was particularly efficient for the delivery, *in vitro* and *in vivo*, of nucleic acids such as DNA plasmid or siRNA, with a minimized toxicological impact for cells.

The present study is the transposition of this system to a therapeutic approach to cancer, using constructions derived from alkylphospholipids (APLs), a recent class of antitumor lipids. Biolabile prodrugs (pro APLs) have been developed from three promising APLs: miltefosine, perifosine and erufosine.

The biological evaluation of pro-APLs activity and the optimization of various parameters led to efficient formulations for the *in vitro* delivery of a therapeutic DNA plasmid, related to TRAIL, and the *in situ* APLs production for a potential antitumor combothrapy.

Key words: Gene therapy, Chemotherapy, Combothrapy, alkylphospholipides APLs, TRAIL, prodrugs.