

Synthèse de Glycolipides Polymérisables Dérivés du Tris(hydroxyméthyl)aminométhane: Préparation de Micelles Polymérisées.

B. Pucci^{a)}, A. Polidori^{a)}, N. Rakotomanomana^{a)}, M. Chorro^{b)} et A.A. Pavia^{a)}*

^{a)}Laboratoire de Chimie Bioorganique, Faculté des Sciences, 33, rue Louis Pasteur, 84000 - Avignon - France.

^{b)}Laboratoire de Physico Chimie des Systèmes Polyphasés - associé au C.N.R.S.- Université des Sciences et Techniques du Languedoc - 34095 - Montpellier Cedex 05 - France.

Abstract : We have synthesized a series of new polymerizable glycolipids derived from Tris(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS). Galactosylation of TRIS was performed in good yield by means of ultrasounds. Polymerization of 11-*N*-acrylamido-*N*-Tris(β -D-galactopyranosyl oxyméthyl)méthyl undecanamide in aqueous solution by UV irradiation, led to polymerized micellar structures (A).

De très nombreux processus de reconnaissance font intervenir des interactions spécifiques entre des structures glycosidiques présentes sur des protéines, anticorps, hormones ou autres cellules et les lectines membranaires des cellules cibles^{1,2}. Au cours de ces dernières années, de nombreux efforts ont été consacrés au greffage de structures saccharidiques naturelles ou synthétiques sur des matrices rigides^{3,4}, à la surface externe des liposomes^{5,6} ou sur des structures macromoléculaires^{7,8} dans l'optique soit de préciser le rôle des motifs saccharidiques dans ce processus de reconnaissance, soit d'assurer un ciblage cellulaire des principes actifs.

Nous avons récemment montré⁹ qu'il est possible d'obtenir des structures micellaires polymérisées par irradiation γ . Toutefois, l'utilisation de rayonnements γ peut se révéler particulièrement dommageable pour les principes actifs que l'on souhaite incorporer dans la structure micellaire.

Compte tenu du bon comportement et de la biocompatibilité des tensioactifs dérivés du Tris (hydroxyméthyl)aminométhane¹⁰⁻¹², nous avons préparé des clusters glycosidiques du Tris comportant une chaîne hydrophobe terminée par une fonction acrylamide polymérisable dans des conditions douces. Nous rapportons ci-après, la préparation de certains dérivés mono-(**7d**), di-(**8a-d**) et trigalactosylés (**9a-d**) du Tris, ainsi que les structures polymérisées A obtenues après irradiation UV ($\lambda = 254$ nm) du 11-*N*-acrylamido-*N*-Tris-(β -D-galactopyranosyloxyméthyl)méthyl undecanamide **9a** (schéma I).

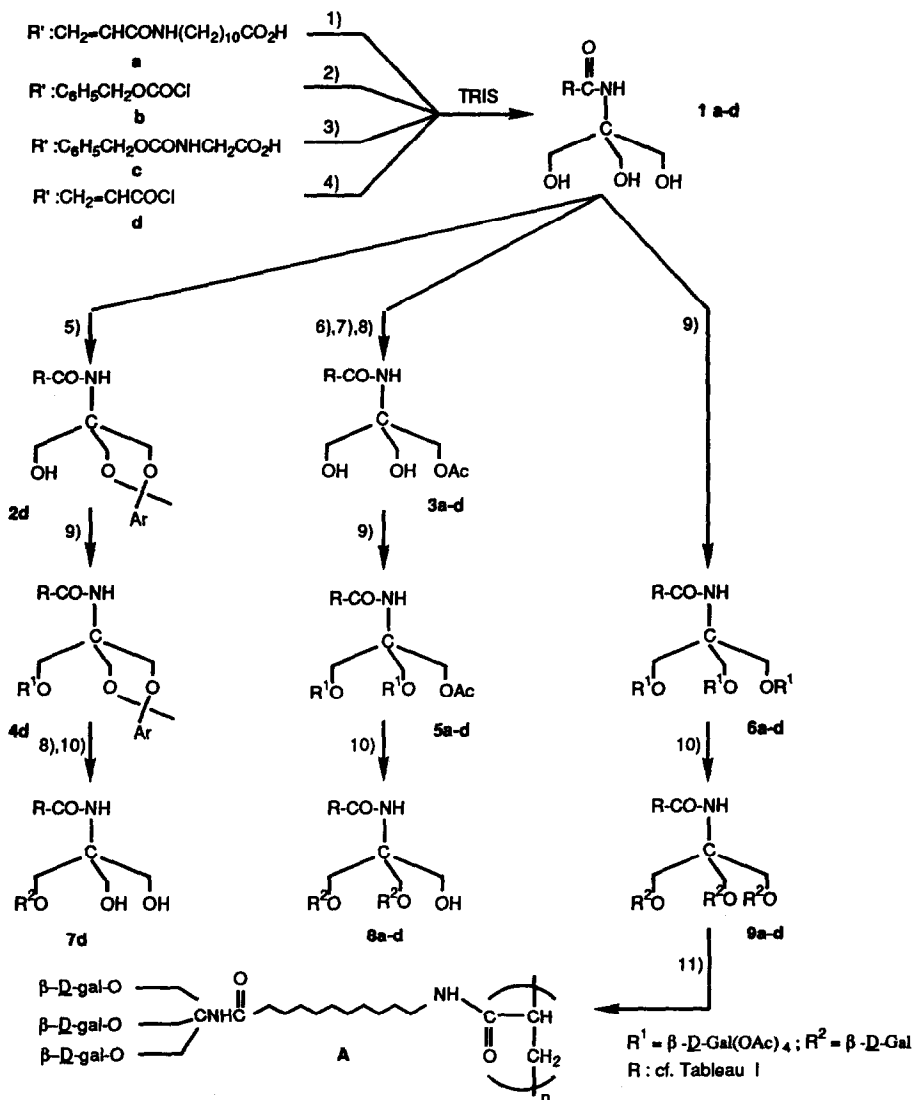
L'étape clé de la séquence, rapportée dans le schéma I, reste la glycosylation du résidu Tris. En dehors des composés polymérisables qui font l'objet de ce travail, cette approche donne accès à des tensioactifs non ioniques dont la balance hydrophile-lipophile (HLB) et la grosseur de la tête hydrophile peut être modulée par le nombre de résidus saccharidiques fixés sur le motif Tris.

Lee et al¹³⁻¹⁵, puis Kempen et al^{16,17} ont utilisé la méthode de glycosylation selon Helferich¹⁸ pour préparer des dérivés glycosylés du Tris. Dans les conditions normales, la réaction s'effectue avec des rendements peu satisfaisants (<40%) et conduit à un mélange de dérivés mono, di et triglycosylés difficiles à séparer. L'utilisation des ultrasons^{19,20} nous a permis d'améliorer de façon significative le rendement de cette

étape, sans en affecter la stéréosélectivité. Sous ultrasons, la réaction est pratiquement immédiate, stéréosélective (obtention exclusive de l'anomère β), générale (tableau I) avec des rendements habituellement supérieurs à 60%. Enfin, les produits sont facilement purifiés par chromatographie sur colonne de silice.

SCHEMA I

Synthèse des dérivés galactosylés du TRIS et du poly-(-11-N-acrylamido-N-Tris (β -D-galactopyranosyloxyméthyl)méthyl undecanamide) A



1) EEDQ, EtOH, Δ , 5h, 89%; 2) CH_3CN , NaOH, 0°C , 12h, 70%; 3) EEDQ, EtOH, Δ , 5h, 46% 4) Ref. 10;

5) $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$, CH_3CN , TsOH, 20°C , 87%; 6) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, CH_2Cl_2 , TsOH, 15 mn, 95% 7) Ac_2O , Pyridine, 20°C , 95%;

8) AcOH , H_2O (8/2), 20°C 100%; 9) Ref. 21; 10) CH_3ONa , CH_3OH , 20°C , 100%; 11) H_2O (C= 5mM), $\lambda = 254\text{ nm}$, 20°C , 4h, 100%

TABLEAU I

Rendements de l'étape de galactosylation et caractéristiques physico-chimiques des monomères galactosylés.

R	4			5			6			
	Rdt ^{a)}	F°C	[α] _D ^{c)}	Rdt ^{a)}	F°C	[α] _D ^{c)}	Rdt ^{a)}	Rdt ^{b)}	F°C	[α] _D ^{c)}
a : Acryl-NH(CH ₂) ₁₀ -	-	-	-	28	51	-2,5	30	< 10	79	-9
b : C ₆ H ₅ CH ₂ O-	-	-	-	90	69	ND	78	ND	79	-5
c : ZNHCH ₂ -	-	-	-	75	72	-3,5	64	24	93	ND
d : CH ₂ =CH-	90	64	-16	65	70	-4,5	60	28	92	-4

a) Rendement de l'étape de galactosylation en présence d'ultrasons²¹.

b) Rendement de l'étape de galactosylation en absence d'ultrasons (48 h de réaction).

c) Dans CDCl₃ (c, 1%); ND: non déterminé.

Cependant la galactosylation du 11-*N*-acrylamido-*N*-Tris(hydroxyméthyl)méthyl undécaneamide **1a** ou de son dérivé monoacétylé **3a** s'effectue avec un rendement médiocre (30%). Il est probable que le composé **1a** qui présente un caractère amphiphile prononcé, existe dans le milieu réactionnel sous la forme de micelles inverses. Ce type d'organisation pourrait expliquer la faible réactivité des hydroxyles quel que soit le rapport acétobromogalactose/réactif utilisé.

Ce résultat nous a conduits à envisager la préparation du composé **6a** via le *N*-benzyloxycarbonyl-Tris(hydroxyméthyl) aminométhane **1b**. La glycosylation se fait avec un meilleur rendement. Par contre, comme cela a été observé par Kempen^{16,17} avec des structures analogues, le couplage de l'acide 11-*N*-acrylamido undécanoïque avec la fonction amine du Tris galactosylé se fait avec un rendement médiocre (40%) quel que soit l'agent de couplage employé (DCC-HOBT, EEDQ, BOP). Cette faible réactivité peut être attribuée à l'encombrement stérique introduit par les motifs glycosidiques. La première approche se révèle donc préférable pour préparer les composés **5a** et **6a**.

L'hydrolyse des groupements acétates est réalisée par action d'une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol. Le monomère **9a** présente une concentration micellaire critique (CMC) de 2 mM et une tension superficielle de 28 mN/m (tensiomètre Kruss K10 ST). Des mesures de diffusion de la lumière (Quasi Elastic Light Scattering, Q.E.L.S.) réalisée sur spectrophotomètre AMTEC, montrent qu'en solution aqueuse et pour des concentrations supérieures à la CMC, **9a** forme des agrégats micellaires (rayon hydrodynamique Rh=400 Å pour une concentration de 5 mM) dont la taille évolue avec la concentration du tensioactif.

La polymérisation de **9a**, (5 mM) en solution aqueuse, a été effectuée par irradiation UV ($\lambda = 254$ nm) à 20°C sous atmosphère inerte. L'analyse RMN-¹H de portions aliquotes de solution préalablement lyophilisées montre que la réaction est totale après 4 h d'irradiation (disparition des signaux des protons vinyliques présents dans le monomère et léger élargissement des signaux). Aucune CMC ne peut être détectée pour le polymère **A**, qui présente par ailleurs une tension superficielle élevée $\sigma = 51$ mN/m, ce qui est conforme à ce que l'on doit attendre⁹. Les mesures de Q.E.L.S. réalisées dans les mêmes conditions que précédemment indiquent la présence de particules de taille homogène, sans interaction, dont la taille (rayon hydrodynamique, Rh= 73 Å) est indépendante de la concentration et n'évolue pas dans le temps. Ces résultats sont confirmés en microscopie électronique par transmission selon la technique de coloration négative, où l'on observe des particules de forme sphérique, monodisperses et de diamètre compris entre 150 et 200 Å. Enfin, alors que le monomère **9a** se révèle hémolytique²² à des concentrations inférieures à 1 g/l, le polymère **A** ne présente aucune activité hémolytique sur les globules rouges humains jusqu'à des concentrations de 10 g/l.

Des résultats tout à fait similaires sont obtenus lors de la polymérisation radicalaire du monomère digalactosylé **8a** (CMC = 1,95 mM). Les particules obtenues, homogènes, sphériques, ont une taille sensiblement plus élevée ($R_h = 173 \text{ \AA}$), modification vraisemblablement liée à la diminution de la grosseur de la tête polaire.

En conclusion, l'irradiation UV des solutions aqueuses de molécules amphiphiles dérivées du Tris glycosylé permet d'accéder à des structures micellaires polymérisées comportant une partie polaire de nature glycosidique. Les résultats préliminaires démontrent leur bonne biocompatibilité et leur stabilité dans le temps. La capacité de ces structures à véhiculer un principe actif est en cours d'évaluation.

Remerciements: Les auteurs remercient Ph.J. Coulomb et Cl. Coulomb (Université d'Avignon) pour leur contribution à la réalisation des mesures de microscopie électronique ainsi que L. Zarif (Université de Nice) pour les mesures du pouvoir hémolytique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) "Carbohydrate Recognition in Cellular Function", *Ciba Found. Symp.*, p.145 ; Block, G., Harnett, S., éditeurs, John Wiley, Chichester, UK, 1989.
- 2) Lemieux, R.U. *Chem. Soc. Rev.*, **18**, 347-374, (1989).
- 3) Stowell, C.P. ; Lee, Y.C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 225-281, (1980).
- 4) Weigel, P.H. ; Schnaar, R.L. ; Kuhlenschmidt, M.S. ; Schmall, E. ; Lee, R.T. ; Lee, Y.C. ; Roseman, S. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10 830-10838, (1979).
- 5) Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J. *Angew. Chem.*, **27**, 113-158 (1988).
- 6) Haensler, J.; Schuber, F. *Glycoconjugate J.* **8**, 116-124 (1991).
- 7) Duncan, R.; Kopecek, J. *Adv. Polym. Sci.*, **57**, 52-101, (1984).
- 8) Pucci, B. ; Ragonnet, B.; Pavia, A.A. *Eur. Polym. J.*, **24**, 1087-1091 (1988).
- 9) Boyer, B.; Durand, S.; Lamaty, G.; Moussamou-Missima, J.M.; Pavia, A.A.; Pucci, B.; Roque, J.P.; Rouvière, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 1311-1317 (1991).
- 10) Pucci, B., Maurizis, J.C.; Pavia, A.A. *Eur. Polym. J.*, **27**, 1101-1106 (1991).
- 11) Pavia, A.A. ; Pucci, B.; Riess, J.G.; Zarif, L. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1**, 103-106 (1991).
- 12) Pavia, A.A.; Pucci, B.; Riess, J.G.; Zarif, L. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, (1993), sous presse.
- 13) Connolly, B.; Townsend, R.R.; Kawaguchi, K.; Bell, W.R.; Lee, Y.C. *J. Biol. Chem.*, **257**, 939-945, (1982).
- 14) Kawaguchi, K.; Kuhlenschmidt, M.; Roseman, S.; Lee, Y.C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 388-395 (1980).
- 15) Lee, Y.C. *Carbohydr. Res.*, **67**, 509-514, (1978).
- 16) Kempen, H.J.M. ; Hoes, C. ; Van Boom, J.H.; Spanjer, H.H.; De Lange, J.; Langendoen, A.; Van Berkel, T.J.C. *J. Med. Chem.*, **27**, 1306-1312, (1984).
- 17) Kempen, H.J.; Kuipers, F.; Van Berkel, T.J.C.; Vonk, R.J. *J. Lipid. Res.*, **28**, 659-666, (1987).
- 18) Helferich, B.; Zinner, J. *Chem. Ber.*, **95**, 2604-2611 (1962).
- 19) Ley, S.V.; Low, C.M.R. "Ultrasound in synthesis", Springer Verlag, (1989).
- 20) Einhorn, C.; Einhorn, J.; Luche, J.L. *Synthesis*, **11**, 787-813, (1989).
- 21) Exemple de galactosylation : Synthèse du 11-N-acrylamido-N-Tris-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactopyranosyloxyméthyl)méthyl undecanamide **6a**.
À une suspension de **1a** (1,57 g, 4,38 mmol) et de HgCN_2 (5g, 19,7 mmol) dans CH_3CN anhydre (50 ml), préalablement agitée 15 mn en présence de 1 g de drierite, on ajoute l'acétobromogalactose fraîchement recristallisé (8,11g, 19,7 mM). Le mélange est soumis 15 mn à l'ultrasonication à 30°C sous atmosphère d'azote (appareil Vibra-Cell, sonde de 13 mm, puissance 7, mode pulsé 50). Le mélange réactionnel est ensuite filtré, les filtrats sont concentrés sous pression réduite. Le résidu repris avec 100 ml d'acétate d'éthyle est lavé successivement avec des solutions de NaHCO_3 saturé, KI à 10%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturé et enfin à l'eau. Après séchage (Na_2SO_4) et évaporation du solvant, l'huile obtenue est chromatographiée sur colonne de silice (éluant AcOEt/Hexane 8:2). On isole 1,7 g de produit **6a** pur (Rdt : 30%) F = 79°C.
- 22) Zarif, L.; Greiner, J.; Pace, S.; Riess, J.G. *J. Med. Chem.*, **33**, 1262-1269 (1990).