



**Conception de nouveaux bioconjugués "squalénisés"
anticancéreux dotés de propriétés d'auto-assemblage :
synthèse, caractérisation des nanoparticules et
évaluation biologique**

Joachim Caron

► **To cite this version:**

Joachim Caron. Conception de nouveaux bioconjugués "squalénisés" anticancéreux dotés de propriétés d'auto-assemblage : synthèse, caractérisation des nanoparticules et évaluation biologique. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114825 . tel-00819390

HAL Id: tel-00819390

<https://theses.hal.science/tel-00819390>

Submitted on 1 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

CHIMIE ORGANIQUE

ANNÉE 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1113

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/09/2011

par

Joachim CARON

Conception de nouveaux bioconjugués « squalénisés »
anticancéreux dotés de propriétés d'auto-assemblage :
synthèse, caractérisation des nanoparticules et évaluation
biologique

Directeur de thèse : Didier DESMAËLE

Directeur de Recherche (Université Paris-Sud)

Composition du jury :

Rapporteurs :

Isabelle RICO-LATTES
Laurent MICOUIN

Examineurs :

Patrick COUVREUR
Françoise GUERITTE
Jean-François MOUSCADET

Directeur de Recherche (Université Paul Sabatier)
Directeur de Recherche (Université Paris Descartes)
Professeur (Université Paris-Sud)
Directeur de Recherche (Université Paris-Sud)
Directeur de Recherche (ENS Cachan)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Didier Desmaële, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli au Laboratoire dès mon stage de Master et qui a été omniprésent tout au long de ma thèse. Il m'a énormément appris en chimie et en sciences et m'a permis de m'épanouir pendant ces 3 ans. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.

Un grand merci également au Pr. Patrick Couvreur qui m'a permis de travailler sur ce projet, qui a toujours été très disponible et a accepté de faire parti de mon jury de thèse

Ce travail de thèse a été jugé par le Dr. Isabelle Rico-Lattes et le Dr. Laurent Micouin, que je souhaite remercier vivement.

Merci également au Dr. Françoise Guéritte et au Dr. Jean-François Mouscadet qui ont accepté de juger mes travaux de thèse.

J'exprime ma sincère gratitude au Dr. Andrey Maksimenko qui m'a appris la culture cellulaire, grâce à quoi j'ai pu réaliser les tests d'activité *in vitro* des différents bioconjugués synthétisés au cours de ma thèse.

Je remercie également le Professeur Christian Cavé, qui a lu ce mémoire, a fait des remarques très constructives et m'a ainsi permis d'y apporter de nombreuses corrections.

Merci au Pr. Thierry Martens et au Dr. Michael Rivard, qui m'ont accueilli dans leur Laboratoire pour effectuer les réactions d'oxydation des oxazaphosphorines. Je remercie également le Dr. Bernard Rousseau ainsi que Sébastien Garcia-Argotte pour m'avoir accueilli au CEA, concernant la synthèse des conjugués radiomarqués du ddI.

Je remercie également le futur Dr. Zacharias Amara, avec qui j'ai passé de très bons moments au Laboratoire et lors des différents congrès auxquels nous avons participé.

Merci à mes collègues du Laboratoire, le Dr. Eric Sliwinski, le Dr. Fatima Zouhiri, le Dr. Frédéric Hendra, Trung Bui Duc et le Dr. Sinda Lepêtre-Mouelhi et également aux anciens membres, Faten Sliman, Anthony Kermagoret et Michèle Danet, avec qui j'ai passé de bons moments.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	4
I. INTRODUCTION	7
I.1. Le cancer	7
I.2. La chimiothérapie anticancéreuse	8
I.2.1. Les agents alkylants	8
I.2.2. Les antimétabolites	11
I.2.3. Les agents intercalants	13
I.2.4. Les agents antimitotiques	15
I.2.5. Les inhibiteurs de kinases intracellulaires	16
I.2.6. Les autres médicaments	17
I.3. Les nanomédicaments	17
I.4. Une nouvelle stratégie de vectorisation : la squalénisation, l'exemple de la Gemcitabine	21
I.4.1. La Gemcitabine et ses prodrogues	21
I.4.2. La Gemcitabine-squalène	25
I.5. Etat des travaux du Laboratoire	33
I.6. Objectifs des travaux	35
II. EXPOSE DES TRAVAUX	38
II.1. La Gemcitabine-squalène monophosphate	38
II.1.1. Objectif des travaux	38
II.1.2. Les différentes méthodes de phosphorylation des nucléosides	41
II.1.2.1. Utilisation des réactifs au phosphore (V)	43
II.1.2.2. Utilisation des réactifs au phosphore (III)	46
II.1.2.3. Phosphorylations enzymatiques	49
II.1.2.4. Conclusion	50
II.1.3. Exposé des travaux	51
II.1.3.1. Squalénisation directe de la Gemcitabine monophosphate	57

II.1.3.2. <i>Phosphorylation de la ddC-SQ</i>	19	54
II.1.3.3. <i>Synthèse de la Gemcitabine-squalène monophosphate</i>	31	60
II.1.3.4. <i>Préparation et caractérisation des nanoparticules de 31a et 31b</i>		70
II.1.3.5. <i>Evaluation de l'activité anticancéreuse in vitro</i>		75
II.1.4. Conclusion et Perspectives		77
II.2. Une approche originale pour vectoriser le Paclitaxel		79
II.2.1. Introduction		79
II.2.1.1. <i>Le Paclitaxel</i>		79
II.2.1.2. <i>Limitations du Taxol</i>		81
II.2.1.3. <i>Formes nanoparticulaires du Paclitaxel</i>		82
II.2.1.4. <i>Nouvelles prodrogues du Paxclitaxel</i>		85
II.2.1.5. <i>Squalénisation du Paclitaxel</i>		95
II.2.2. Objectif des travaux		97
II.2.3. Exposé des travaux		99
II.2.3.1. <i>Synthèse du conjugué du Paclitaxel</i>	106	99
II.2.3.2. <i>Nouveaux bioconjugués du Paclitaxel</i>		111
II.2.3.3. <i>Préparation et optimisation des nanoparticules</i>		125
II.2.3.4. <i>Caractérisation des nanoparticules</i>		129
II.2.3.5. <i>Evaluation biologique in vitro des prodrogues</i>		131
II.2.4. Conclusion et Perspectives		134
II.3. Squalénisation du Cisplatine		136
II.3.1. Introduction		136
II.3.1.1. <i>Le Cisplatine</i>		136
II.3.1.2. <i>Nouveaux complexes du platine</i>		139
II.3.1.3. <i>Vers une meilleure distribution du platine dans les tumeurs</i>		143
II.3.2. Objectif des travaux		153
II.3.3. Exposé des travaux		155
II.3.3.1. <i>Synthèse de la 1,1',2-trisnor-squalénamine</i>	206	155
II.3.3.2. <i>Synthèse du Cisplatine bis-squalène</i>	205	157
II.3.3.3. <i>Synthèse du Cisplatine mono-squalène</i>	204	158
II.3.3.4. <i>Préparation et caractérisation des nanoparticules</i>		160
II.3.3.5. <i>Evaluation biologique in vitro</i>		163

II.3.3.6. <i>Evaluation biologique in vivo</i>	164
II.3.4. Conclusion et Perspectives	167
II.4. Squalénisation de l’Ifosfamide	169
II.4.1. Introduction	169
II.4.2. Objectif des travaux	175
II.4.3. Exposé des travaux	177
II.4.3.1. <i>Synthèse des dérivés squalénisés 229 et 230 de l’Ifosfamide</i>	177
II.4.3.2. <i>Préparation et caractérisation des nanoparticules</i>	181
II.4.3.3. <i>Evaluation biologique in vitro</i>	182
II.4.4. Conclusion et Perspectives	184
II.5. Synthèse de bola-médicaments	185
II.5.1. Introduction	185
II.5.2. Objectif des travaux	193
II.5.3. Exposé des travaux	195
II.5.3.1. <i>Synthèse du diacide squalénique 247</i>	195
II.5.3.2. <i>Synthèse du bola-conjugué du Paclitaxel 244</i>	196
II.5.3.3. <i>Synthèse du bola-conjugué de la Gemcitabine 245</i>	197
II.5.3.4. <i>Synthèse du bola-conjugué mixte Gemcitabine/Paclitaxel 246</i>	200
II.5.3.5. <i>Préparation et caractérisation des nanoparticules</i>	202
II.5.3.6. <i>Evaluation biologique in vitro</i>	204
II.5.4. Conclusion et Perspectives	205
III. CONCLUSION GENERALE	206
IV. PARTIE EXPERIMENTALE	209
IV.1. Généralités et appareillages	209
IV.2. Gemcitabine-squalène monophosphate	211
IV.3. Conjugués hybrides du Paclitaxel	233
IV.4. Cisplatine mono-squalène et Cisplatine bis-squalène	277
IV.5. Ifosfamide-squalène	283
IV.6. Bola-conjugués	287
V. BIBLIOGRAPHIE	298

ABBREVIATIONS

4-DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

5-FdU : 5-Fluorodéoxyuridine

5-FU : 5-Fluorouracile

10-DAB III : 10-déacétylbaccatine III

ABL1 : Abelson Murine Leukemia viral oncogene homolog 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

APTS : Acide *para*-toluènesulfonique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosinetriphosphate

AZT : 3'-Azidothymidine

CDDP : Cis-diamminodichloroplatinum (IV)

CDI : Carbonyldiimidazole

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

CTR1 : Copper Transporter Receptor 1

DBU : 1,8-Diazabicycloundéc-7-ène

dC : 2'-Déoxycytidine

dCK : Déoxycytidine kinase

DCM : Dichlorométhane

Gemcitabine : 2,2'-Difluoro-2'-déoxycytidine

GemcitabineDP : 2,2'-Difluoro-2'-déoxycytidine diphosphate

GemcitabineMP : 2,2'-Difluoro-2'-déoxycytidine monophosphate

GemcitabineTP : 2,2'-Difluoro-2'-déoxycytidine triphosphate

ddC : 2',3'-Didéoxycytidine

ddI : 2',3'-Didéoxyinosine

DHA : Docosaheptaenoic acid

DHP : Dihydropyran

DIPC : *N,N*-Diisopropylcarbodiimide

DIPEA : *N,N*-diisopropyl-*N*-éthylamine

DME : 1,2-Diméthoxyéthane

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF : *N,N*-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMT : Dose maximale tolérée

DMTrCl : Dimethoxytrityl chloride

DSPC : 1,2-Distéaroyl-phosphatidylcholine

DSPG : 1,2-Distéaroyl-phosphatidylglycérol

EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

EPR : Enhanced permeability and retention

GPP : Glycoprotéine P

HATU : 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)--1,1,3,3-tetraméthyl uronium hexafluorophosphate

hCNT1 : human concentrative nucleoside transporter 1

hCNT3 : human concentrative nucleoside transporter 3

hENT1 : human equilibrative nucleoside transporter 1

hENT2 : human equilibrative nucleoside transporter 2

HMGB1 : High-mobility group protein B1

HMPA : Hydroxypropylméthacrylamide

HMPC : Hydroxypropylméthylcellulose

HPLC : High performance liquid chromatography

LAH : Lithium and aluminium hydride

MET : Microscopie électronique en transmission

MTT : (3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaHMDS : Sodium hexamethyldisilazane

NBS : *N*-Bromosuccinimide

NCI : National Cancer Institute

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

PDI : Polydispersity Index

PEG : Polyéthylèneglycol

PPTS : Pyridinium *para*-toluènesulfonate

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPB : Récepteurs périphériques de benzodiazépines

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SAXS : Small angle X-ray scattering

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

TAP : Trialkylphosphate

TBAF : Tetrabutylammonium fluoride

TBDMSCl : *Tert*-butyldimethylsilyl chloride

TBHP : *Tert*-butylhydroperoxide

TFA : Trifluoroacetic acid

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyrane

TMSBr : Trimethylsilyl bromide

TMSCl : Trimethylsilyl chloride

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

I. INTRODUCTION

I.1. Le cancer

Un cancer est une pathologie caractérisée par la présence d'une ou plusieurs tumeurs malignes formées par la multiplication désordonnée d'une cellule initialement normale, à la suite d'une mutation et/ou d'une instabilité génétique. Certaines tumeurs primaires peuvent évoluer vers un envahissement plus global de l'organisme, par échappement de cellules tumorales issues de cette tumeur primaire, provoquant des métastases qui constituent la principale cause de décès.

En 2008, 12,6 millions de nouveaux cas ont été dépistés à travers le monde et le cancer a causé cette même année 7,5 millions de décès. Il pourrait y avoir plus de 20 millions de nouveaux cas de cancer par an en 2030 et près de 13 millions de décès par an.¹

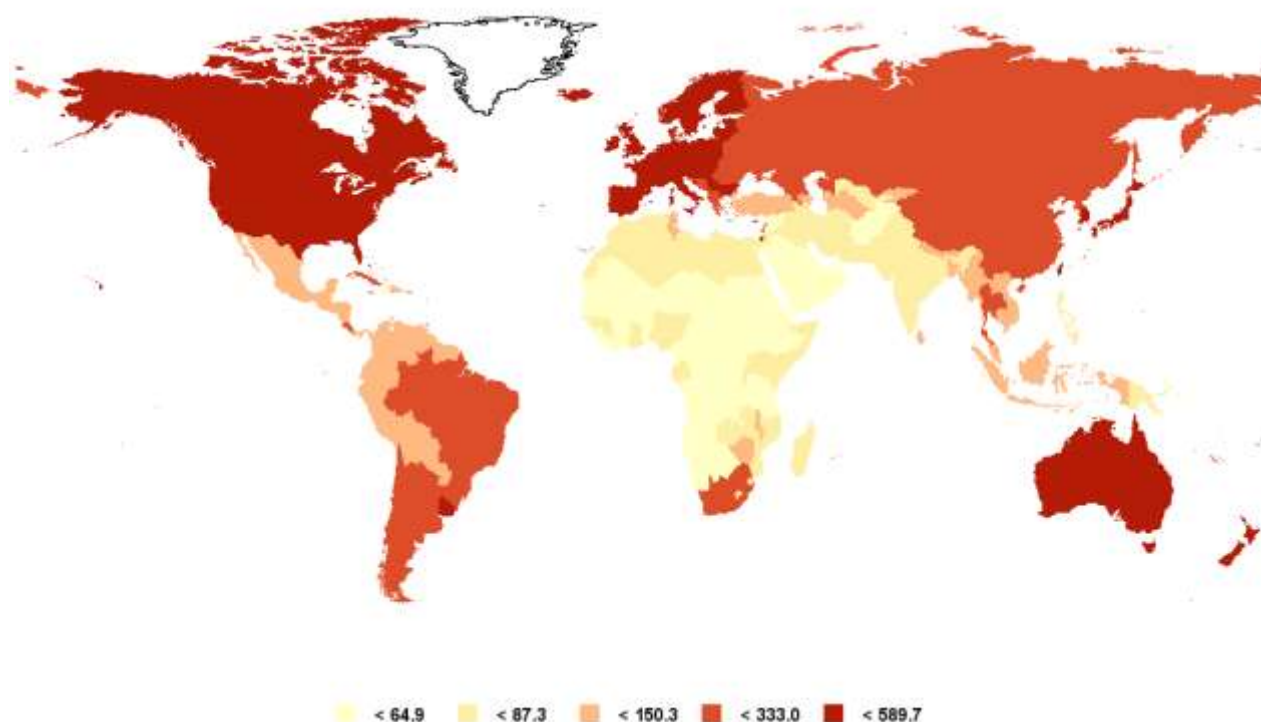


Schéma 1. Taux brut d'incidence des cancers en fonction des régions du monde pour 100000 habitants

Les taux d'incidence et de mortalité due au cancer sont très variables en fonction des régions du monde. Le taux brut d'incidence est plus élevé dans les régions développées (Amérique du Nord, Europe, Océanie) que dans les pays les plus pauvres (**Schéma 1**). Nous observons également des variations au niveau du taux d'incidence en fonction de l'âge et du sexe. Par exemple, le risque de développer un cancer avant 75 ans est de 21,2 % pour un homme et de 16,5 % pour une femme. Enfin, les cancers les plus fréquents sont les cancers du sein, du poumon, de la prostate ou encore le cancer colorectal.

La lutte contre le cancer passe par la prévention, le dépistage et les différents traitements existants incluant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie. La chimiothérapie tient cependant une place prédominante dans les traitements anticancéreux.

I.2. La chimiothérapie anticancéreuse

La chimiothérapie anticancéreuse consiste à administrer une ou plusieurs substances, capables de tuer les cellules cancéreuses ou d'empêcher leur prolifération. Il en existe plusieurs grandes classes divisées chacune en plusieurs familles, en fonction de leur mode d'action ou de leur cible.

I.2.1. Les agents alkylants

Ces molécules possèdent un ou plusieurs sites électrophiles qui leur permettent d'interagir directement avec les chaînes d'ADN au niveau des bases nucléiques en formant des liaisons covalentes entre celles-ci. Ceci empêche la réplication de l'ADN et par conséquent la prolifération des cellules cancéreuses.

La Chlorméthine (Caryolysine®) est le plus ancien composé de cette classe. Elle fait partie de la famille des moutardes à l'azote, par référence au gaz moutarde utilisé lors des combats au cours du premier conflit mondial. La Chlorméthine est encore utilisée en clinique, plus particulièrement pour le traitement de la maladie de Hodgkin en association avec la Vincristine, la Procarbazine et la Prednisone. Le Chlorambucil (Chloraminophène®), développé quelques années

plus tard, est indiqué dans la leucémie lymphoïde chronique et les lymphomes non Hodgkiniens. Enfin, le Melphalan (Alkéran®), un analogue aminé du Chlorambucil dont il existe une forme orale et une forme injectable, est indiqué pour le traitement du myélome multiple chez le sujet âgé et des adénocarcinomes ovariens aux stades avancés.

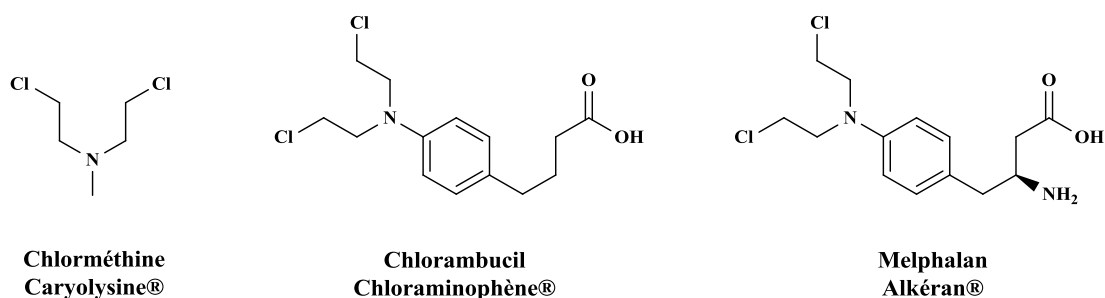


Figure 1. Moutardes à l'azote

Les oxazaphosphorines comme le Cyclophosphamide (Endoxan®) et l'Ifosfamide (Holoxan®) agissent comme la Chlorméthine après métabolisation par les cytochromes et libération d'une moutarde à l'azote. Ils sont notamment utilisés pour le traitement du cancer de l'ovaire et des sarcomes.

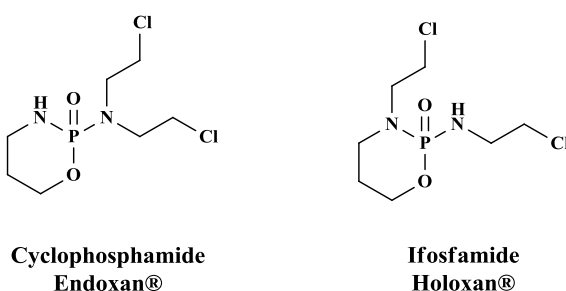


Figure 2. Oxazaphosphorines

Les nitrosourées constituent également une famille importante des agents alkylants. Les principaux composés utilisés en chimiothérapie sont la Lomustine (Bélustine®) et la Carmustine (Bicnu®). Elles sont utilisées dans le traitement des tumeurs cérébrales, des lymphomes et des mélanomes malins.

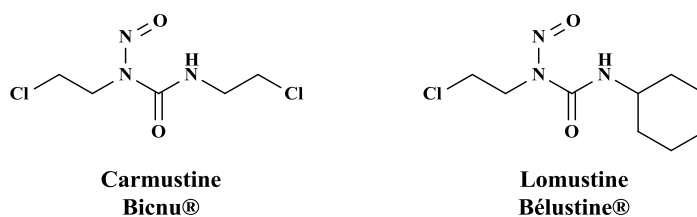


Figure 3. Nitrosourées

Les organoplatinés, dont le chef de file est le Cisplatine (Cisplatyl®) sont également très utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Les analogues les plus importants sont le Carboplatine (Carboplatine®) et l'Oxaliplatine (Eloxatine®). Le Carboplatine et le Cisplatine sont indiqués pour les traitements de lymphomes hodgkiniens ou non hodgkiniens en rechute et également pour les cancers du testicule, de l'ovaire et du poumon. L'Oxaliplatine est quant à lui prescrit principalement dans les cancers colorectaux, souvent en association avec le 5-fluorouracile.

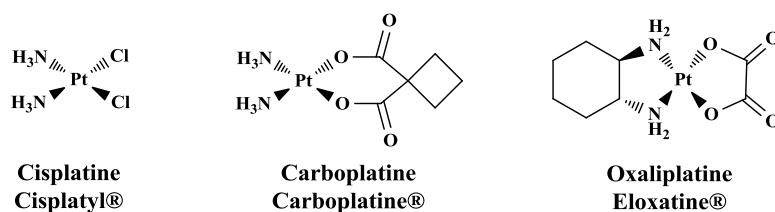


Figure 4. Organoplatinés

D'autres agents alkylants comme les aziridines sont également utilisés en chimiothérapie. La Mitomycine C (Améticine®) et le Thiotépa (Thiotépa®) sont respectivement indiqués pour le traitement des adénocarcinomes et des cancers du sein et de l'ovaire.

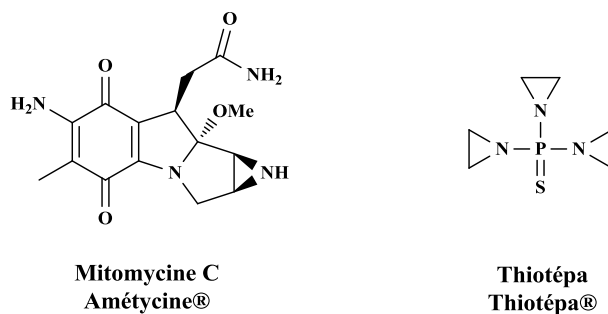
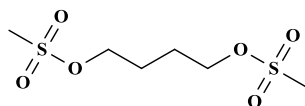


Figure 5. Aziridines

Enfin, le Busulfan (Myleran®, Busilvex®) est un ester sulfonique, induisant des pontages entre bases d'un même brin au niveau des cellules de la moelle osseuse, indiqué principalement pour la préparation à la greffe de cellules souches hématopoïétiques.



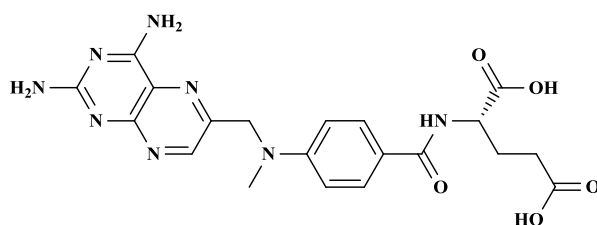
Busulfan
Myleran®, Busilvex®

Figure 6

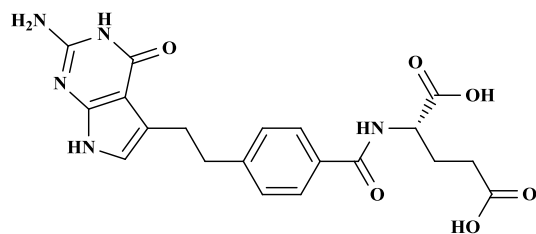
I.2.2. Les antimétabolites

Ces composés agissent sur la synthèse des acides nucléiques par remplacement des bases nucléiques naturelles dans les chaînes en croissance ou par inhibition de leur voie de synthèse.

Les antifoliques constituent une famille à part entière de la classe des antimétabolites dont le plus utilisé est le Méthotrexate (Méthotrexate®, Ledertrexate®, Novatrex®, Metoject®). Il peut être administré par voie intramusculaire, intraveineuse ou orale pour les faibles posologies et est indiqué pour le traitement de différentes tumeurs solides et de la leucémie aiguë lymphoblastique. Le Pemetrexed (Alimta®), un autre analogue de l'acide folique, est indiqué dans le traitement du cancer bronchique à grandes cellules, en monothérapie ou en association avec le Cisplatine.



Méthotrexate
Méthotrexate®, Ledertrexate®
Novatrex®, Metoject®



Pemetrexed
Alimta®

Figure 7. Antifoliques

Les antipuriques empêchent la synthèse des chaînes d'ADN en se substituant aux nucléosides naturels puriques, la guanosine et l'adénosine. Le premier composé de cette classe à avoir été utilisé en chimiothérapie, la 6-Mercaptopurine (Purinéthol®), est indiqué pour le traitement des leucémies aiguës. Par la suite, la Cladribine (Leustatine®, Litak®) et la Fludarabine (Fludara®, formes injectable et orale) ont été développées et sont maintenant indiquées pour le traitement de la leucémie lymphoïde.

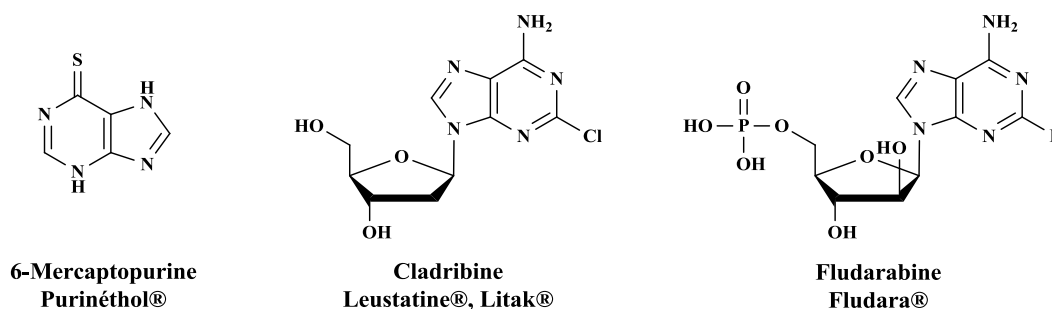


Figure 8. Antipuriques

Enfin, les antipyrimidiques empêchent l'élargissement des chaînes d'ADN en se substituant à la cytidine et à la thymidine, qui contiennent une pyrimidine comme base azotée. La Cytarabine (Aracytine®) et la Gemcitabine (Gemzar®) sont des analogues de la cytidine, tandis que le 5-Fluorouracile (Efudix®) est un analogue fluoré de l'uracile. Ce dernier inhibe la transformation de l'uracile en thymine et est utilisé pour traiter les patients atteints d'adénocarcinomes digestifs évolués et de cancer colorectal. La Cytarabine (Aracytine®) a été le premier antipyrimidique utilisé en chimiothérapie et est indiqué pour le traitement de différentes leucémies. La Gemcitabine (Gemzar®) quant à elle, est utilisée en première intention pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas et du cancer bronchique.

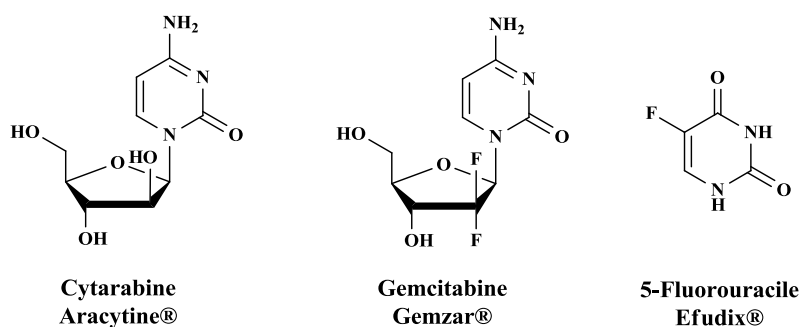


Figure 9. Antipyrimidiques

I.2.3. Les agents intercalants

Ces composés sont des molécules planes qui agissent en s'insérant entre deux paires de bases azotées. Les complexes ainsi obtenus bloquent les fourches de réplication, induisant l'apoptose des cellules cancéreuses.

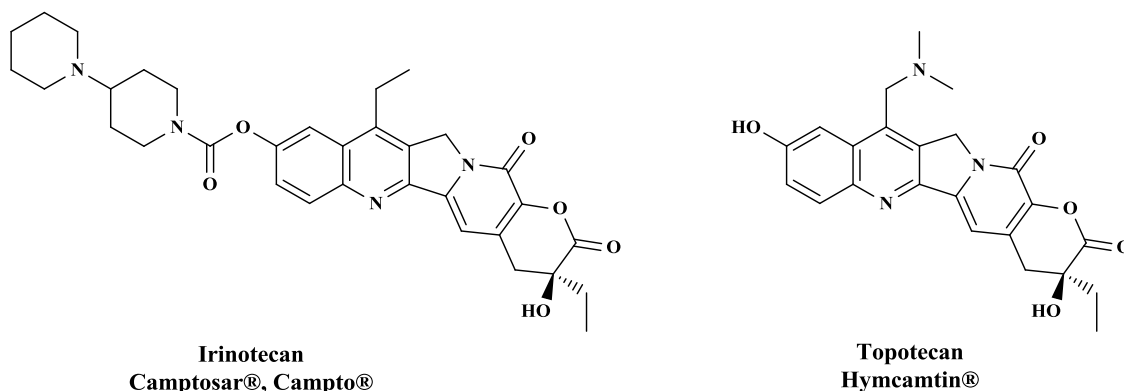
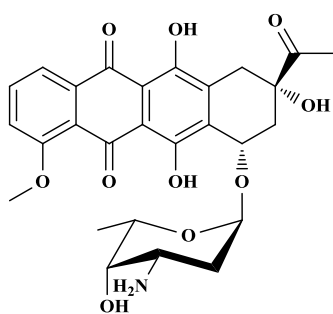


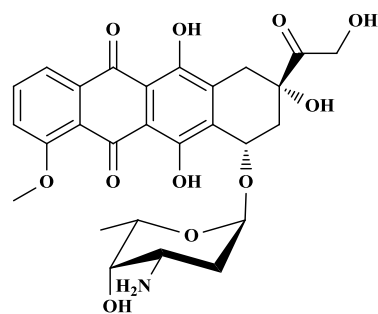
Figure 10. Inhibiteurs de topoisomérase I

L'Irinotécan (Camptosar®, Campto®) et le Topotécan (Hymcamtin®) sont dérivés de la Camptothécine inhibiteurs de topoisomérase I. Ils sont utilisés respectivement pour traiter les patients atteints de cancers colorectaux avancés et ceux atteints de carcinome de l'ovaire ou du col utérin.

La Daunorubicine (Cérubidine®, Daunoxome®) et la Doxorubicine (Adriblastine®, Caelyx®, Myocet®) sont des anthracyclines inhibitrices de topoisomérase II. La Daunorubicine est utilisée sous une forme injectable (Cérubidine®) contre les leucémies et sous une forme liposomale injectable (Daunoxome®) pour traiter les patients atteints du sarcome de Kaposi associé au SIDA. De même, il existe une forme injectable pour la Doxorubicine (Adriblastine®) indiquée pour le traitement des cancers du sein, de l'ovaire, du poumon et de la vessie, de la maladie de Hodgkin, des leucémies aiguës et des lymphomes non hodgkinien, et des formes liposomales injectables (Caelyx® et Myocet®) prescrites en cas de Sarcome de Kaposi associé au SIDA ou de cancer du sein métastatique.



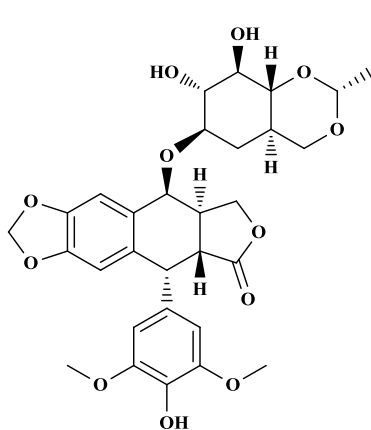
Daunorubicine
Cérubidine®, Daunoxome®



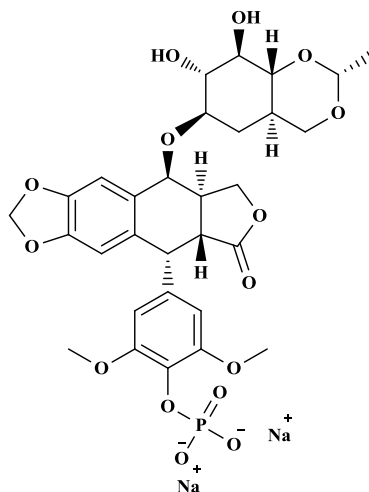
Doxorubicine
Adriblastine®, Caelyx®, Myocet®

Figure 11. Inhibiteurs de topoisomérase II

L'Etoposide (Celltop®, Vépéside®), un analogue de la Podophyllotoxine, est également un inhibiteur de topoisomérase II. Il est administré par voie intraveineuse pour le traitement du cancer du poumon, des tumeurs du testicule et des neuroblastomes. Il existe également une prodrogue phosphatée (Etopophos®), présentant l'avantage d'être plus soluble dans l'eau, ce qui facilite son administration parentérale.



Etoposide
Celltop®, Vépéside®



Phosphate d'étoposide
Etopophos®

Figure 12. Analogues de la Podophyllotoxine

I.2.4. Les agents antimitotiques

Ces composés bloquent la mitose cellulaire en agissant sur le fuseau mitotique. Les premiers à avoir été utilisés en clinique sont les alcaloïdes extraits de la Pervenche de Madagascar qui empêchent la polymérisation des dimères de tubuline en microtubules. Les principaux représentants de cette famille d'anticancéreux sont la Vinblastine (Velbe®), la Vindésine (Eldisine®), la Vincristine (Oncovin®) et la Vinorelbine (Navelbine®). Tous ces composés sont utilisés dans le traitement de nombreux cancers dont celui du sein et la maladie de Hodgkin.

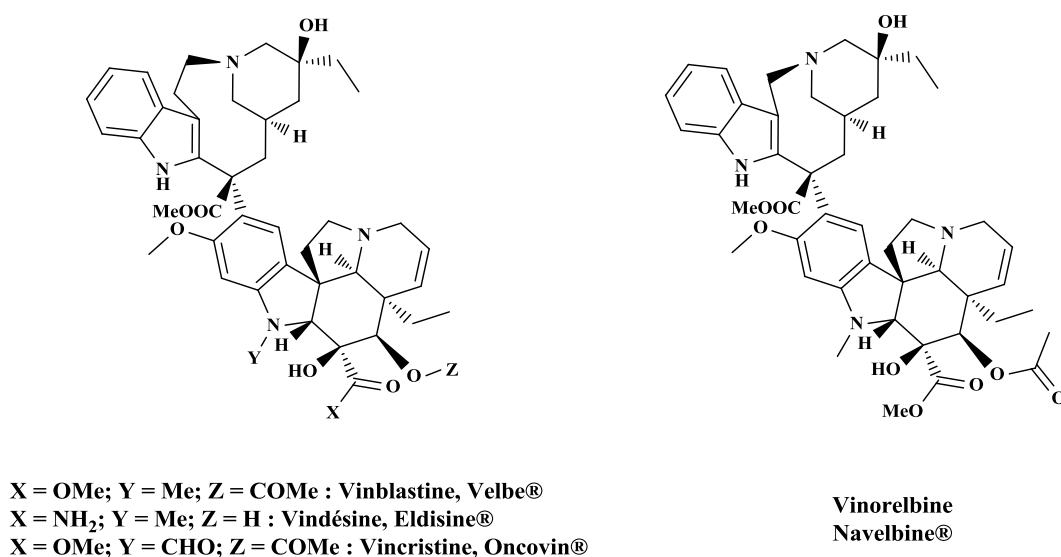


Figure 13. Alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar

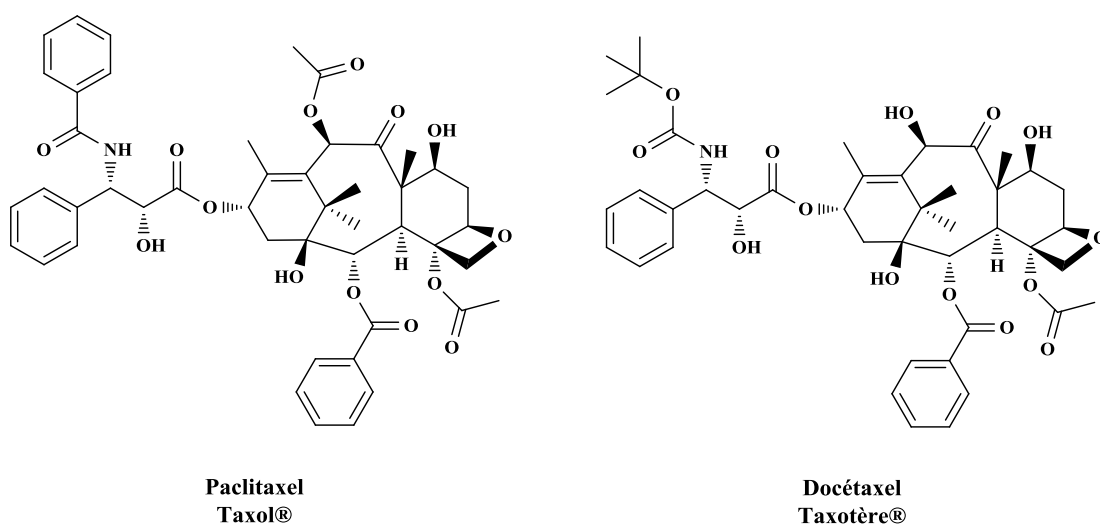


Figure 14. Taxanes

Les taxanes quant à eux, inhibent la dépolymérisation des microtubules en tubuline, empêchant ainsi la mitose et provoquant la mort cellulaire. Le Paclitaxel (Taxol®) et le Docétaxel (Taxotère®) sont les deux seuls taxanes indiqués en chimiothérapie anticancéreuse, notamment pour traiter les patientes atteintes de cancer du sein ou ceux atteints de cancer bronchique.

I.2.5. Les inhibiteurs de kinases intracellulaires

Cette classe d'anticancéreux est apparue beaucoup plus récemment dans le cadre des chimiothérapies. L'Imatinib (Glivec®), indiqué dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestinales, en est le chef de file. Il agit en inhibant la tyrosine kinase ABL1 exprimée par un oncogène localisé sur le chromosome 9, empêchant sélectivement la prolifération cellulaire. L'Erlotinib (Tarceva®), le Sorafénib (Nexavar®) et le Dasatinib monohydraté (Sprycel®) font également partie de cette classe d'anticancéreux et sont indiqués dans les traitements du cancer du poumon, du carcinome rénal avancé ou encore de la leucémie aiguë lymphoblastique.

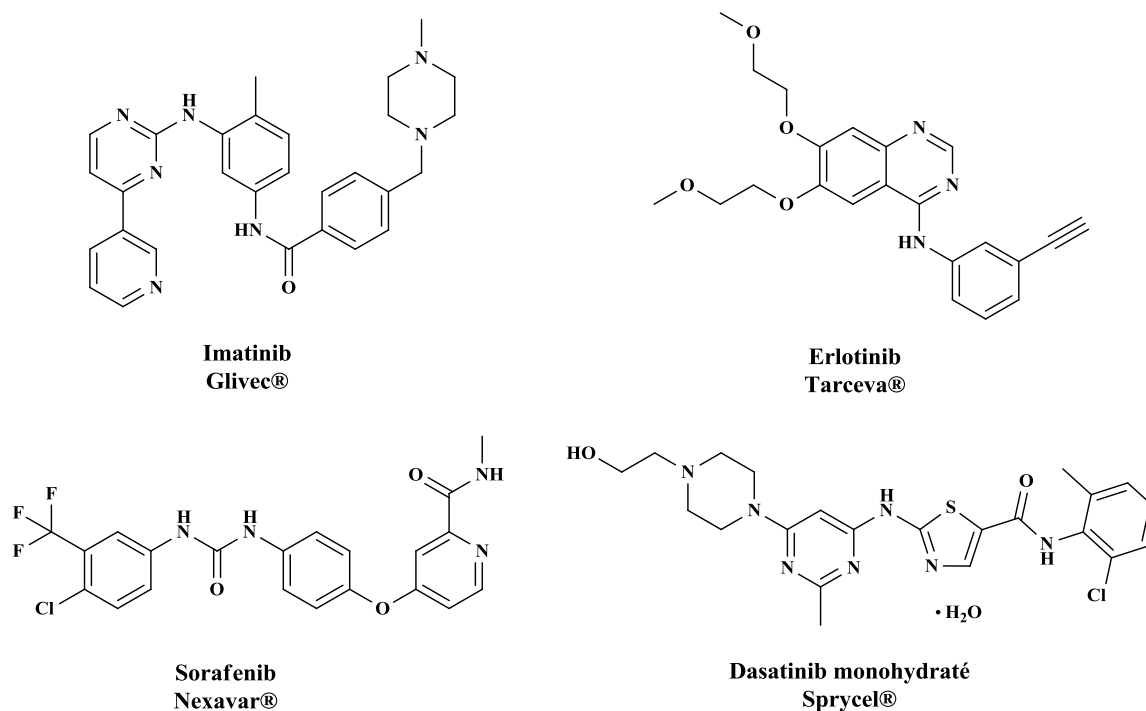


Figure 15. Inhibiteurs de kinases intracellulaires

I.2.6. Les autres médicaments

A côté des grandes familles de molécules que nous venons de voir, d'autres produits viennent compléter cet arsenal thérapeutique. La Bléomycine (Bléomycine®), par exemple, agit par fragmentation de l'ADN et est indiquée dans le traitement de nombreux cancers comme les carcinomes épidermoïdes, la maladie de Hodgkin ou encore les lymphomes non hodgkiniens. L'interféron α est également utilisé en chimiothérapie dans le traitement des leucémies à tricholeucocytes ou myéloïdes chroniques et le sarcome de Kaposi associé au SIDA. Il agit comme agent antiprolifératif en allongeant toutes les phases du cycle cellulaire.

Les anticorps monoclonaux ont été développés lors des 15 dernières années. Ils sont capables de reconnaître des marqueurs spécifiques de certains types tumoraux et déclenchent une réponse immune, entraînant la destruction des cellules reconnues. Les principaux représentants de cette classe de composés sont le Trastuzumab (Herceptin®), le Gemtuzumab Ozogamycin (MyloTarg®) et l'Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®).

Il existe encore d'autres traitements antitumoraux, comme les radioisotopes (Samarium-153 Lexidromam, Quadramet®), les photosensibilisants ou encore les traitements hormonaux et anti-hormonaux. Le Tamoxifène (Nolvadex®, Kessar®), par exemple, est un antiœstrogène, agissant par inhibition compétitive de la liaison de l'œstradiol avec ses récepteurs. Il est utilisé pour le traitement des cancers du sein.

Cette liste n'est cependant pas exhaustive, et il existe de nombreux autres traitements utilisés aujourd'hui en chimiothérapie. De nombreux composés sont également en études cliniques et devraient obtenir une AMM dans les années qui viennent, bien que le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché tende à diminuer.

I.3. Les nanomédicaments

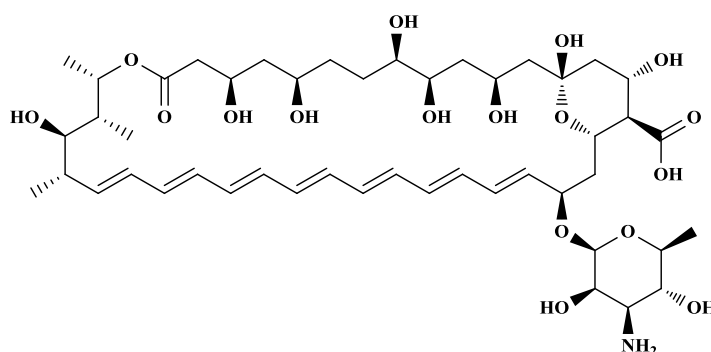
En dépit des progrès considérables qui ont été effectués pour étendre l'arsenal des composés antitumoraux, la plupart des traitements existants souffrent de limitations, comme l'apparition de résistances, une dégradation prématurée du principe actif dans l'organisme, ou encore l'existence de nombreux effets secondaires dus à un manque de sélectivité. Les nouveaux défis qui se posent au chercheur médicinal ne résident donc plus seulement en la synthèse de nouvelles molécules plus actives mais en l'élaboration d'un médicament se rapprochant le plus possible d'une « balle magique » capable d'amener le principe actif à sa cible sans aucun dommage collatéral. Le développement récent des nanotechnologies et leur application au domaine des médicaments ouvrent des perspectives pour l'administration de principes actifs ou l'imagerie médicale, et sont en train de révolutionner la recherche médicale.²⁻⁴

A l'origine, le terme « nanotechnologie » a été introduit en référence à des matériaux de petite taille allant de 1 à 100 nanomètres. Aujourd'hui, il est utilisé pour des objets allant jusqu'à quelques centaines de nanomètres de diamètre moyen.⁵ Différents types de nano-objets ont été découverts, du liposome jusqu'aux nanoparticules solides, en passant par les micelles polymériques, les nanocristaux ou les nanocapsules.⁶

La formulation de médicaments sous forme de nanoparticules permet de s'affranchir des limitations liées au profil physico-chimique de nombreux principes actifs. Par exemple, une molécule insoluble dans l'eau pourra être administrée sous forme de suspension aqueuse. Une autre, dégradée dans le milieu physiologique sera protégée des enzymes lytiques.

Même si le développement des nanomédicaments semble être la solution à beaucoup de problèmes pharmaceutiques, seulement une dizaine de ces formulations sont actuellement commercialisées.⁶ Il s'agit le plus souvent de formes liposomales composées de phospholipides amphiphiles et de cholestérol qui s'auto-associent en bicouches en encapsulant un cœur aqueux. La plupart des liposomes ont une taille inférieure ou égale à 400 nanomètres de diamètre. Ces nano-objets permettent l'encapsulation de molécules de polarité extrêmement variable. Le composé peut se trouver dans la bicouche phospholipidique, dans la cavité aqueuse ou encore à l'interface de la bicouche. Malheureusement, des problèmes majeurs limitent le développement industriel de ces formulations, comme une faible stabilité, la mauvaise reproductibilité entre les différents lots, des difficultés au niveau de la stérilisation et le faible taux de charge en principe actif. Il existe cependant des succès notables comme l'Abraxane® ou encore les formes liposomales de la Doxorubicine et de la Daunorubicine, ainsi que celles de l'Amphotéricine B.

L'Amphotéricine B est un antifongique systémique majeur, commercialisé sous le nom de Fungizone®, agissant en altérant la membrane fongique des levures et des champignons (**Figure 16**). Elle est indiquée dans le traitement des mycoses systémiques opportunistes ou exotiques et des leishmanioses stibio-résistantes. Cependant, ce traitement provoque de nombreux effets indésirables, notamment une néphrotoxicité dose-dépendante. Pour palier ces inconvénients, plusieurs formes colloïdales ont été développées, l'Abelcet® et l'Ambisome®, constituées de liposomes de phospholipides encapsulant l'Amphotéricine B.⁶ Ces deux formulations affichent une faible néphrotoxicité et sont par conséquent indiquées chez les sujets ayant développé une insuffisance rénale lors du traitement avec Fungizone® ou ceux ayant une insuffisance rénale préexistante.



Amphotéricine B

Figure 16

Dans le domaine du cancer, on peut noter les formes liposomales de la Doxorubicine (Caelyx®, Myocet®), et du citrate de Daunorubicine (DaunoXome®),^{7,8} actuellement utilisées en clinique dans le cadre du traitement du sarcome de Kaposi associé au SIDA. L'administration de ces composés sous cette nouvelle forme pharmaceutique provoque moins d'alopécies et de neuropathies, et bénéficie surtout d'une cardiotoxicité moindre par rapport à la forme injectable classique. La réduction de la toxicité cardiaque aiguë qui est un des effets secondaires majeurs des anthracyclines constitue un progrès thérapeutique indéniable.

Le Paclitaxel est une molécule lipophile insoluble dans l'eau qui doit être dispersée dans du Crémophore EL pour être administrée chez les patients. Celui-ci peut provoquer des réactions d'hypersensibilité souvent fatales.^{9,10} De plus cet adjuvant peut diminuer la pénétration dans la tumeur, limitant ainsi l'efficacité du traitement.¹¹ Dans le but d'administrer le Paclitaxel sous une forme galénique ne contenant pas de Crémophore EL, de nombreuses études ont été menées. Des nanoparticules d'albumine encapsulant le Paclitaxel, présentant une taille moyenne de 130

nanomètres ont ainsi été développées par les sociétés Abraxis BioScience et AstraZeneca sous le nom commercial d'Abraxane®.^{12,13} Cette nouvelle formulation s'est avérée plus efficace que la formulation crémophile dans des études précliniques sur un modèle humain du cancer du sein chez la Souris.¹⁴ Il a été démontré que le Paclitaxel encapsulé dans l'Abraxane® pénètre mieux dans les cellules cancéreuses que le Paclitaxel libre. Les études cliniques de phase I à III qui ont suivies, ont montré que cette nouvelle formulation était également plus efficace que le Taxol chez des patientes atteintes de cancers du sein et de cancers du sein métastasés.¹⁵⁻¹⁸ De plus, une administration hebdomadaire d'Abraxane® provoque beaucoup moins d'effets toxiques secondaires et notamment de réactions d'hypersensibilités que le Taxol®. Cette diminution des effets indésirables permet d'administrer des doses plus importantes, ce qui explique en partie le gain d'efficacité observé chez la majorité des patientes.¹⁸ Par conséquent, l'Abraxane® est maintenant indiqué en monothérapie dans le traitement du cancer du sein métastatique.

D'autres spécialités sont commercialisées sous forme de nanocristaux.⁶ Les nanocristaux sont des nanoparticules avec un caractère cristallin d'une taille de l'ordre du nanomètre. Ils présentent l'avantage d'avoir un taux de charge de 100 %, leur préparation ne nécessitant aucun matériau vecteur, contrairement aux nanoparticules polymériques.

Quelques unes de ces formulations sont commercialisées et utilisées en clinique (**Figure 17**), comme le Sirolimus (Rapamune®), un immunosuppresseur prescrit pour la prévention du rejet d'organe lors des transplantations en association avec des corticoïdes et la Ciclosporine. L'Aprepitant (Emend®) est un antiémétique utilisé pour la prévention des nausées associées à une chimiothérapie anticancéreuse. L'acétate de Mégestrol (Megace ES®) est un stéroïde progestatif indiqué dans le traitement des cancers du sein métastatiques et de l'endomètre. D'autres spécialités sous forme de nanocristaux sont en études cliniques avancées, comme la Guanyldihydrazone (Semapimod®), le Paclitaxel (Paxceed®) ou encore la Thymectacine (Theralux®).¹⁹

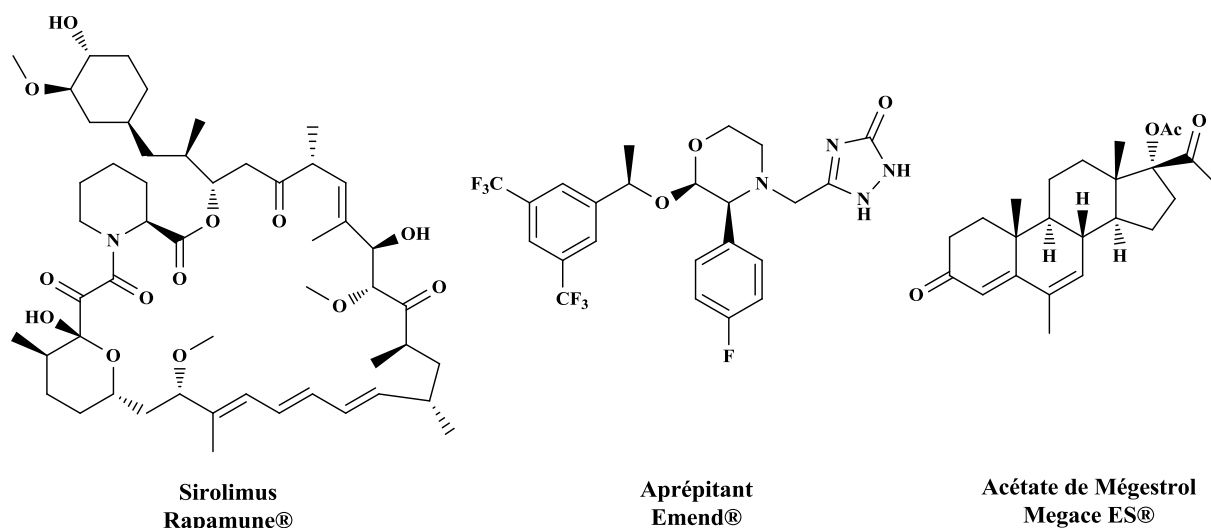


Figure 17. Composés commercialisés sous forme de nanocristaux

A ce jour, seuls quelques composés formulés sous forme de suspensions nanoparticulaires sont prescrits de manière courante en clinique. Cependant le nombre de nanomédicaments tend à s'accroître et un grand nombre de ces nanotechnologies sont actuellement en phases cliniques. Ces futurs développements devraient pouvoir s'étendre aux différentes classes d'anticancéreux, comme les antimétaboliques, les agents alkylants ou encore les inhibiteurs de topoisomérases.

Ces spécialités présentent toutefois quelques limitations, comme un faible taux de charge, hormis les nanocristaux actuellement en développement, une administration complexe, ainsi qu'un coût de production des formulations qui reste très élevé.

I.4. Une nouvelle stratégie de vectorisation : la squalénisation, l'exemple de la Gemcitabine

I.4.1. La Gemcitabine et ses prodrogues

La Gemcitabine (2',2'-difluorodéoxycytidine, dFdC, **1**) est un analogue nucléosidique synthétique de la déoxycytidine (dC, **2**), contenant des atomes de fluor géminés sur l'atome de carbone en position 2' (**Figure 18**). Ce médicament antinéoplasique, actuellement commercialisé sous le nom de Gemzar®, est indiqué en première intention pour le traitement de l'adénocarcinome du pancréas, du cancer du sein ou encore du cancer du poumon.²⁰⁻²⁴ En outre, il possède une

efficacité certaine sur une large variété de tumeurs solides humaines, incluant le colon, le rein et l'ovaire.²⁵⁻²⁸

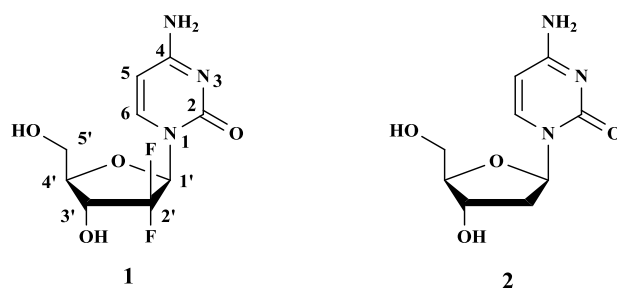


Figure 18. La Gemcitabine (**1**) et la déoxycytidine (**2**)

La Gemcitabine (**1**) est un antimétabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire, qui correspond à la phase de synthèse de l'ADN.^{29,30} Ce composé est métabolisé dans les cellules par les déoxycytidine kinases (dCK) en nucléotides monophosphates (dFdCMP, **3**), puis par les pyrimidine kinases en métabolites actifs, les nucléotides di- (dFdCDP, **4**) et triphosphates (dFdCTP, **5**) (**Figure 19**). La dFdCDP (**4**) inhibe la ribonucléotide diphosphate réductase, enzyme permettant la transformation des nucléotides diphosphates en déoxynucléotides diphosphates, entraînant ainsi une réduction de la concentration en déoxycytidine triphosphate incorporable dans l'ADN. La dFdCTP (**5**) exerce quant à elle un rôle cytotoxique en bloquant la synthèse de l'ADN. Elle inhibe compétitivement l'ADN polymérase et bloque après incorporation directe dans la chaîne d'ADN son élongation. Ces deux mécanismes aboutissent à une inhibition complète de la synthèse de l'ADN et à l'apoptose cellulaire tumorale.³¹

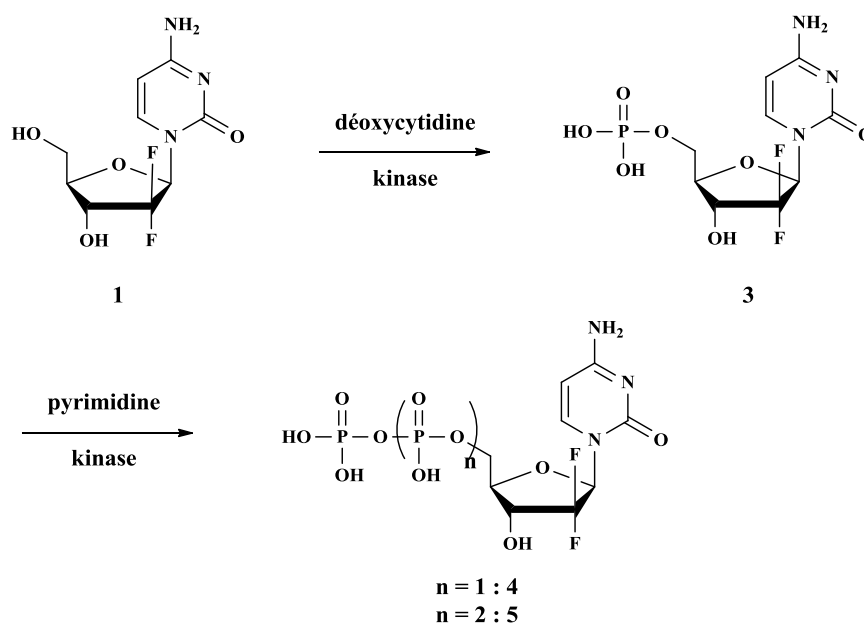


Figure 19

Toutefois, à cause de la grande complexité du métabolisme de ce composé et de sa faible pénétration cellulaire, de nombreux mécanismes contribuent à réduire son efficacité. D'une part, la Gemcitabine est un composé à caractère hydrophile qui pénètre dans les cellules via un mécanisme actif contrôlé par des transporteurs nucléosidiques membranaires tels que les protéines hENT1, hENT2, hCNT1 et hCNT3.³² Une baisse de l'efficacité de ces différents transporteurs membranaires induit une résistance à la Gemcitabine,³³ qui est une cause importante de l'échec du traitement. D'autre part la première étape de phosphorylation par les dCK est une étape limitante pour la métabolisation de la Gemcitabine en nucléotides actifs.^{34,35} Un faible taux de phosphorylation dû à une sous-expression des dCK dans les cellules est un autre important mécanisme de résistance à la Gemcitabine.³⁶⁻³⁹ Enfin la durée de demi-vie de ce médicament est très courte, notamment à cause d'une métabolisation précoce intra- et extracellulaire dans l'organisme par les déoxycytidines déaminases endogènes en une forme uracile inactive **6 (Figure 20)**.^{40,41}

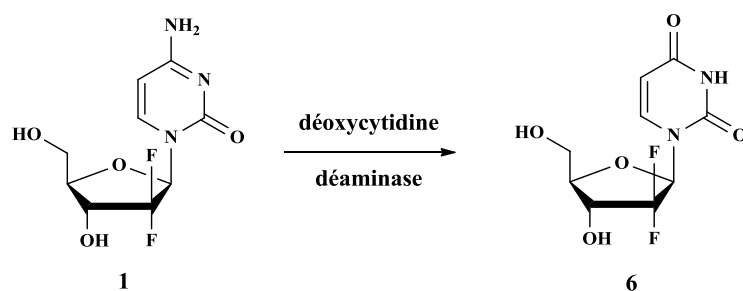


Figure 20

Par conséquent, l'efficacité clinique de la Gemcitabine sur les adénocarcinomes du pancréas reste modeste, à cause d'un index thérapeutique très étroit et d'une forte propension à l'apparition de chimiorésistance.^{22,42}

De nombreuses méthodes ont donc été étudiées pour améliorer la demi-vie et réduire la toxicité de la Gemcitabine, incluant l'encapsulation dans des systèmes de distribution colloïdaux⁴³⁻⁴⁵ ou le développement de prodrogues lipidiques (**Figure 21**).⁴⁶⁻⁴⁸

Stella et coll. ont rapporté le couplage de la Gemcitabine (**1**) en position *N*-4 à des acides gras, comme l'acide laurique, valérique et stéarique, dans le but de protéger la Gemcitabine (**1**) d'une métabolisation précoce. Ces bioconjugués ont été incorporés dans des nanosphères et des nanocapsules de polycyanoacrylate, pour offrir cette fois-ci une protection physique contre la métabolisation. Il a été montré que le composé le plus lipophile, la 4-*N*-stéaroyl-Gemcitabine, était encapsulé dans ces nano-objets avec de bons rendements. L'activité anticancéreuse *in vitro* de ces nano-objets chargés en 4-*N*-stéaroyl-Gemcitabine a été évaluée sur les lignées humaines KB.3-1 et MCF-7. Sur ces modèles, les nanoparticules ont une CI₅₀ inférieure à la Gemcitabine (**1**) ou à la prodrogue libre.⁴³

Cette même prodrogue a également été encapsulée dans des liposomes de DSPC/DSPG/CHOL 9:1:2 (1,2-distéaroyl-phosphatidylcholine/1,2-distéaroyl-phosphatidylglycérol/cholestérol) pour améliorer le comportement pharmacocinétique ainsi que l'activité anticancéreuse de la Gemcitabine (**1**). Une étude *in vivo* effectuée chez la Souris *nude* a démontré que l'encapsulation de la prodrogue dans ces liposomes permettait d'augmenter la demi-vie plasmatique ainsi que la régression tumorale, par rapport à la Gemcitabine (**1**).⁴⁴

Dans une autre étude, la Gemcitabine (**1**) a été encapsulée sans modification chimique dans un système nanoparticulaire à base de chitosan, un polymère biodégradable et biocompatible. Administrées par injection intraveineuse chez la Souris porteuse d'une tumeur L1210 wt, ces

nanoparticules de chitosan chargées en Gemcitabine sont plus efficaces que la Gemcitabine **(1)** libre, à doses équimolaires.⁴⁵

D'autres prodrogues de la Gemcitabine (**Figure 21**) ont été conçues pour pénétrer dans les cellules via un mécanisme de diffusion passive à travers les membranes, évitant ainsi le système de transporteurs nucléosidiques membranaires soumis à des résistances potentielles.

En 2001, Guo et coll. ont rapporté une étude sur de nouvelles prodrogues préparées par couplage en position *N*-4, 3' ou 5' de la Gemcitabine à un ligand des récepteurs périphériques de benzodiazépines (RPB), le PK 11195. Les RPB sont surexprimés dans les tumeurs cérébrales, et pourraient servir de cible pour délivrer sélectivement la Gemcitabine **(1)**. Des études de cytotoxicité et d'affinité avec les RPB ont été effectuées *in vitro* sur la lignée cellulaire du gliome humain SF 126 et montrent que le bioconjugué **7**, couplé en position *N*-4, est celui ayant la meilleure affinité avec les RPB. Une étude de biodistribution chez le Rat a également démontré que ce bioconjugué **(7)** délivrait deux fois plus de Gemcitabine au niveau de la tumeur, qu'au niveau des tissus sains.⁴⁶

La prodrogue **8**, obtenue par couplage en position *N*-4 de la Gemcitabine à l'acide valproïque, a été développée dans le but d'obtenir une forme orale de la Gemcitabine. Bender et coll. ont montré que cette nouvelle prodrogue libère la Gemcitabine **(1)** dans la circulation systémique, après avoir traversé la muqueuse intestinale. L'activité anticancéreuse du composé **8** a été évaluée *in vivo* chez la Souris porteuse d'une tumeur expérimentale HCT-116 (cancer du colon humain). La prodrogue **8**, administrée par gavage oral, a montré une efficacité comparable à celle de la Gemcitabine **(1)**, administrée par voie intrapéritonéale. Ce composé est actuellement évalué en test clinique de phase I.⁴⁸

Ali et coll. ont rapporté en 2005 la synthèse et l'évaluation biologique d'un nouveau conjugué lipidique de la Gemcitabine : le NEO6002 **(9)**. Celui-ci a été obtenu par couplage à un analogue de la Cardiolipine, via un bras espaceur succinique, dans le but d'améliorer la demi-vie et de réduire la toxicité de la Gemcitabine. En effet, la Cardiolipine qui est fortement présente dans les muscles du cœur est responsable de l'imperméabilité aux protons de certaines membranes comme celles des mitochondries. Des études de mortalité et de croissance tumorale chez la Souris, après administration du bioconjugué **9** et de la Gemcitabine **(1)** à des doses équimolaires, ont montré une moindre toxicité ainsi qu'une activité tumorale accrue par rapport à la Gemcitabine **(1)**.⁴⁷

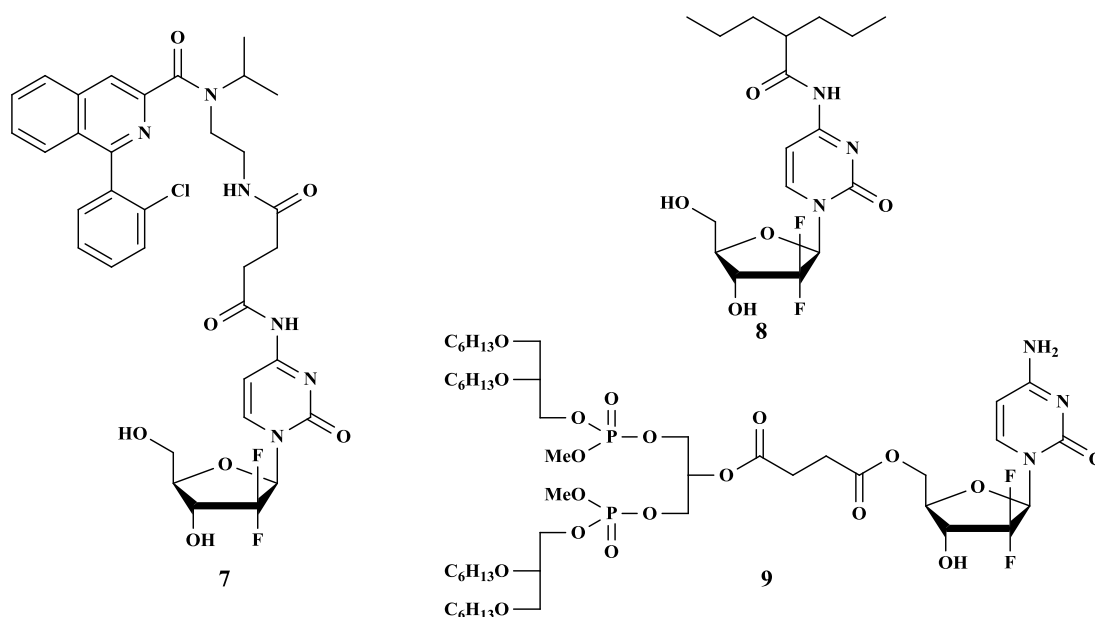


Figure 21. Prodrogues de la Gemcitabine

I.4.2. La Gemcitabine-squalène

Afin d'améliorer l'absorption cellulaire des analogues nucléosidiques et notamment de la Gemcitabine, le Laboratoire du Professeur Patrick Cuvreur a récemment développé une nouvelle stratégie connue sous le nom de « squalénisation » impliquant leur conjugaison avec le squalène, un précurseur naturel de la biosynthèse du cholestérol. Ces nouvelles prodrogues nucléosidiques squalénisées possèdent un caractère amphiphile et sont capables de s'auto-assembler dans l'eau en nano-objets de 100 à 300 nanomètres de diamètre.⁴⁹

Le squalène (**10**, **Figure 22**) est un triterpène acyclique de formule $C_{30}H_{50}$ nommé ainsi en raison de son abondance dans l'huile de foie de requin. Toutefois, il est largement répandu dans la nature avec des quantités significatives dans l'huile d'olive et les feuilles d'olivier. Le squalène contient deux fragments farnésol reliés de façon queue à queue plutôt que selon le mode tête à queue observé pour la majorité des terpénoïdes. Ainsi, les 6 doubles liaisons, les 10 méthylènes et les 8 groupes méthyle sont répartis symétriquement par rapport à la liaison C12-C13 (**Figure 22, A**). Le squalène est un composé clé dans la biosynthèse de la plupart des triterpènes notamment le lanostérol et cycloarténol qui sont à leur tour les précurseurs des stéroïdes. Il a été postulé que le rôle central joué par les polyterpénoïdes dans les organismes procaryotes et les archéobactéries, est de participer à la formation et au renforcement des biomembranes comme substituts des stérols.⁵⁰

Par la suite, ce rôle a été progressivement dévolu aux stérols, les produits finaux de la biosynthèse des terpénoïdes. Chez les eukariotes, le squalène et les autres terpénoïdes sont des précurseurs dans la biosynthèse des stéroïdes et sont impliqués dans d'autres fonctions biologiques telles que la lutte contre le stress oxydatif.⁵¹ Chez l'homme, le squalène est transporté dans le sérum généralement en association avec les lipoprotéines de très faible densité et est distribué de façon ubiquitaire dans les tissus, avec une forte concentration dans la peau.⁵² Il est bien toléré, qu'il soit injecté par voie intraveineuse ou consommé par voie orale et est distribué dans de nombreux tissus.^{53,54} Parce qu'il est d'origine biologique et souvent utilisé comme complément alimentaire, le squalène est supposé dépourvu de toxicité et est donc largement utilisé comme support ou adjuvant dans des applications thérapeutiques.

Le squalène est un liquide mobile à température ambiante, toutefois il a pu être cristallisé à basse température et les cristaux ont été soumis à une analyse par diffraction des rayons X.⁵⁵ La structure obtenue montre une conformation linéaire de symétrie *Ci*. Ce résultat contraste avec la conformation en pelote proposée par van Tamelen pour expliquer la chimiosélectivité de l'oxydation du squalène par le NBS dans un mélange eau/THF (**Figure 22, B**).⁵⁶ D'autre part, La flexibilité de la chaîne de squalène et sa capacité à assumer une conformation chaise-bateau-chaise-bateau dans un environnement de faible polarité sont cruciales pour l'insertion du (3*S*)-2,3-oxydosqualène dans la poche catalytique de l'oxydosqualène cyclase (**Figure 22, C**).^{57,58}

Sur la base d'études RMN et de calculs de modélisation moléculaire, il a été proposé que dans un solvant de faible polarité, le squalène existerait majoritairement dans un état complètement étendu, alors que lorsqu'il est incorporé dans des molécules de solvant polaire, la conformation compacte deviendrait prépondérante.^{59,60} Ce repliement maximiserait les interactions intramoléculaires lipophiles et minimiserait les contacts avec le solvant. Cependant, le temps de relaxation spin-réseau (*T*₁) en RMN du carbone d'une solution de squalène dans le THF-*d*₈, en présence de teneurs en eau croissantes, ne change pas de manière significative, rendant peu plausible l'hypothèse que le squalène changerait brusquement de conformation en passant d'une phase organique pure à un mélange solvant/eau. D'autres explications concernant la sélectivité de cette oxydation fondées sur l'agrégation ou la micellisation sont également incompatibles avec ces études de *T*₁.⁶¹

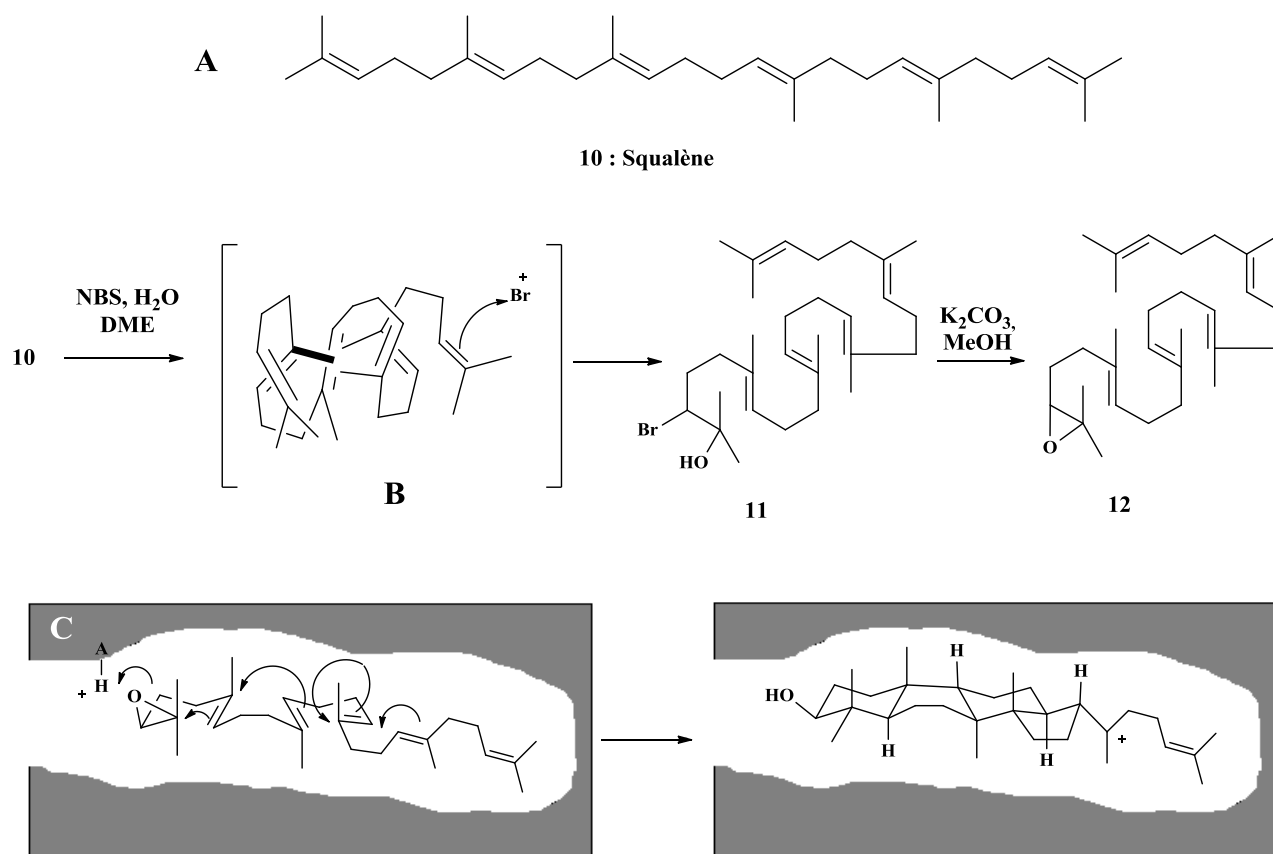


Figure 22. A) Conformation étendue du squalène. B) Schéma de l'oxydation de la double liaison terminale du squalène par le *N*-bromosuccinimide dans un mélange eau/THF selon van Tamelen.⁵⁶ C) Cyclisation du 2,3-époxy-squalène dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau en cation protostérol à l'intérieur de la poche catalytique de l'oxydosqualène cyclase.

Quelle que soit l'origine structurale du comportement colloïdal du squalène, il est fréquemment utilisé dans la préparation d'émulsions stables, que ce soit comme ingrédient principal ou secondaire.⁶²⁻⁶⁴ La grande stabilité des émulsions à base de squalène a été attribuée au fait que ce terpène, qui est un hydrocarbure dépourvu de propriétés amphiphiles, est presque insoluble dans l'eau, ce qui rend difficile la diffusion d'une petite goutte de squalène dans une plus grosse en traversant une phase aqueuse (maturation d'Ostwald). Le squalène est fréquemment utilisé avec d'autres huiles pour réduire cette maturation et accroître la stabilité des émulsions.⁶⁵ Par exemple, une émulsion de squalène stabilisée par le phosphatidyléthanolamine ou le Pluronic F68 a permis une libération prolongée d'une prodrogue de la morphine.⁶⁶ Des émulsions similaires ont été étudiées avec succès pour administrer des esters lipophiles de la Nalbuphine (Nalbuphine®, Nubain®) (un analgésique morphinique de la série des phénanthrènes avec une demi-vie courte).⁶⁷ Autre exemple, un vecteur lipidique nanostructuré à base de squalène et de précirol permet

d'accroître la perméabilité de la peau et d'administrer du psoralène (Méladinine®) dans le cadre d'un traitement anti-psoriasis.⁶⁸

Ainsi, la Gemcitabine (**1**) a été couplée avec l'acide trisnor-squalénique (**13**), dérivé du squalène (**10**), par acylation de l'azote *N*-4 du noyau cytosine pour former la Gemcitabine-squalène (dFdC-SQ, **14**) (**Figure 23**). Ce nouveau composé amphiphile, une fois dispersé dans l'eau, forme des nanoparticules dont la taille moyenne de 130 nm a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière (ou diffusion dynamique de la lumière).⁴⁹

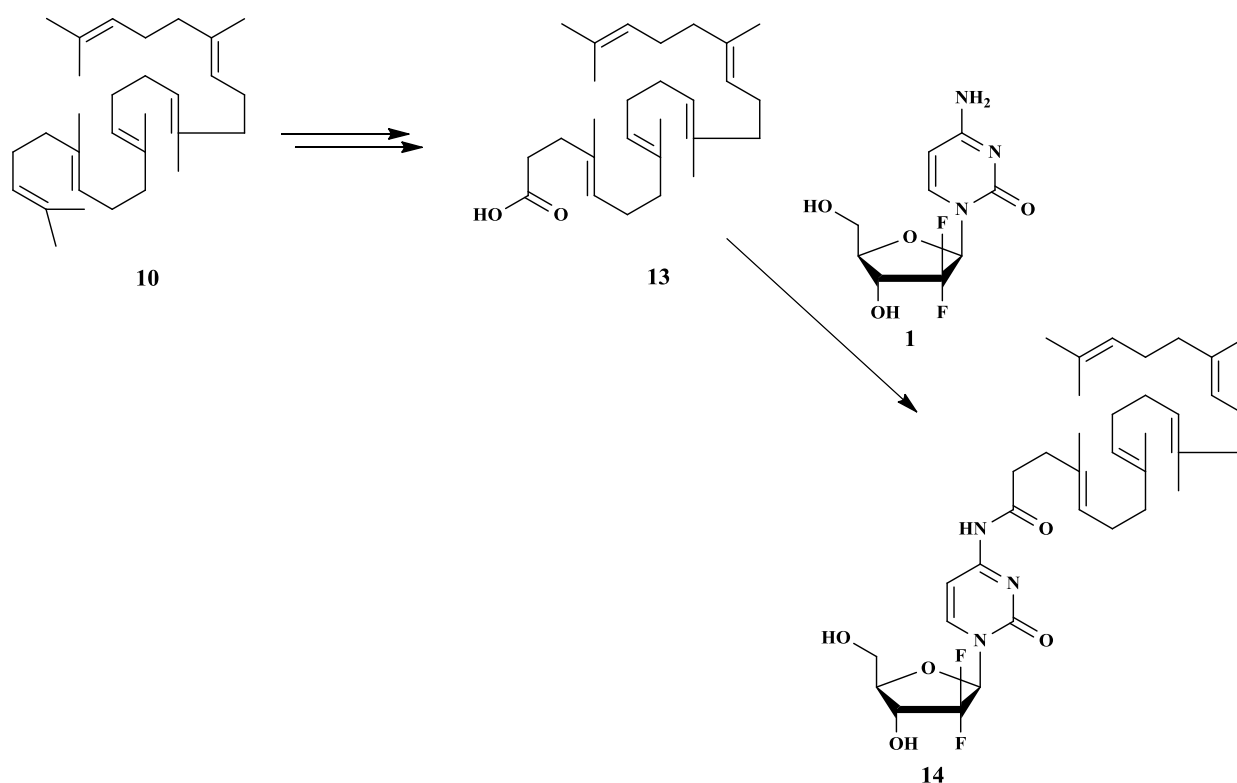


Figure 23

Contrairement aux autres bioconjugués déjà connus de la Gemcitabine comme les (4)-*N*-valéroyl-Gemcitabine, (4)-*N*-heptanoyl-Gemcitabine, (4)-*N*-lauroyl-Gemcitabine et (4)-*N*-stéaroyl-Gemcitabine qui forment des agrégats dans l'eau et nécessitent l'encapsulation dans des liposomes pour une administration par voie intraveineuse,⁶⁹ la chaîne squalène confère à la Gemcitabine-squalène (**14**) la propriété de former des nanoparticules dans l'eau sans l'aide d'aucun surfactant. La taille de ces nanoparticules (130 nm) est parfaitement appropriée pour une administration par voie

intraveineuse. En effet, il a été rapporté dans la littérature que pour éviter l'élimination rapide par les reins des nanoparticules injectées, leur taille ne devait pas être inférieure à 50 nm. Il a également été montré que les nanoparticules d'une taille supérieure à 200 nm pouvaient être éliminées du système sanguin par les cellules de Kupffer. De plus la filtration splénique capture les nano-objets d'une taille supérieure à 200-250 nm. Enfin, il faut noter que le diamètre des capillaires tumoraux n'excède jamais 300 nm.⁷⁰⁻⁷²

La structure de ces nanoparticules a été étudiée et caractérisée par différentes méthodes de physico-chimie. Des expériences de Microscopie Electronique en Transmission (Cryo-MET) ont révélé l'existence d'une organisation supramoléculaire hexagonale inverse (**Figure 24**).⁷³

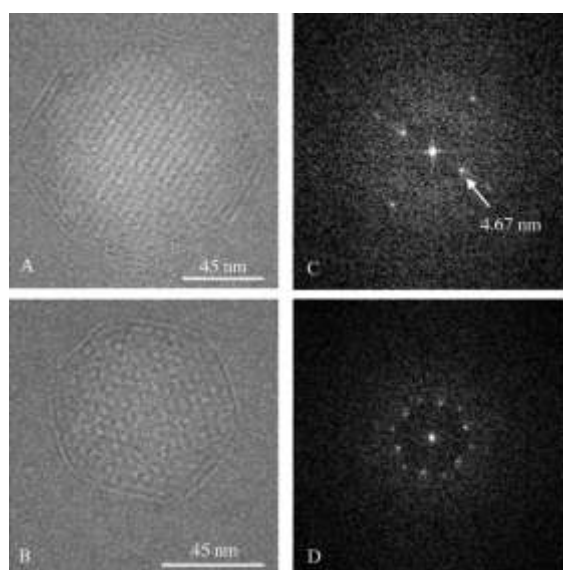


Figure 24. Images de CryoMET des nanoparticules de Gemcitabine-squalène. Nanoparticules de forme hexagonale entourées d'une couche externe et comportant une structure interne organisée (A) et (B). La transformée de Fourier des clichés (A) et (B) révèle une symétrie hexagonale (D) entre les colonnes avec une périodicité de 4,67 nm (C).⁷³

Ces résultats se corrèlent parfaitement avec les études de diffusion des rayons X aux petits angles. Une étude de modélisation moléculaire a montré que les molécules de Gemcitabine-squalène (**14**) peuvent s'associer en couronnes par la combinaison des forces hydrophobes et des liaisons hydrogènes. La paroi externe de ces objets est constituée des chaînes squalène alors que les molécules de Gemcitabine se trouvent au cœur des nano-objets. La superposition des couronnes forment de longs tubes qui s'associent les uns aux autres par interactions hydrophobes (**Figure 25**).⁷³

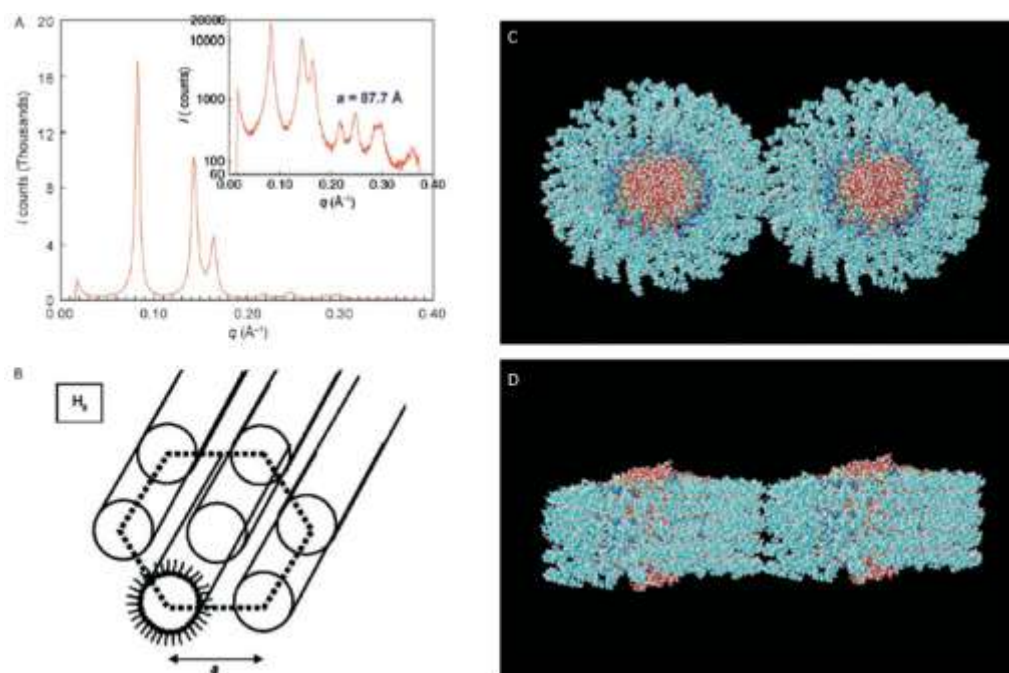


Figure 25. (A) Graphique de diffusion des rayons X aux petits angles des phases hexagonales, en échelle linéaire et logarithmique. (B) Représentation schématique de l'empilement hexagonal de molécules amphiphiles. (C) Vues du dessus et (D) latérales d'une construction de deux sections de colonnes, chacune faite de six couches de conjugués assemblés en forme de disque. Le système entier comprend 240 conjugués ainsi que 2556 molécules d'eau. Sur la vue du dessus, le cœur aqueux est clairement visible au centre (en rouge). La partie hétérocyclique est rendue visible par la présence d'un cercle d'atomes d'azote du noyau pyrimidine (en bleu) et des atomes de fluor (en jaune).⁷³

L'activité biologique *in vivo* de ces nanoparticules a été évaluée chez la Souris sur des leucémies expérimentales, développées soit par injection intraveineuse de cellules leucémiques ou sur des tumeurs solides induites par injection sous-cutanée. La Gemcitabine-squalène (**14**) affiche une activité anticancéreuse impressionnante après administration intraveineuse en comparaison avec la Gemcitabine (**1**). Par exemple, chez la Souris porteuse d'une leucémie expérimentale L1210, l'administration de nanoparticules de Gemcitabine-squalène (**14**) par voie i.v. mène à 75 % de survie à long-terme, alors que l'ensemble des souris traitées à la Gemcitabine (**1**) à dose équitoxique ne survivent pas au-delà de 50 jours (**Figure 26**).⁷⁴

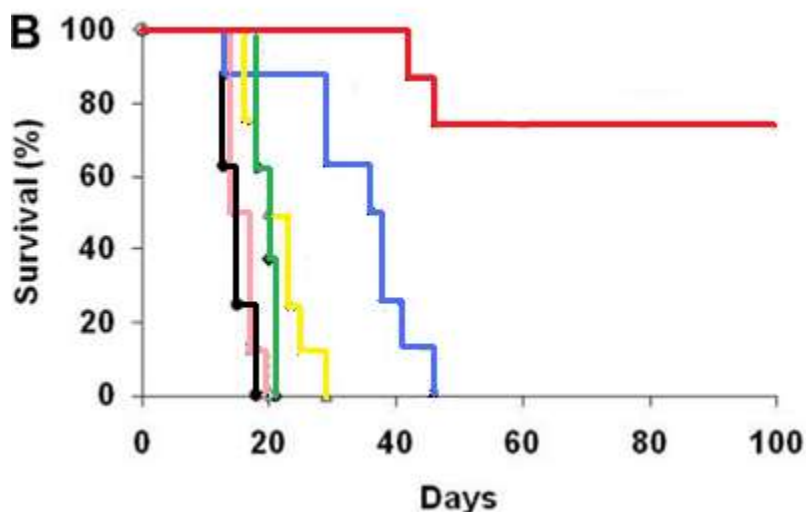


Figure 26. Etude de survie de souris porteuses d'une leucémie L1210 wt après injection par voie intraveineuse d'Ara-C, de Gemcitabine ou de nanoparticules de Gemcitabine-squalène. Les nanoparticules de l'acide squalénique sont utilisées en contrôle. Souris non traitées (—); 4×100 mg/kg d'acide squalénique (—); 5×100 mg/kg d'Ara-C (sur 5 jours consécutifs) (—); 4×100 mg/kg d'Ara-C (—); 4×100 mg/kg de Gemcitabine (—); 4×100 mg/kg de Gemcitabine-squalène (—). Injections aux jours 1, 5, 9 et 14.⁷⁴

Il a par la suite été montré que cette amélioration de l'activité anticancéreuse était probablement due à la capacité de la Gemcitabine-squalène (**14**) à diffuser passivement dans les cellules tumorales, ce qui permet son accumulation dans les membranes intracellulaires, incluant des organelles comme le réticulum endoplasmique. Les molécules de Gemcitabine-squalène (**14**) sont ensuite relarguées de ce réservoir temporaire vers le cytoplasme puis clivées en Gemcitabine (**1**) par les cathépsines lysosomales, qui peut alors être métabolisée pour donner la dFdCMP puis les composés biologiquement actifs, la dFdCDP et la dFdCTP (**Schéma 2**).⁷⁵⁻⁷⁷

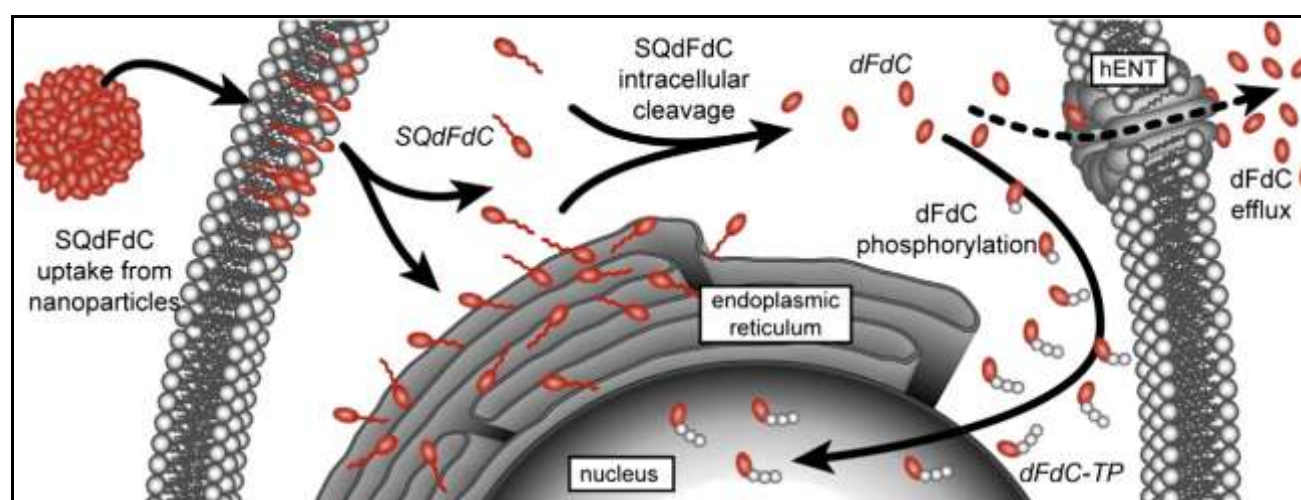


Schéma 2. Voie de métabolisation intracellulaire de la Gemcitabine-squalène (**14**)⁷⁵

Ces différents phénomènes conduisent au contournement partiel de résistances sur une lignée cancéreuse déficiente en transporteurs nucléosidiques membranaires (CEM/ARA8C). Les nanoparticules de Gemcitabine-squalène (**14**) s'avèrent environ deux fois plus cytotoxiques que la Gemcitabine libre sur ce modèle. Sur la lignée L1210 10K, déficiente en dCK, les nanoparticules de Gemcitabine-squalène sont quatre fois plus actives que la Gemcitabine libre (**Figure 27**).⁷⁸

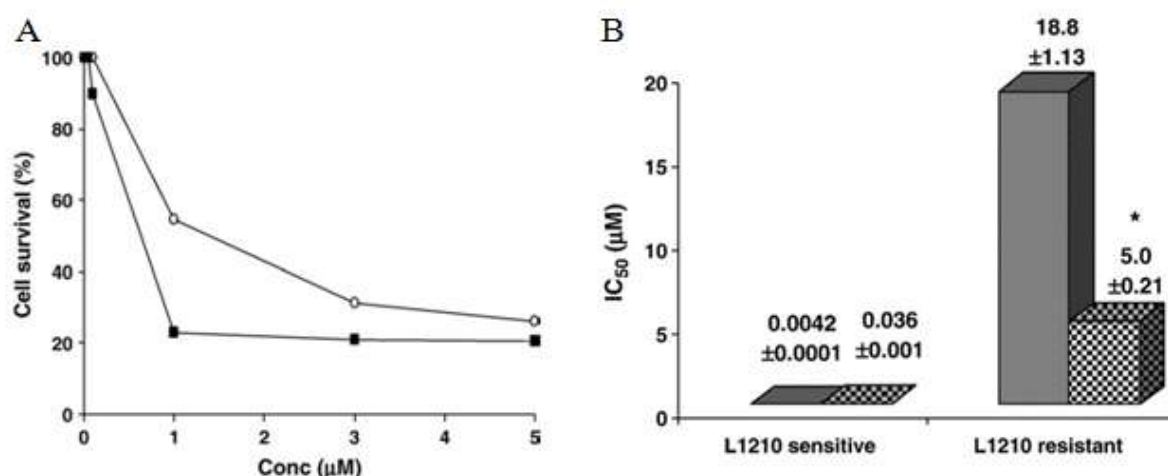


Figure 27. (A) Cytotoxicité de la Gemcitabine (—○—) et des nanoparticules de Gemcitabine-squalène (—■—) sur la lignée cellulaire de leucémie humaine CEM/ARA8C déficiente en transporteurs nucléosidiques. (B) Cytotoxicité de la Gemcitabine (barre pleine) et des nanoparticules de Gemcitabine-squalène (barre en damier) sur la lignée de leucémie murine L1210 wt et la lignée L1210 10K déficiente en dCK.⁷⁸

Plus récemment, dans le cadre d'un développement préclinique, l'activité anticancéreuse des nanoparticules de Gemcitabine-squalène a été évaluée sur une soixantaine de lignées cellulaires humaines avec des résultats très encourageants.⁷⁹

Cette nouvelle stratégie de vectorisation semble donc être extrêmement efficace. Les nombreuses études biologiques effectuées ont en effet démontré que le couplage de la Gemcitabine avec le squalène en position *N*-4 modifiait totalement les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques du médicament. D'une part, le noyau cytosine est protégé d'une métabolisation précoce par les déoxycytidine déaminases en noyau uracile inactif. D'autre part, la Gemcitabine-squalène pénètre dans les cellules via un phénomène de diffusion passive, à la différence du nucléoside libre, et contourne ainsi l'apparition de résistances au niveau des transporteurs nucléosidiques. La Gemcitabine est libérée progressivement dans le cytoplasme à un taux très inférieur au seuil de saturation des dCK, même en cas de sous-expression, et échappe partiellement

aux résistances. Enfin, le profil pharmacocinétique est grandement amélioré avec une libération prolongée de la Gemcitabine à partir des nanoparticules de Gemcitabine-squalène.

Compte-tenu de ces résultats encourageants, cette stratégie originale de vectorisation a été étendue à d'autres analogues nucléosidiques antitumoraux et antiviraux utilisés en thérapeutique, mais également à d'autres classes thérapeutiques comme les antimitotiques, les agents alkylants ou les antifongiques.

I.5. Etat des travaux du Laboratoire

La méthodologie a été appliquée, en plus de la Gemcitabine, à différents nucléosides synthétiques antiviraux, la Didéoxycytidine (ddC, **15**), la 3'-Azidothymidine (AZT, **16**) et la Didanosine (ddI, **17**), ainsi qu'à un autre nucléoside anticancéreux, la Cytarabine (Ara-C, **18**) (**Figure 28**).^{49,73} Ces composés ont été squalénisés en position N-4, lorsque le nucléoside est un dérivé de la cytidine (**14** et **15**), ou en position 5', lorsque celui-ci est un dérivé de la thymidine (**16**) ou de l'adénosine (**17**).

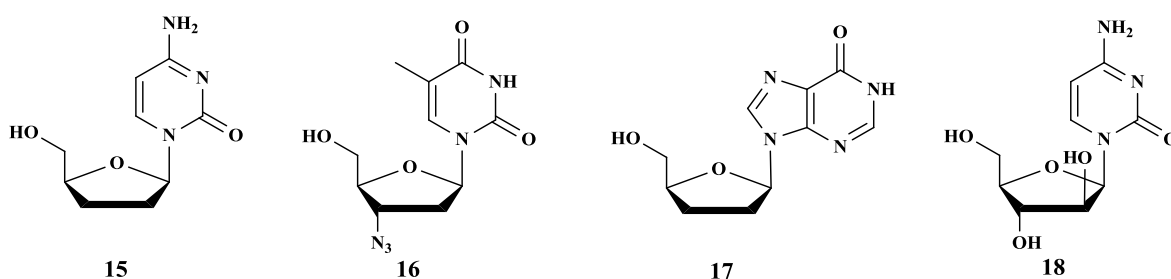


Figure 28. Analogues nucléosidiques synthétiques

Dans chaque cas des nanoparticules ont été obtenues par nanopréciipitation et évaporation de solvant, avec des tailles moyennes allant de 130 à 280 nm de diamètre. Certains de ces bioconjugués présentent des activités biologiques prometteuses, comme la Didéoxycytidine-squalène (ddC-SQ, **19**) et la Didanosine-squalène (ddI-SQ, **20**) en tant que composés antirétroviraux (**Figure 29**).⁴⁹

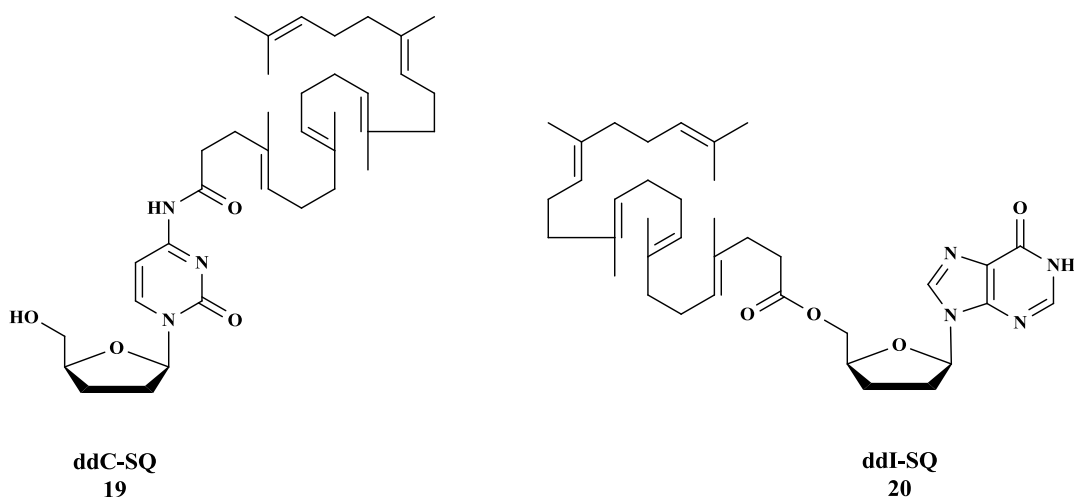


Figure 29

La structure supramoléculaire des nanoparticules de ddC-SQ (**19**) a également été étudiée par diffusion des rayons X aux petits angles. Ces expériences ont clairement mis en évidence l'existence d'une structure cubique, contrairement aux nanoparticules de Gemcitabine-squalène qui s'organisent en structure hexagonale inverse. La partie nucléosidique polaire a donc une influence indéniable sur l'organisation des nanoparticules des bioconjugués.⁸⁰

La squalénisation ne se limite pas aux molécules très hydrophiles comme les analogues nucléosidiques, puisque des molécules plus lipophiles comme la Penicilline G (**21**) et la Pravastatine (**22**) ont été squalénisées. Dans chaque cas des nanoparticules stables ont été obtenues par nanoprécipitation (**Figure 30**).^{81,82}

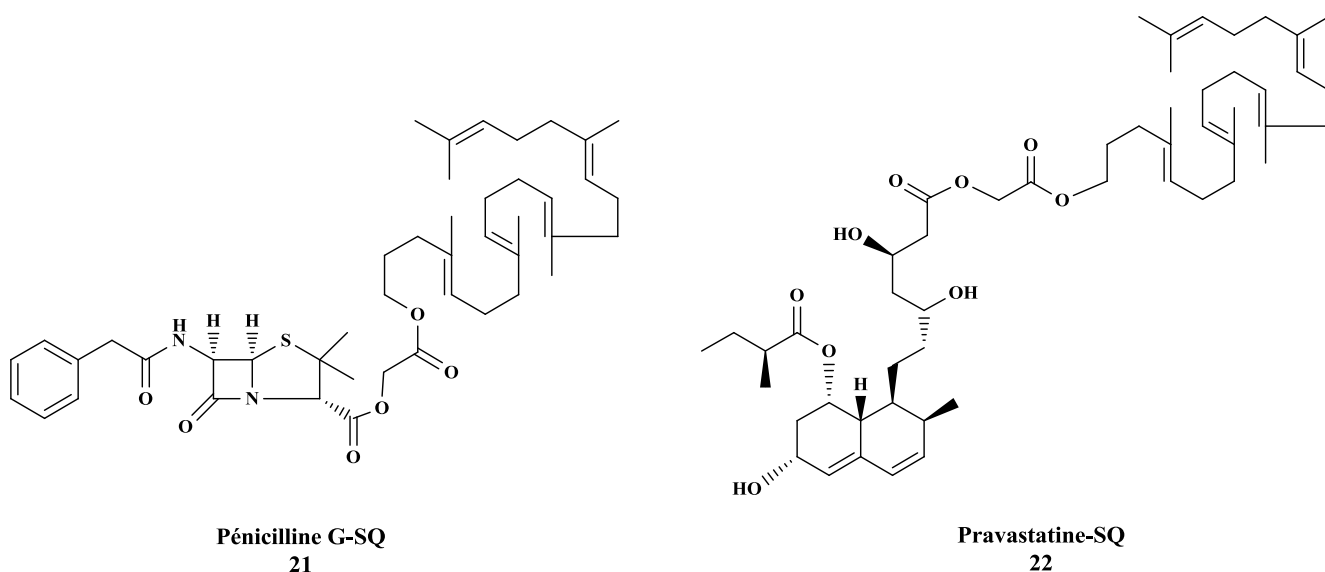
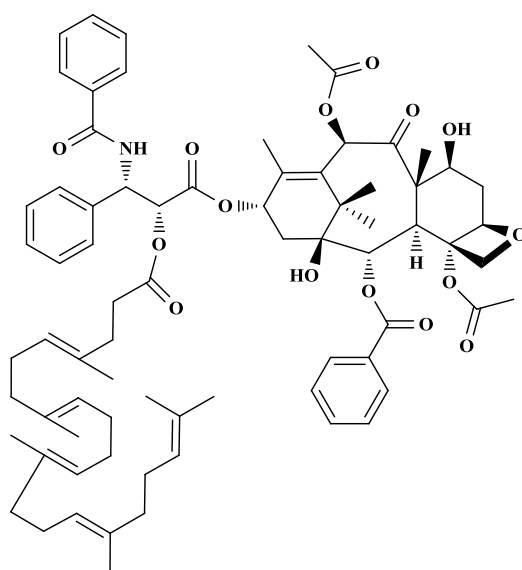


Figure 30

Le Paclitaxel, pour sa part, est une molécule lipophile totalement insoluble dans l'eau, qui est administrée dispersée dans un surfactant, le Crémophore EL. Une forme squalénisée a donc été développée, permettant une administration sous forme de nanoparticules, s'affranchissant du Crémophore EL. Le Paclitaxel a été couplé au squalène sur la chaîne latérale en position 2', pour donner le bioconjugué **23**, capable de former des nanoparticules de taille moyenne d'environ 130 nm (**Figure 31**). Cependant, ce composé s'est avéré moins actif *in vitro* et *in vivo* que le Paclitaxel libre sur diverses lignées cancéreuses humaines ou murines.⁸³



Paclitaxel-squalène
23

Figure 31

I.6. Objectifs des travaux

Des formes squalénisées de la Gemcitabine et du Paclitaxel ont d'ores et déjà été développées. Cependant, l'activité biologique de telles molécules pourrait encore être améliorée en effectuant de nouvelles pharmacomodulations sur les deux bioconjugués **14** et **23** (**Figure 32**).

En effet, la Gemcitabine nécessite une métabolisation en dFdCMP puis en dFdCDP et dFdCTP qui sont les métabolites actifs. Or, cette étape de mono-phosphorylation par les dCK est une étape limitante et ces kinases sont souvent sous-exprimées chez les souches résistantes. L'administration directe de la Gemcitabine-squalène monophosphatée devrait donc permettre de

contourner cette première étape, améliorant ainsi la biodisponibilité et donc l'activité thérapeutique de la Gemcitabine-squalène. L'objectif sera donc de synthétiser le dérivé monophosphaté en position 5' de la Gemcitabine-squalène.

La squalénisation du Paclitaxel s'est avérée décevante, induisant une baisse d'activité *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles de cancers. Ce phénomène trouve probablement son origine dans une mauvaise libération *in vivo* du Paclitaxel à partir du conjugué **23**. Nous nous sommes fixés pour objectif de moduler la chaîne squalène liée au Paclitaxel en position 2', pour accroître le relargage du Paclitaxel à partir de cette nouvelle prodrogue dans l'espoir d'améliorer son activité *in vivo*.

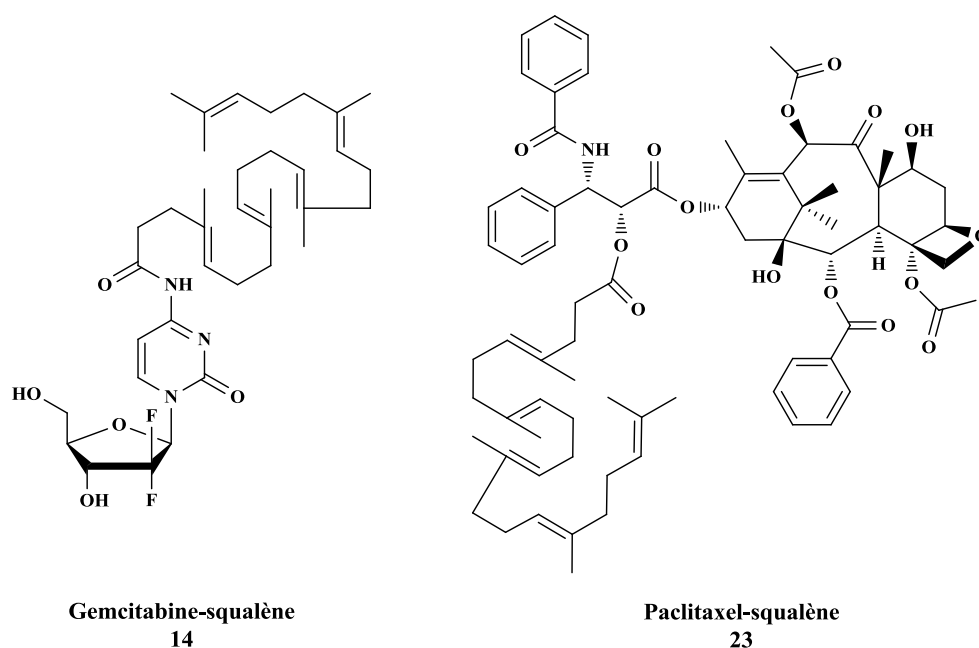


Figure 32. Prodrogues squalénisées à moduler

A ce jour, la squalénisation a été étudiée principalement dans le cadre des analogues nucléosidiques et du Paclitaxel. Cette stratégie de vectorisation n'a pas été appliquée à certaines classes de composés anticancéreux, comme les agents alkylants. Nous avons donc choisi de préparer des dérivés squalénisés du Cisplatine (CDDP, **24**) et de l'Ifosfamide (**25**). En effet, même si ces composés anticancéreux sont largement prescrits en chimiothérapie, leur administration prolongée provoque l'apparition de différents phénomènes de résistance, ainsi que de nombreux effets indésirables. La modification des propriétés physico-chimiques de ces produits devrait améliorer leur biodisponibilité ainsi que leur profil pharmacocinétique (**Figure 33**).

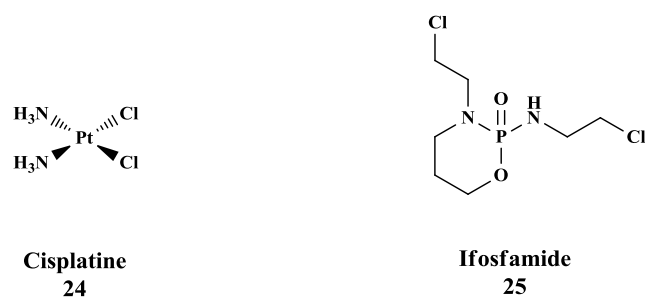


Figure 33

Nous nous sommes fixés dans un premier temps comme but de développer des voies de synthèse efficaces pour la préparation de différents bioconjugués squalénisés de chaque composé. Les capacités d'auto-assemblage de ces dérivés seront ensuite évaluées en utilisant le procédé de nanoprécipitation. Les nanoparticules obtenues seront alors caractérisées par différentes méthodes d'analyses physiques. Enfin, nous évaluerons les activités biologiques de chaque dérivé *in vitro* dans un premier temps, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, puis *in vivo*, sur des modèles développés chez la Souris.

II. EXPOSE DES TRAVAUX

II.1. La Gemcitabine-squalène monophosphate

II.1.1. Objectif des travaux

Si la squalénisation de la Gemcitabine et son administration sous forme de nanoparticules permet une très nette amélioration de l'activité cytotoxique et de la biodisponibilité, des progrès sont encore possible. En effet, les analogues nucléosidiques sont des prodrogues qui doivent subir pour être actives une transformation préalable en nucléotides di- et triphosphates. La monophosphorylation effectuée par les dCK dans le milieu intracellulaire est une réaction limitante. De plus, de nombreuses résistances se développent, dues entre autre à une sous-expression des dCK dans le cytoplasme. La squalénisation de la Gemcitabine a permis de contourner partiellement cette sous-expression des dCK, puisque la Gemcitabine-squalène est 4 fois plus active que la Gemcitabine sur la lignée L1210 10K, déficiente en dCK. Il a en effet été montré que la libération progressive dans le cytoplasme de la Gemcitabine permettait de rester sous le seuil de saturation des dCK. L'administration directe du nucléotide monophosphaté correspondant devrait permettre de s'affranchir de cette étape de monophosphorylation, améliorant ainsi la biodisponibilité.

De nombreux travaux sur l'administration directe de nucléotides ont été rapportés dans la Littérature. Cependant, ces composés ne sont pas substrats des transporteurs nucléosidiques et sont trop hydrophiles pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Ainsi, dans le but de réduire la charge négative du phosphate et permettre au nucléotide modifié de pénétrer dans les cellules, de nombreux pronucléotides comportant des groupements lipophiles ou bioactivables sur la partie phosphatée ont déjà été synthétisés et évalués sur le plan biologique (**Figure 34**).⁸⁴⁻⁸⁶

Par exemple, des dérivés lipophiles du monophosphate de Cytarabine ont été synthétisés par Saneyoshi et coll. en 1980 dans le but de réduire la charge négative du phosphate et d'améliorer la pénétration cellulaire. Le composé **26** en particulier affiche une bonne activité anticancéreuse *in vivo* chez la Souris porteuse d'une leucémie L1210 expérimentale après injection intrapéritonéale. Une étude de stabilité a également démontré que cette prodrogue **26** n'était pas métabolisée par les cytidines déaminases après 2 heures dans le plasma.⁸⁷

Les synthèses de dérivés phosphatés hydrolysables de l'AZT, de la Didéoxyuridine (ddU) et de la 5-Fluorodéoxyuridine (5-FdU) ont été rapportées dans la littérature par différents groupes. Ceux-ci ont étudié les activités antivirales ou anticancéreuses des différents composés phosphatés comportant 2 groupements pivaloyloxyméthyles sur le phosphate. Ce groupement est utilisé pour faciliter le passage de la membrane cellulaire, et permet également une hydrolyse facile au niveau intracellulaire. Il a été montré qu'après incubation de cellules TK⁻ CEM avec le dérivé monophosphaté de l'AZT (**27a**), les AZT mono-, di- et triphosphatées étaient formées au niveau intracellulaire, tandis qu'aucun nucléotide ne l'était après incubation avec l'AZT.⁸⁸ L'activité antirétrovirale du monophosphate dérivé de la ddU (**27b**) a été évaluée *in vitro* sur les lignées TK⁻. Il possède une bonne activité contrairement à la ddU libre qui n'est pas phosphorylée par les thymidine kinases.⁸⁹ Enfin, le phosphodiester de la 5-FdU (**27c**), évalué *in vitro* sur une lignée cellulaire résistante au 5-Fluorouracile (5-FU), puis *in vivo* chez la Souris porteuse d'une leucémie P 388 expérimentale, résistante au 5-FU, affiche une activité anticancéreuse significative.⁹⁰

D'autres dérivés phosphatés ont été développés, comme les phosphoramidates, qui contiennent un ou deux atomes d'azote liés au phosphore. L'hydrolyse chimique de ces composés s'effectue rapidement à pH acide. De tels composés peuvent donc être utilisés pour cibler les endosomes, les lysosomes ou des cellules tumorales dans lesquelles le pH est inférieur à la normale. Par exemple, le phosphoramidate **27d**, formé par couplage entre le phosphate d'AZT et l'ester méthylique de l'alanine, possède une activité antirétrovirale remarquable contre le VIH sur une lignée résistante à l'AZT, déficiente en kinases.⁹¹

Plus récemment, de nouveaux phosphoramidates ont été étudiés, comme le dérivé **28**, synthétisé à partir de la déoxythymidine. Ce dérivé comporte un groupe benzotriazolylphosphoramidate hydrolysé très rapidement en milieu physiologique, ainsi qu'un *N*-méthyl-*N*-2-bromoéthyle phosphoramidate, qui permet la formation *in vitro* d'un intermédiaire aziridinium pouvant évoluer de diverses façons dont une hydrolyse en phosphate. L'activité cancéreuse du composé **28** a été évaluée *in vitro* sur la lignée de leucémie murine L1210. Après une incubation de 48 heures, le phosphoramidate **28** possède une CI₅₀ largement inférieure à celle du 5-FU (3,3 nM contre 125 nM), ce qui montre l'efficacité de cette stratégie.⁹²

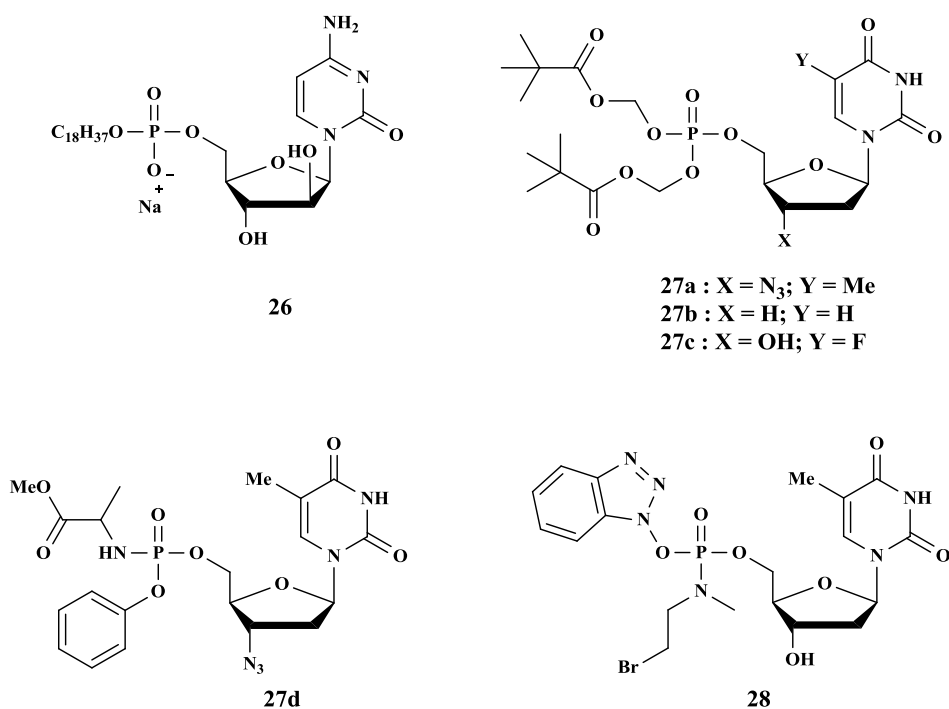


Figure 34. Prodrogues de nucléosides phosphatés

Bien que de nombreuses approches aient été tentées, aucune d'entre elles n'a prouvé son efficacité pour tous les analogues nucléosidiques. En particulier, l'administration de pronucléotides 2',3'-disubstitués, dérivant de la Gemcitabine et de l'Ara-C, semble être difficile (**Figure 35**).⁹³ Par exemple, l'activité *in vitro* des bioconjugués **29** et **30** est largement inférieure à celle des molécules libres sur un large échantillon de lignées cellulaires cancéreuses, allant du cancer du pancréas au cancer du poumon en passant par celui du colon. Il est fort possible que les différents conjugués soient déphosphatés par des phospholipases, à cause notamment d'un temps de pénétration intracellulaire trop long.

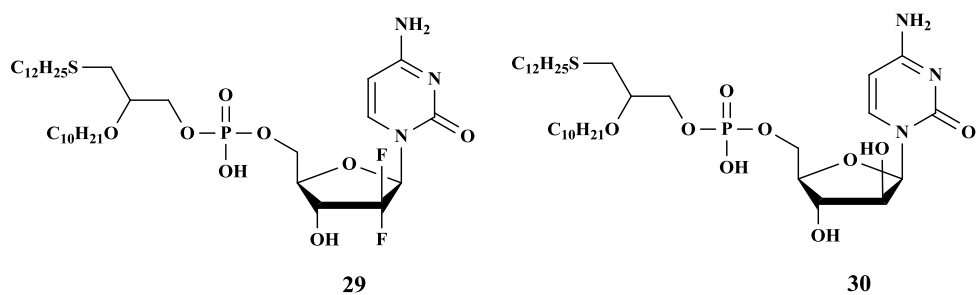


Figure 35

Ces analogues se sont donc finalement avérés peu ou pas actifs, soit qu'ils s'hydrolysent prématurément en relarguant le nucléoside, soit qu'ils soient insolubles dans l'eau.

Nous pouvons penser qu'une formulation sous forme de nanoparticules non seulement résoudrait le problème de la solubilité dans l'eau mais également qu'au sein des nanovecteurs les prodrogues seraient protégées de la dégradation, par les phosphatases notamment. La squalénisation semblait donc être une solution prometteuse.

Nous nous sommes fixés comme objectif de mettre au point une stratégie de synthèse efficace d'un dérivé squalénisé de monophosphate de Gemcitabine (dFdC-SQ MP, **31**) (**Figure 36**), puis d'évaluer les propriétés d'auto-assemblage de la molécule ainsi formée. Le produit synthétisé sera testé *in vitro* sous forme de nanoparticules sur différentes lignées cellulaires sensibles et résistantes à la Gemcitabine.

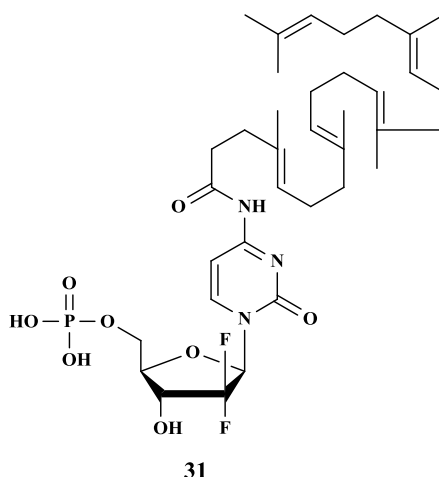


Figure 36

II.1.2. Les différentes méthodes de phosphorylation des nucléosides

La monophosphorylation des nucléosides a suscité une abondante littérature depuis les années 40. Les méthodes enzymatiques ont été utilisées mais les méthodes chimiques restent essentielles. Ces réactions sont le plus souvent décrites avec des nucléosides naturels présents dans l'ADN ou l'ARN tels que l'adénosine, la guanosine, la déoxycytidine ou encore la déoxythymidine, mais également avec des analogues synthétiques utilisés en clinique et/ou en recherche comme la Gemcitabine (**1**), la ddC (**15**), la ddI (**17**) ou l'Ara-C (**18**) (**Figure 37**).

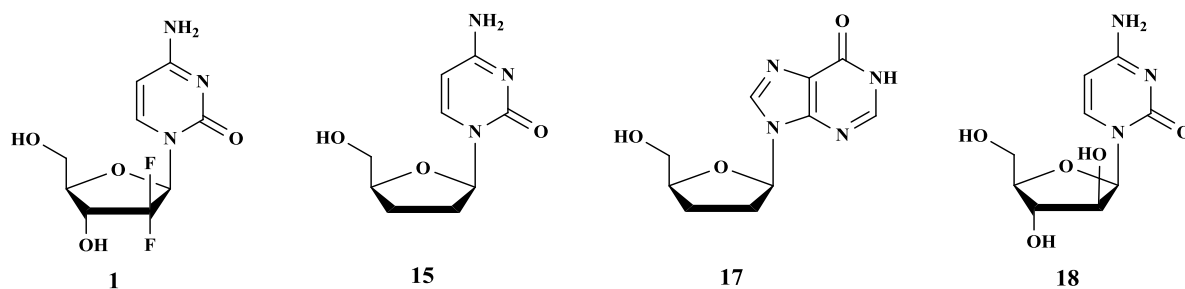


Figure 37

La première phosphorylation chimique d'un nucléoside a été décrite en 1935 par Levene et Tipson.⁹⁴ Ces derniers ont traité la (2',3'-isopropylidène)inosine (**32**) par l'oxychlorure de phosphore puis hydrolysé l'intermédiaire obtenu par l'acide chlorhydrique dilué. Le phosphate **33**, isolé sous forme de sel de baryum avec un rendement de 20 % a ensuite été déprotégé pour conduire au phosphate d'inosine (**34**) également isolé sous forme de sel de baryum (**Schéma 3**).

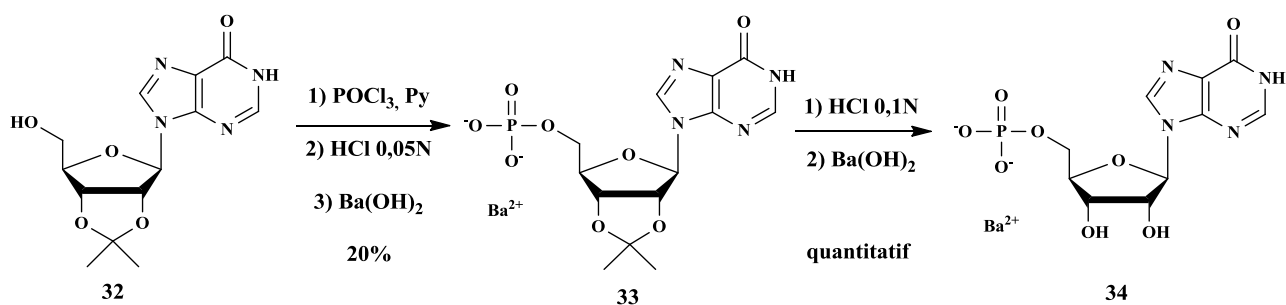


Schéma 3

Ces travaux pionniers ont ouvert la voie à de très nombreuses méthodes plus efficaces dont la recherche a été sous-tendue par le besoin de maîtriser la synthèse des phosphodiester constituant le squelette des oligonucléotides naturels.

Ces méthodes se divisent en deux grandes classes selon qu'elles emploient un réactif au phosphore (V) ou au phosphore (III).

II.1.2.1. Utilisation des réactifs au phosphore (V)

En 1967, Yoshikawa et coll.⁹⁵ proposent une amélioration de la méthode au POCl_3 en introduisant l'utilisation de phosphates de trialkyle (TAP). Il semblerait que l'ajout de TAP facilite grandement la phosphorylation par POCl_3 . Yoshikawa a d'ailleurs postulé l'existence d'une espèce intermédiaire réactive issue de la réaction entre le phosphate de triéthyle et POCl_3 .⁹⁶ De plus, les nucléosides sont solubles dans les TAP, ce qui permet de les utiliser comme solvant (**Schéma 4**).

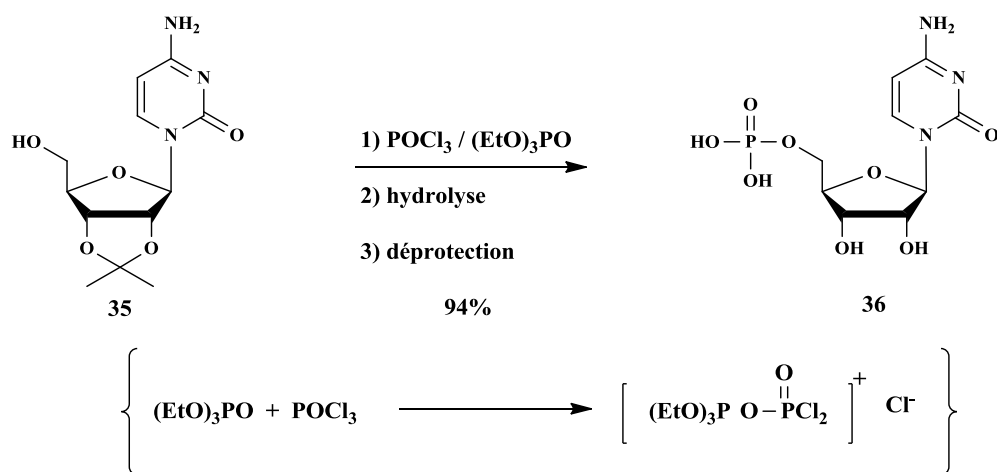


Schéma 4

La même méthode appliquée à des nucléosides non protégés fournit un mélange de phosphates en positions 5', 2' et 3'. Toutefois, il a été montré que le traitement préalable de l'agent de phosphorylation avec une petite quantité d'eau permet une meilleure sélectivité en faveur du phosphate en 5'.⁹⁵

En 1995, Ikemoto et coll.⁹⁷ ont émis une autre hypothèse mécanistique pour rendre compte des réactivités et sélectivités accrues des mélanges POCl_3/TAP par rapport au POCl_3 . En particulier dans le cas des bases purines, ils ont pu montrer que la phosphorylation par POCl_3 s'effectuait sur un complexe phosphate de triéthyle/nucléoside tel que **38** dont l'hydroxyle en 5' est activé par une liaison hydrogène avec l'oxygène de la liaison $\text{P}=\text{O}$ (**Schéma 5**).

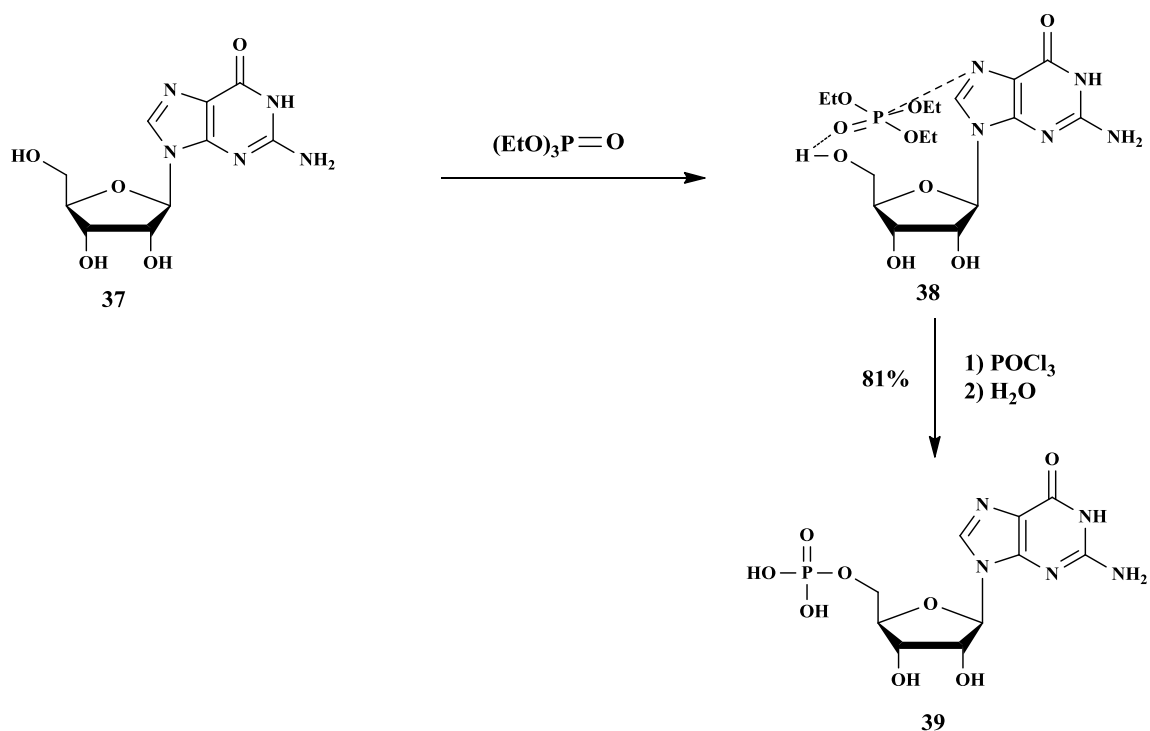


Schéma 5

Alternativement, la phosphorylation sélective de l'alcool en 5' sans protection, ni des fonctions aminées de la base, ni des hydroxyles en 2' et 3' peut être réalisée par le chlorure de pyrophosphate $(\text{Cl}_2\text{PO})_2\text{O}$ dans le *méto*-crésol.^{98,99} Par exemple, l'adénosine **37** fournit dans ces conditions le monophosphate **40** avec un rendement de 71% (Schéma 6).

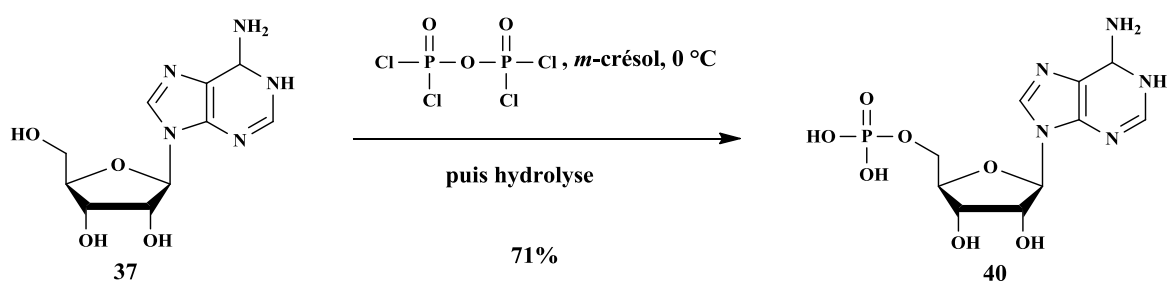


Schéma 6

D'autres méthodes ont ensuite été développées, utilisant des phosphorochloridates ou le phosphate acide de bis-(alkyle). Ces méthodes nécessitent une étape de phosphorylation puis une étape de déprotection des groupes alkyles. La nature du groupement alkyle joue donc un rôle crucial car l'étape de déprotection doit être compatible avec les multiples fonctions contenues dans les

nucléotides. Les groupements alkyles simples ont été peu utilisés car leur hydrolyse est difficile. On leur préfère des groupements pouvant être déprotégés sélectivement comme le benzyle, l'allyle ou le *tert*-butyle. Par exemple, Mioskowski et coll.¹⁰⁰ ont préparé le monophosphate **43** issu du d₄T (**41**) avec un rendement de 75 % par condensation avec l'acide dibenzylphosphorique dans les conditions de Mitsunobu suivie d'une déprotection par le bromure de triméthylsilyle (**Schéma 7**).

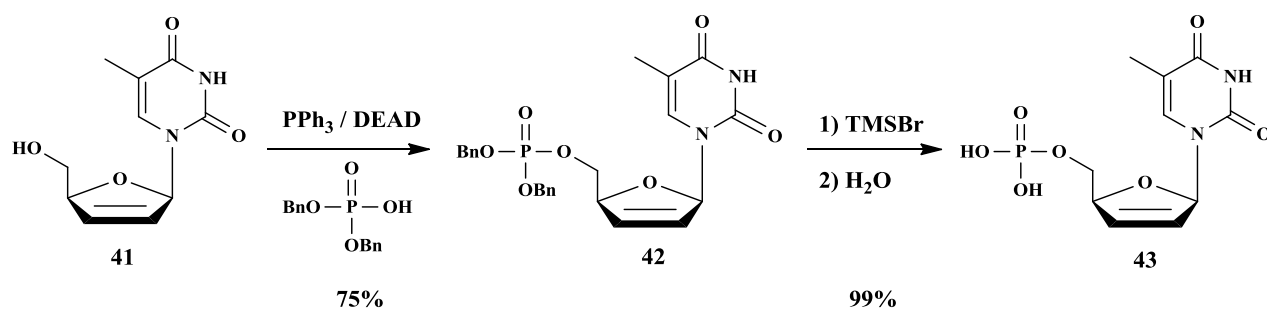


Schéma 7

En 1971, Faerber et Scheit¹⁰¹ ont proposé une méthode utilisant le phosphorochloridate de bis-(trichloroéthyle) en présence de pyridine pour phosphoryler la 3'-O-acétyl-2-thiothymidine (**44**). La phosphorylation est suivie d'une déprotection du groupement phosphate par réduction par le couple Zn/Cu dans le DMF et d'une hydrolyse avec l'ammoniaque pour fournir le phosphate **45** avec un rendement total de 43% (**Schéma 8**).

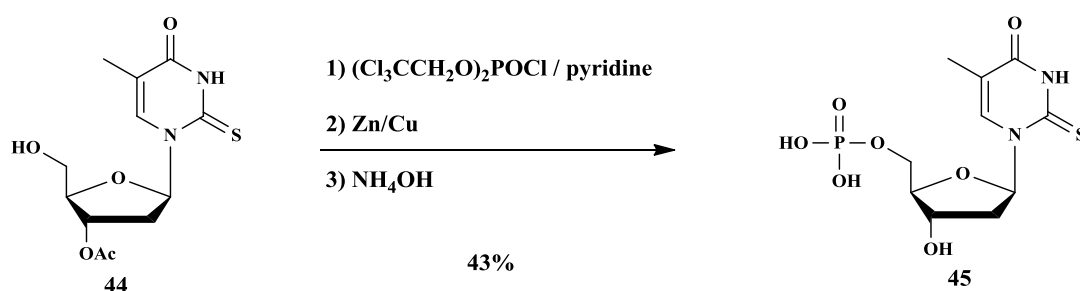


Schéma 8

Une autre méthode a été proposée en 1984 par Hayakawa et coll.¹⁰² Le nucléoside est activé en 5' par formation d'un alcoolate de magnésium sous l'action d'un réactif de Grignard puis est couplé avec le phosphorochloridate de bis-(allyle). Cette méthode a été notamment appliquée à la

cytidine protégée **35**.¹⁰³ L'étape de déprotection est effectuée par déallylation réductive en présence de palladium, de butylamine et d'acide formique (**Schéma 9**).

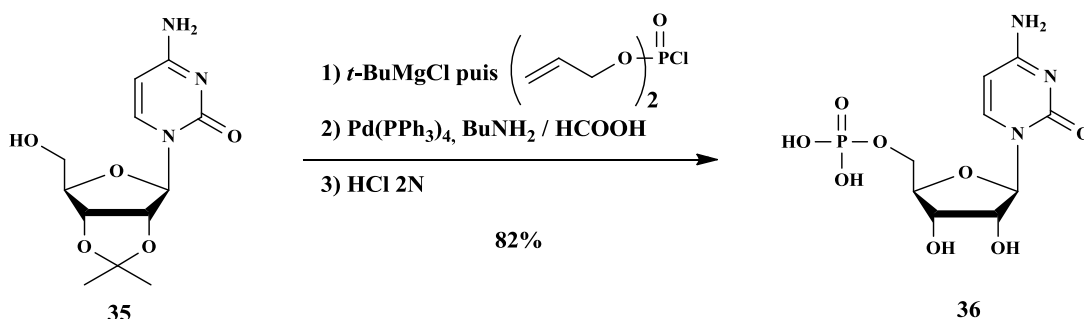


Schéma 9

II.1.2.2. Utilisation des réactifs au phosphore (III)

Les dérivés du phosphore (III) ont été utilisés pour la première fois pour phosphoryler un nucléoside par Honjo et Marumoto¹⁰⁴ en 1966. Si ces composés sont parfois plus réactifs que ceux du phosphore (V), leur utilisation requiert cependant une étape d'oxydation supplémentaire généralement effectuée par traitement à l'eau oxygénée, un peroxyde d'alkyle ou l'iode. Honjo et coll. ont traité l'inosine **34** par PCl_3 à l'air et obtenu directement après hydrolyse le monophosphate **39**. Le rendement après clivage du groupe isopropylidène est de 91%. Un mécanisme plausible serait que la réaction entre le nucléoside et PCl_3 donne intermédiairement un dichlorophosphite qui est ensuite oxydé en dichlorophosphate par l'oxygène de l'air (**Schéma 10**).

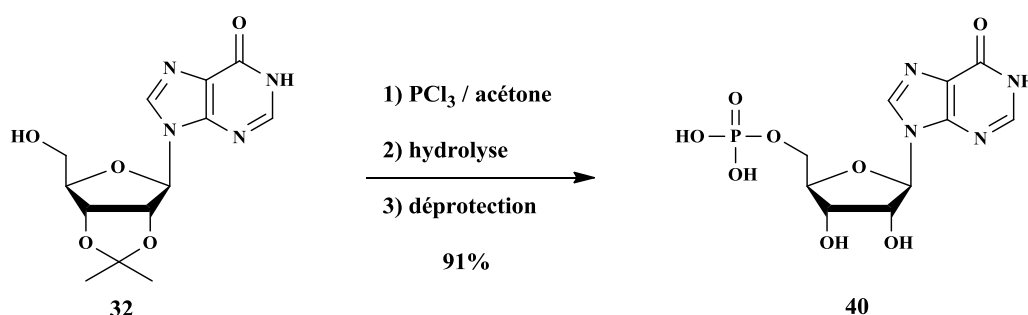


Schéma 10

Les phosphorochloridites de dialkyle ont été peu utilisés car ils sont à peine plus réactifs que leurs homologues au phosphore (V) et requièrent une étape d'oxydation supplémentaire. La phosphorylation de **46** par le phosphorochloridite de diallyle suivie d'oxydation par l'hydroperoxyde de *tert*-butyle fournit le phosphate **47** avec un rendement de 89% (**Schéma 11**).

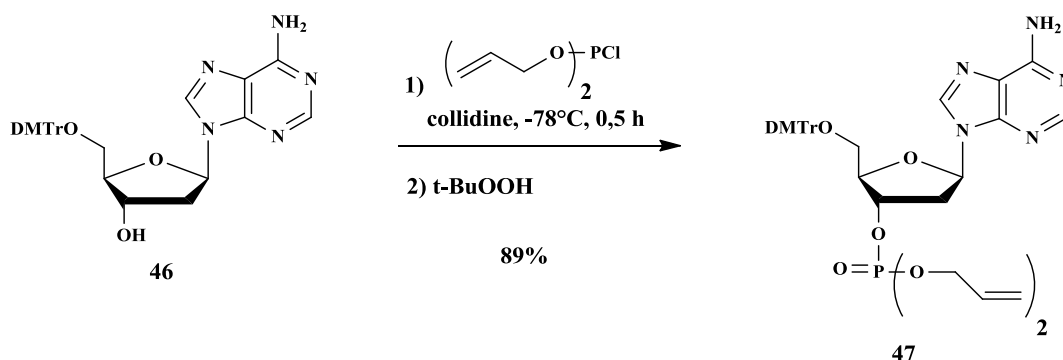


Schéma 11

Introduite en 1981 par Beaucage et Caruthers¹⁰⁵ dans le cadre de la synthèse des oligonucléotides, la méthode aux phosphoramidites s'est imposée comme la meilleure voie d'accès aux mono- et diphosphates d'alkyle. Aujourd'hui, une large variété de réactifs est disponible dans le commerce, portant des groupements variés tant sur l'azote que sur les oxygènes (**Figure 38**).

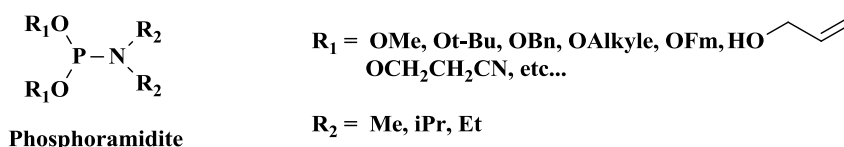


Figure 38

Le principe de la méthode¹⁰⁶ est le suivant : Le nucléoside est traité avec le phosphoramidite en présence de tétrazole, qui permet d'activer ce phosphoramidite par protonation de l'azote, pour donner un phosphite de dialkyle. Le phosphite obtenu est ensuite oxydé en phosphate de trialkyle par I₂, H₂O₂, *t*-BuOOH ou AcOOH. Le phosphate protégé peut enfin être libéré par différentes méthodes en fonction des groupements protecteurs utilisés (**Schéma 12**). Notons que les groupements amino des cytidines et des adénosines doivent être protégés.

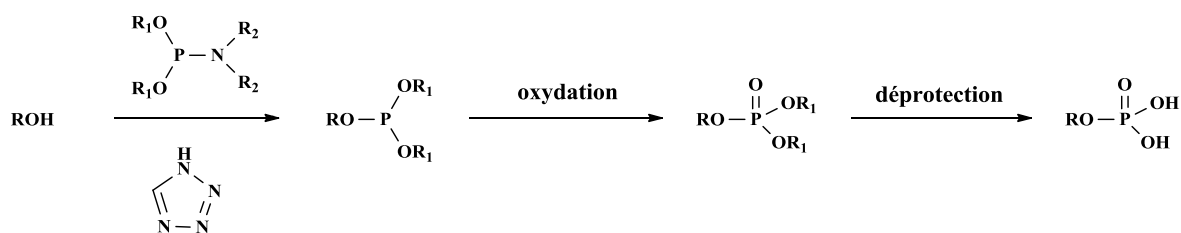


Schéma 12

Il existe de très nombreux exemples de cette méthode. Nous n'en retiendrons que quelques uns pour illustrer son efficacité.

La phosphorylation de l'analogue de l'adénosine, $N^6,2'$ -disubstitué **48**, en utilisant le bis-(2-cyanoéthyl)diisopropylamidophosphite **49** a été décrite par Kennedy.¹⁰⁷ Cette réaction est catalysée par le 2-thioéthyle tétrazole qui est légèrement plus acide que le tétrazole (pKa = 4,28 au lieu de 4,80). Le groupement 2-cyanoéthoxyphosphate présente l'avantage de pouvoir être déprotégé par une base selon un mécanisme de type β -élimination. Après oxydation et déprotection du phosphate par l'ammoniaque, le composé est acidifié avec de l'acide citrique pour donner le monophosphate **50** avec un rendement global de 80% (Schéma 13).

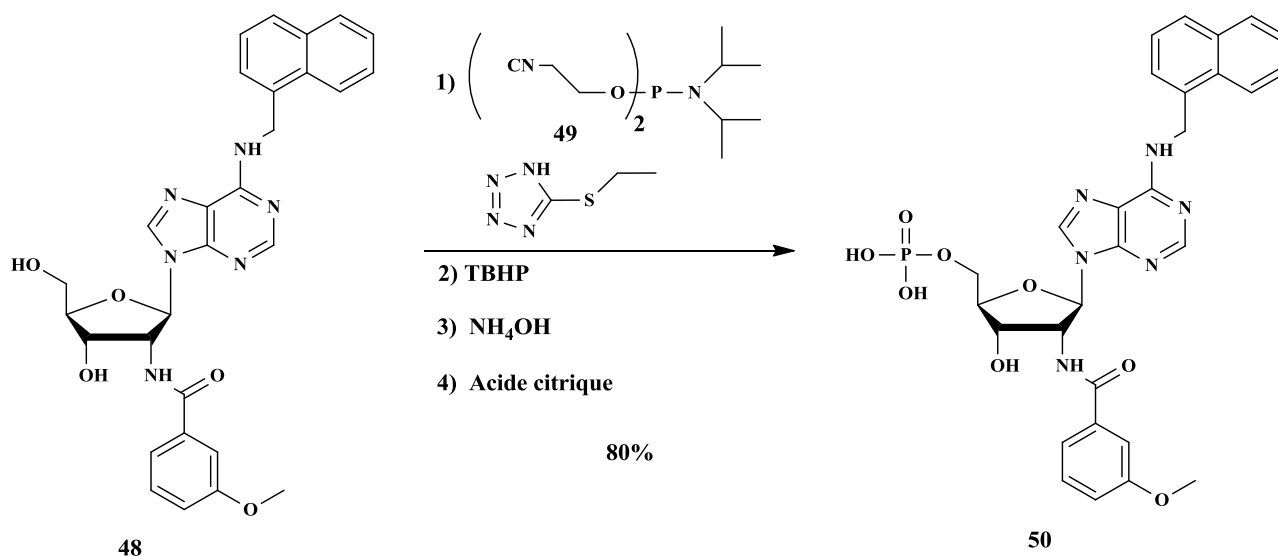


Schéma 13

Fletcher et coll.¹⁰⁸ ont phosphorylé l'AZT (**16**) au moyen du diéthylamidophosphite de di-*tert*-butyle. Après oxydation du phosphite intermédiaire par l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque, les groupements *tert*-butyles ont été clivés par traitement à l'acide trifluoroacétique. Le monophosphate obtenu est salifié par l'ammoniac pour donner le sel d'ammonium **51** (Schéma 14).

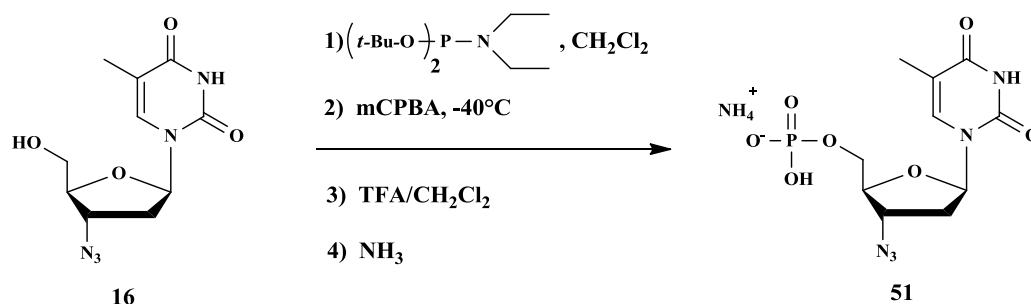


Schéma 14

II.1.2.3. Phosphorylations enzymatiques

Les biotechnologies offrent un certain nombre de méthodes alternatives à la synthèse chimique pour accéder aux monophosphates de nucléosides. Il existe deux types de techniques selon que l'on utilise des enzymes purifiées ou des micro-organismes entiers.

La purification des kinases et leur immobilisation sur un support solide sont des opérations délicates et coûteuses. Toutefois, une fois cette étape effectuée, ces enzymes immobilisées permettent la synthèse des monophosphates dans des conditions douces et sans aucune protection. Cotticelli et Salvetti¹⁰⁹ ont notamment étudié l'action de la déoxynucléoside kinase de *Drosophila melanogaster* (*Dm*-DNK) sur des nucléosides naturels (déoxythymidine et déoxyadénosine) ou synthétiques, comme l'AZT. Par exemple, la déoxythymidine (**52**) est très efficacement phosphorylée par l'ATP en présence de *Dm*-DNK ($k_{\text{cat}} = 4,8 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$) comparativement à l'AZT (**16**) ($k_{\text{cat}} = 0,028 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$) (Schéma 15).

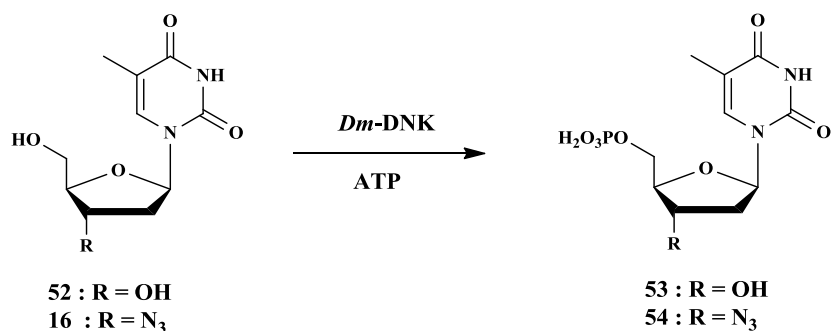


Schéma 15

Alternativement, l'emploi des micro-organismes entiers évite la fastidieuse purification des kinases. Toutefois cette méthode nécessite de cultiver des bactéries avec les difficultés et les risques associés aux pathogènes. Par exemple, le traitement de la guanosine **55** par le pyrophosphate de sodium en présence d'enterobactéries comme *Klebsiella singaporensis* donne le monophosphate **56** avec 50% de rendement (**Schéma 16**).¹¹⁰

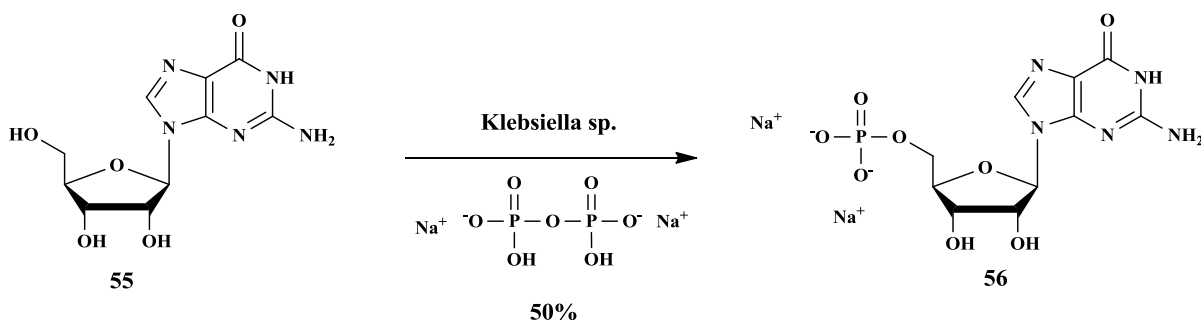


Schéma 16

II.1.2.4. Conclusion

A ce jour, la synthèse des monophosphates de nucléosides repose principalement sur la méthode aux phosphoramidites qui permet de phosphoryler la plupart des nucléosides naturels et synthétiques dans des conditions douces. Les dérivés de phosphore (V) gardent quant à eux certains avantages, notamment lorsqu'aucun problème de chimiosélectivité n'intervient. Enfin, les biotechnologies ne jouent encore qu'un rôle marginal même si leur importance est amenée à croître.

II.1.3. Exposé des travaux

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, nous nous sommes donnés comme objectif de synthétiser le monophosphate de Gemcitabine-squalène (**31**) et d'évaluer les propriétés d'auto-organisation de cette molécule en milieu aqueux, ainsi que son activité biologique anticancéreuse *in vitro*.

D'un point de vue synthétique, deux stratégies peuvent être envisagées. Une première consiste à phosphoryler la Gemcitabine (**1**) en position 5' dans un premier temps puis à squaléniser en position N-4. La seconde stratégie consiste à squaléniser puis à phosphoryler en position 5' (**Figure 39**).

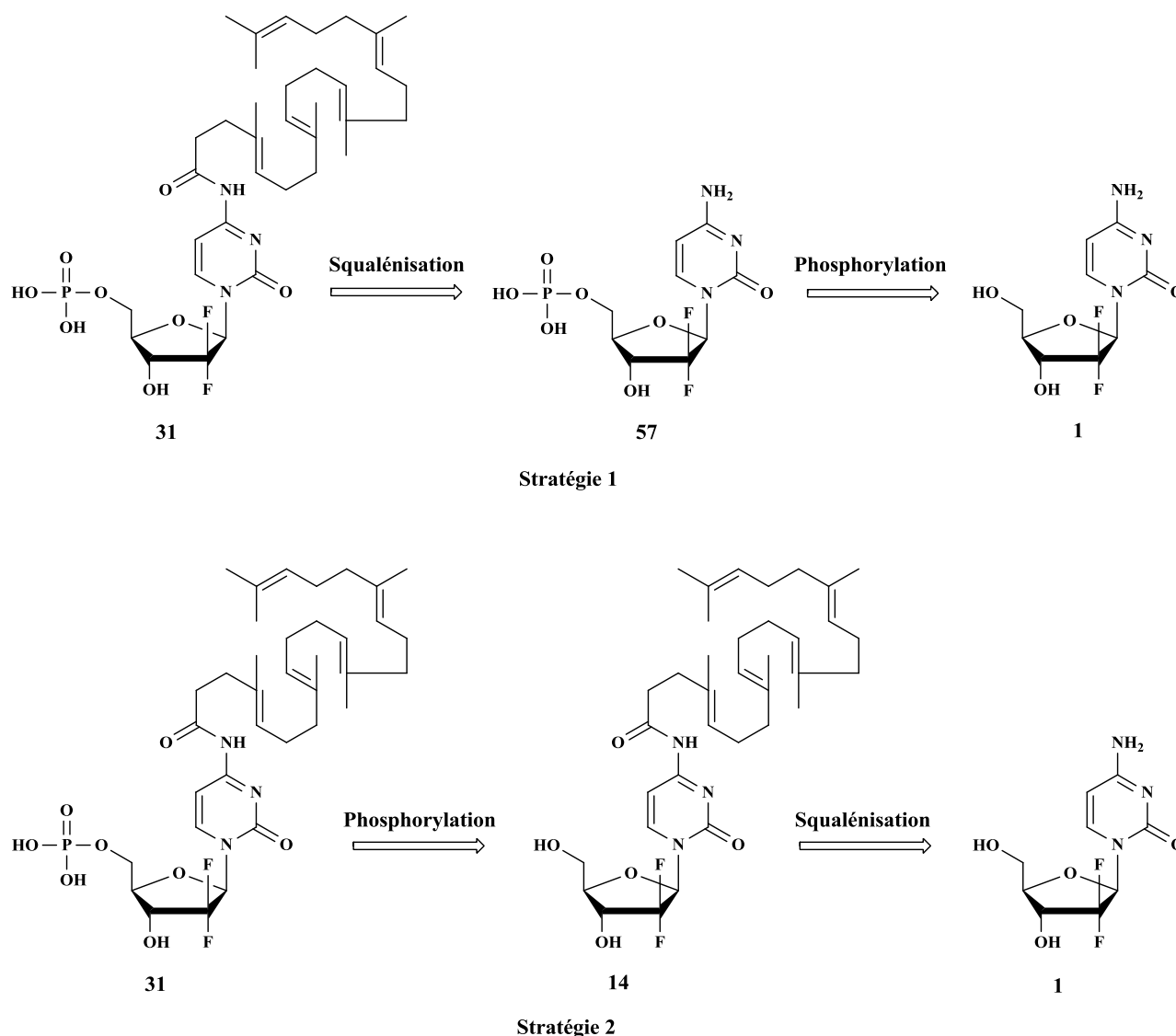


Figure 39

II.1.3.1. Squalénisation directe de la Gemcitabine monophosphate (57)

Nous avons choisi d'explorer d'abord la première stratégie, même si l'on pouvait craindre des difficultés liées à la faible solubilité des nucléosides phosphatés dans les milieux organiques.

La Gemcitabine monophosphate (**57**) n'est pas disponible dans le commerce. Sa synthèse a cependant été décrite par action d'un mélange $\text{POCl}_3/\text{PO}(\text{OMe})_3$, suivie d'une purification assez laborieuse.¹¹¹ C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'acylation directe de la fonction amine exocyclique de la cytosine sur la déoxycytidine monophosphate (dCMP, **58**),^{112,113} utilisée comme modèle simplifié et disponible dans le commerce (**Figure 40**).

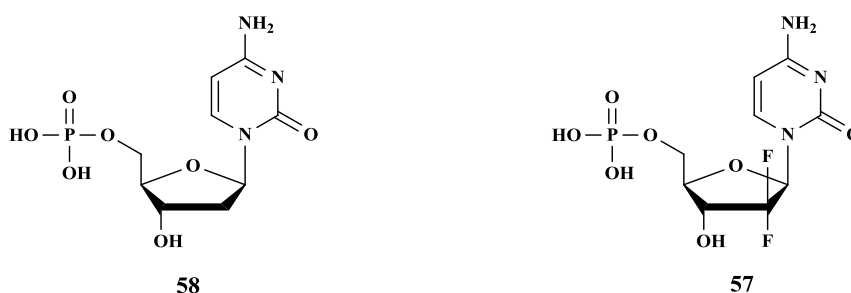


Figure 40

L'acide trisnor-squalénique **13** a tout d'abord été préparé à partir du squalène (**10**) en 4 étapes selon le schéma synthétique décrit dans les années 1960 par van Tamelen (voir page 22).^{49,114,115} Le squalène est traité par le *N*-bromosuccinimide dans un mélange eau/THF. La bromhydrine **11** obtenue avec un rendement de 30 % est ensuite traitée par du carbonate de potassium dans le méthanol pour donner l'époxyde **12** avec un rendement de 98 %. L'époxyde est alors oxydé par l'acide periodique pour former l'aldéhyde 1,1',2-trisnorsqualénique (**59**) par coupure oxydante avec un rendement de 83 %. L'aldéhyde **59** est ensuite oxydé par le réactif de Jones en acide squalénique **13** avec 80 % de rendement (**Schéma 17**).

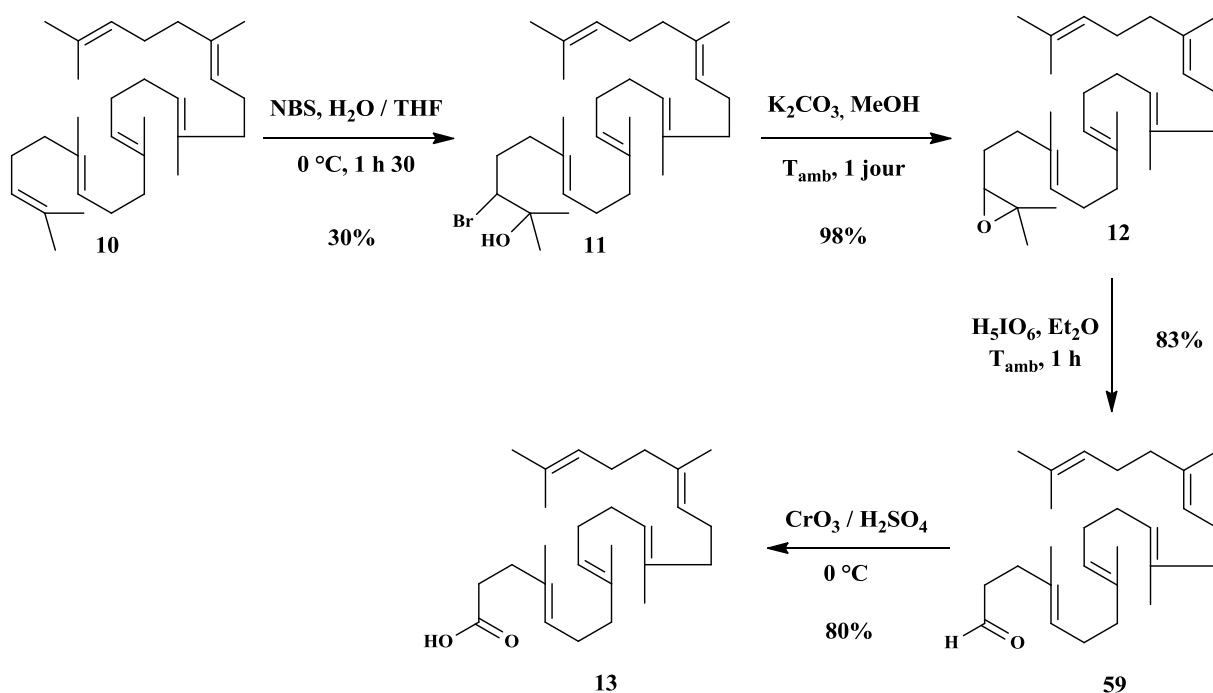


Schéma 17

Ce procédé souffre cependant d'un rendement modeste et nécessite une purification fastidieuse par chromatographie de la bromhydrine **11**. Malheureusement, les différents essais effectués, décrits dans la littérature, pour éviter l'étape de synthèse de la bromhydrine **11** en utilisant des agents d'époxydation se sont traduits par une perte de chimiosélectivité, menant à des époxydes sur toutes les doubles liaisons du squalène.^{116,117} Toutefois, Sharpless a décrit la synthèse énantiosélective du (3S)-2,3-époxy-squalène *via* une dihydroxylation asymétrique mais avec un rendement chimique modeste.¹¹⁸

La condensation directe de la déoxycytidine monophosphate avec l'anhydride mixte de l'acide 1,1',2-trisnor-squalénique (**13**)^{49,114,115} dans le DMF n'a fourni qu'une quantité infime d'un mélange inséparable des dérivés monosqualénisés **60** et **61** accompagnés du composé bis-squalénisé **62**, avec des rendements respectifs de 4 % et 6 % (Schéma 18).

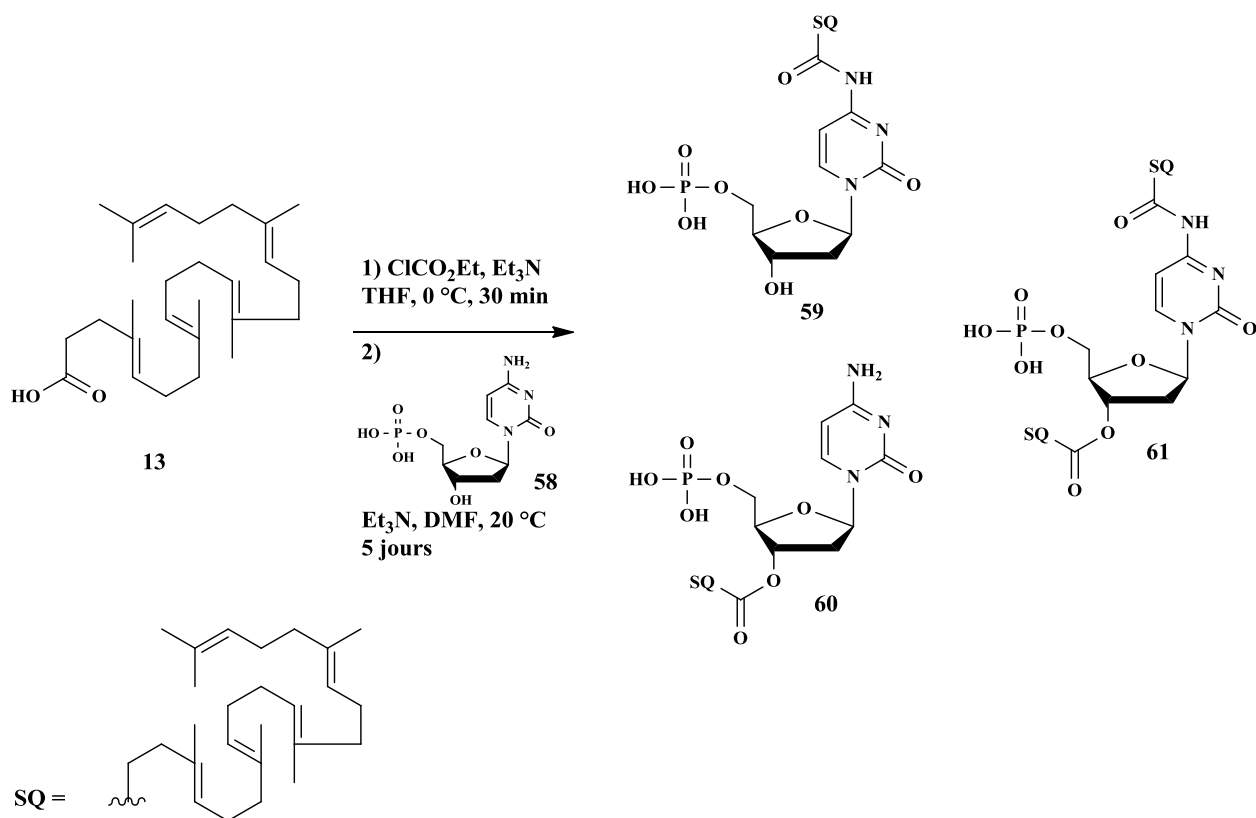


Schéma 18

La très faible solubilité des nucléosides phosphatés dans les milieux organiques explique très largement l'échec de cette méthode.

II.1.3.2. Phosphorylation de la ddC-SQ (19)

Suite à cet échec nous nous sommes tournés vers la seconde stratégie consistant à squaléniser dans un premier temps la Gemcitabine puis à phosphoryler l'alcool en position 5'. Nous avons vu précédemment qu'il existe de nombreuses méthodes pour phosphoryler les nucléosides (c.f. partie bibliographique sur la phosphorylation).^{119,120} Nous avons décidé dans un premier temps de rechercher le réactif le plus adapté sur un modèle simplifiée de la Gemcitabine-squalène : la Didéoxycytine-squalène (ddC-SQ, **19**), qui ne possède qu'un seul hydroxyle en position 5', évitant ainsi les problèmes de chimiosélectivité (**Figure 41**).

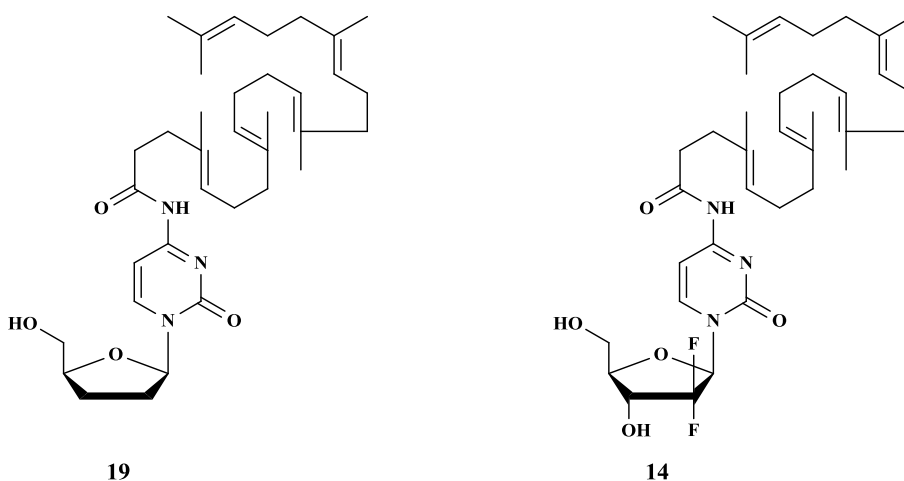


Figure 41

La ddC-SQ (**19**) a été préparée selon le protocole mis au point au Laboratoire par condensation de la ddC (**15**) avec l'acide trisnor-squalénique (**13**). Enfin, le couplage de la ddC (**15**) avec l'anhydride mixte résultant de la réaction de l'acide **13** avec le chloroformiate d'éthyle, fournit la ddC-SQ (**19**) avec un rendement de 50 % (**Schéma 19**).⁴⁹

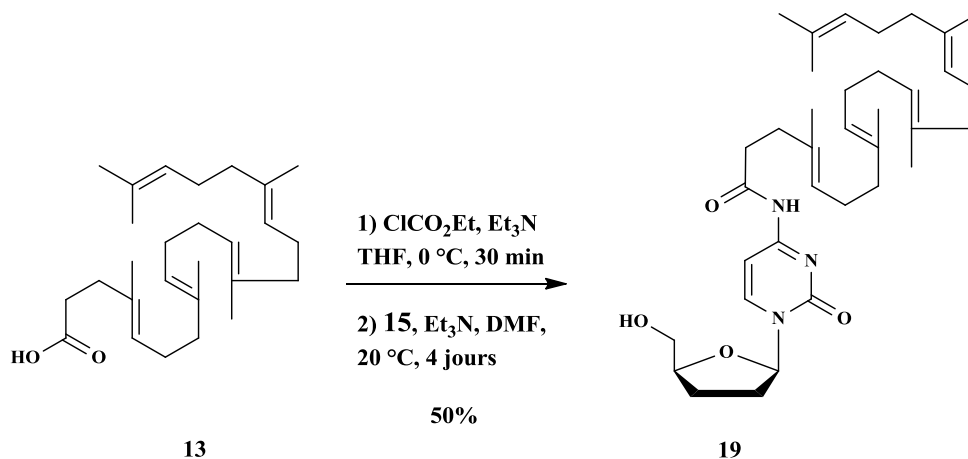


Schéma 19

Si la méthode aux phosphoramidites a démontré une efficacité remarquable pour phosphoryler les analogues nucléosidiques, les dérivés du phosphore V restent néanmoins des réactifs sûrs et simples à utiliser. Nous avons donc choisi dans un premier temps de tester de tels composés. Toutefois, la condensation de la ddC-SQ avec le chlorure de phosphoryle en présence de triéthylphosphate⁹⁵ s'est révélée infructueuse, à cause du clivage compétitif de la fonction amide

reliant la chaîne squalène au noyau cytosine. Nous avons pensé que ce processus de type Vilsmeier pourrait être minimisé en utilisant un réactif moins électrophile que POCl_3 . Notre choix s'est alors porté sur les phosphorochloridates de dialkyle dont bon nombre sont commerciaux.

La condensation de la ddC-SQ (**19**) avec le phosphorochloridate de diéthyle en présence de phosphate de triéthyle, dans les conditions de Yoshikawa^{95,121} a fourni le phosphotriester **63** avec un rendement de 90 %. Restait à déprotéger le phosphate de diéthyle obtenu. Le bromure de triméthylsilyl est un des réactifs les plus efficaces pour cliver les phosphates d'alkyles.^{100,122} Cependant, dans notre cas, nous obtenons un mélange complexe, résultant de la coupure de la liaison amide cytosine-squalène, ainsi que de la dégradation de la chaîne squalène (**Schéma 20**).

L'utilisation dans les mêmes conditions du dibenzylchlorophosphate^{123,124} a permis d'obtenir le phosphotriester **64**, bien qu'avec un rendement plus faible de 48 %. Les phosphates de dibenzyles sont généralement déprotégés par hydrogénation catalytique. Dans notre cas, la chaîne squalène nous interdit d'avoir recours à cette méthode. Nous pouvions cependant espérer que les groupements benzyles soient plus susceptibles d'être clivés par TMSBr que les groupes éthyles. Malheureusement, le traitement de ce phosphotriester par le TMSBr n'est pas efficace et fournit comme précédemment un mélange complexe.

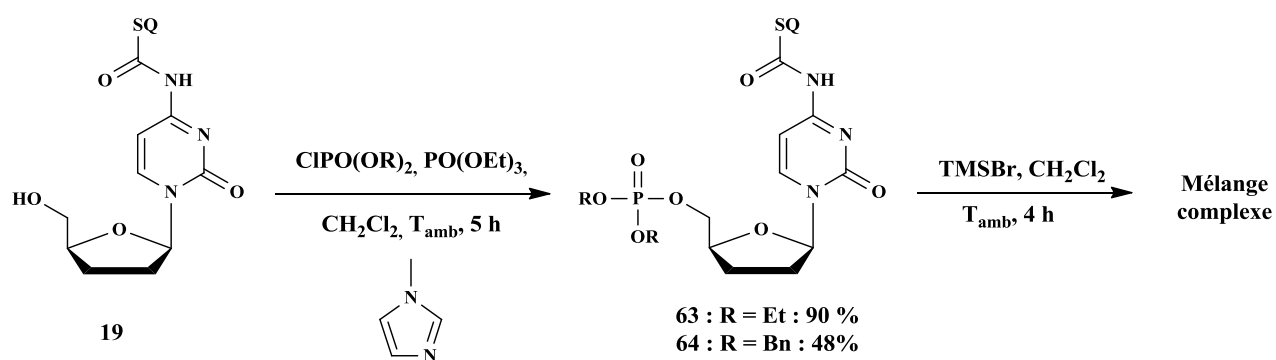


Schéma 20

Compte tenu de ces échecs, nous nous sommes tournés vers les phosphoramidites dont il existe une large variété de dérivés permettant une déprotection dans des conditions plus douces.¹²⁵

Nous avons dans un premier temps testé le (2-cyanoéthyl)-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite,¹²⁶ qui permet une fois la phosphorylation effectuée de libérer la fonction phosphate en milieu basique par β -élimination. Le traitement séquentiel de la ddC-SQ (**19**) avec **65** en présence de la base de Hünig puis de 3-hydroxypropionitrile et de tétrazole, suivi d'un

traitement oxydatif par l'iode donne le phosphotriester **66** attendu avec un rendement très faible. Celui-ci est dû à l'addition partielle de l'iode sur les double liaisons du squalène. Cependant, quand l'eau oxygénée est utilisée en tant qu'oxydant, le phosphotriester **66** est obtenu avec un meilleur rendement, quoiqu'encore modeste, de 23 % (**Schéma 21**).

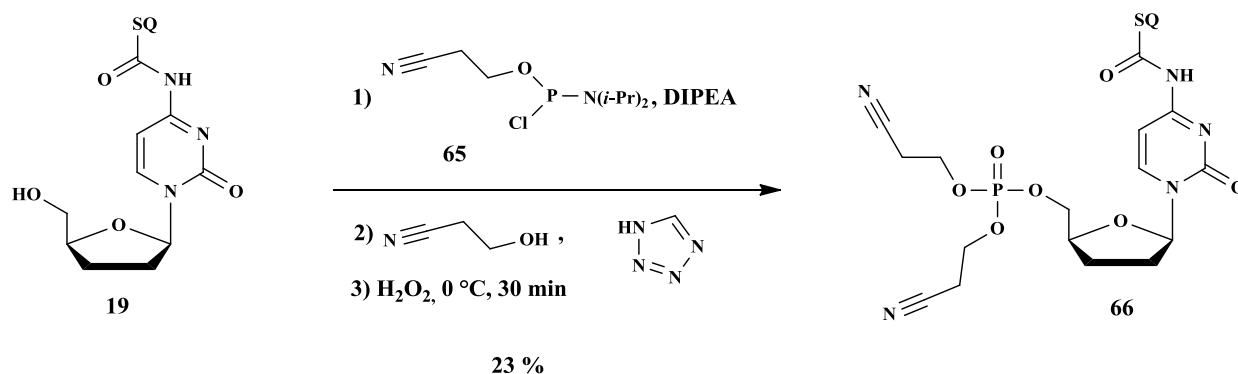


Schéma 21

L'utilisation du bis-(2-cyanoéthyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite^{106,107} pour tenter d'améliorer ce faible rendement s'est avérée infructueuse puisque le phosphotriester attendu **66** n'a pas pu être isolé. La déprotection finale du groupement phosphate en présence de DBU via un mécanisme de β -élimination, a quand même été effectuée à partir du composé **66** mais n'a permis que de cliver un seul groupement cyanoéthyle fournissant le phosphodiester **67** avec un rendement modeste (**Schéma 22**).¹²⁷ La même réaction effectuée en présence de TMSCl qui a été rapporté comme un activateur électrophile du processus a conduit au même résultat.¹²⁸

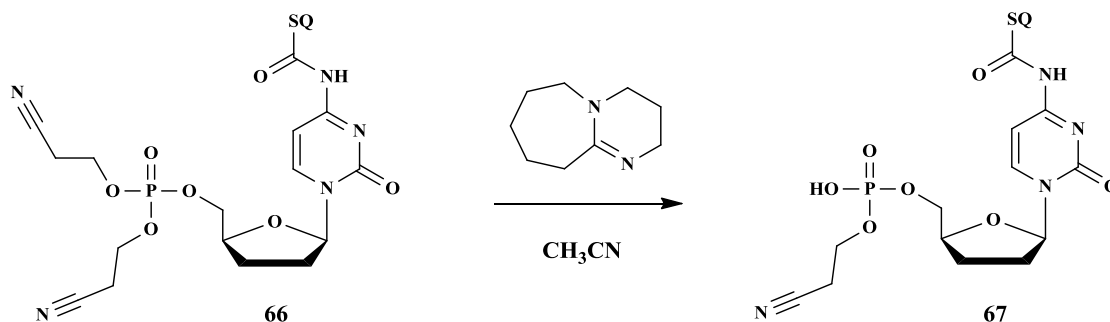


Schéma 22

L'utilisation du bis-(9-méthylfluorényl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite (**68**) comportant deux groupements protecteur 9-méthylfluorényle semblait être une bonne solution. En effet ce groupement est facilement clivable par les amines tertiaires et notamment la triéthylamine, comme l'a démontré Watanabe.¹²⁹

Ce phosphoramidite, non disponible dans le commerce, a été préparé à parti du PCl_3 selon le protocole d'origine, sans toutefois isoler le dichlorophosphoramidite **69** (Schéma 23).¹³⁰ La diisopropylamine est condensée sur le trichlorophosphite dans le THF en présence de base de Hünig pour fournir le *N,N*-diisopropyldichlorophosphite intermédiaire (**69**). Ce dernier est traité directement avec le 9-fluorénylméthanol en présence de diisopropyléthylamine pour donner le phosphoramidite **68** avec un rendement global de 96 %.

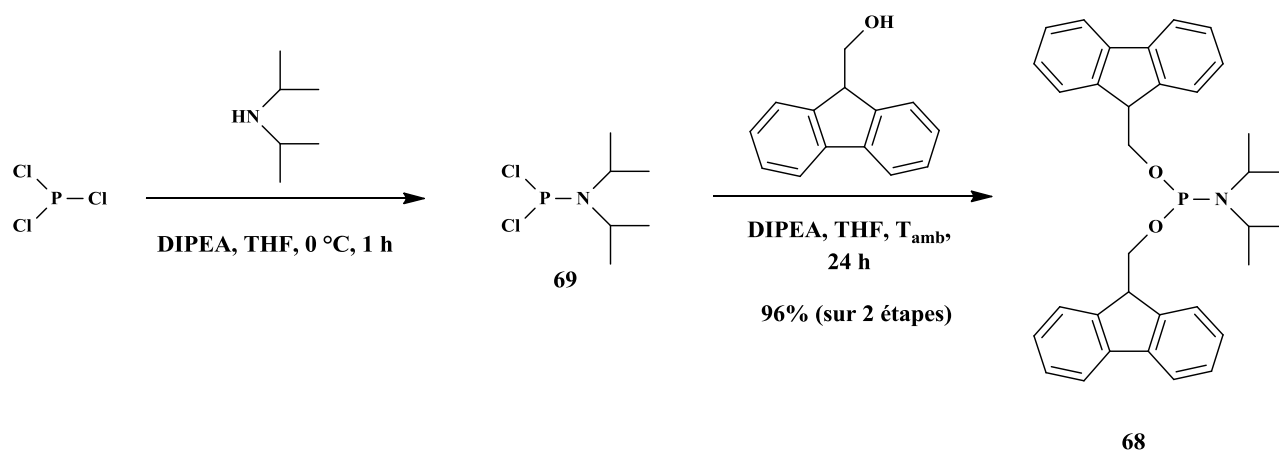


Schéma 23

La condensation du ddC-SQ (**19**) avec le phosphoramidite **68** en présence de tétrazole, suivi d'un traitement oxydatif à l'eau oxygénée a fourni le phosphotriester **70** avec un rendement de 52% sans que la chaîne squalène ne soit affectée (Schéma 24).

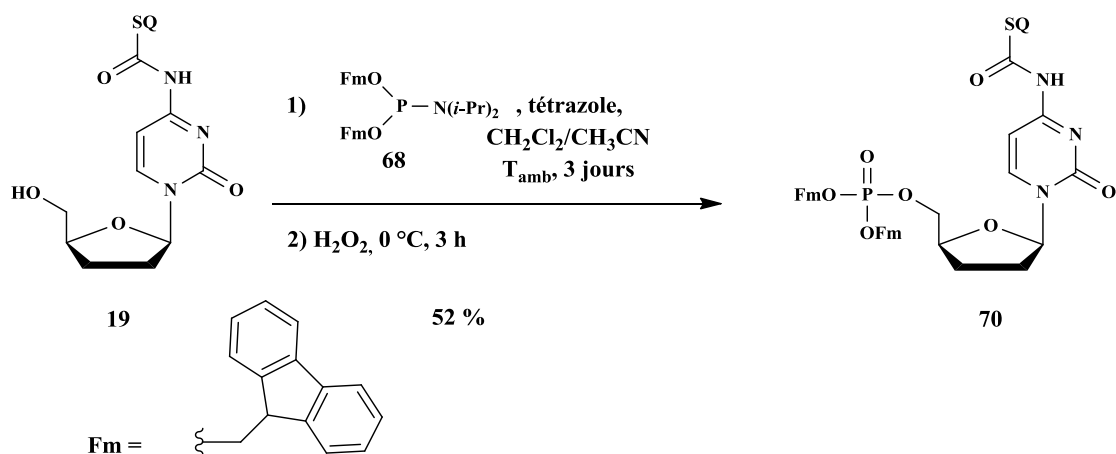


Schéma 24

La déprotection des bis-fluorényles phosphates est généralement effectuée par β -élimination au moyen d'une amine dans l'acétonitrile¹³¹, la pyridine,¹³² la soude ou l'ammoniaque.¹³³ Dans notre cas, la déprotection effectuée dans l'acétonitrile en présence d'un large excès de triéthylamine fournit un brut réactionnel contenant le phosphate de triéthylammonium de ddC-SQ (**71**) et le 9-méthylène-9*H*-fluorène. Ce produit secondaire est éliminé par lavages successifs avec l'éther diéthylique, dans lequel le sel de phosphate n'est pas soluble. Le sel de triéthylammonium **71** a ainsi été isolé avec un rendement quasi-quantitatif de 98 % sous forme d'un solide blanc amorphe (Schéma 25).

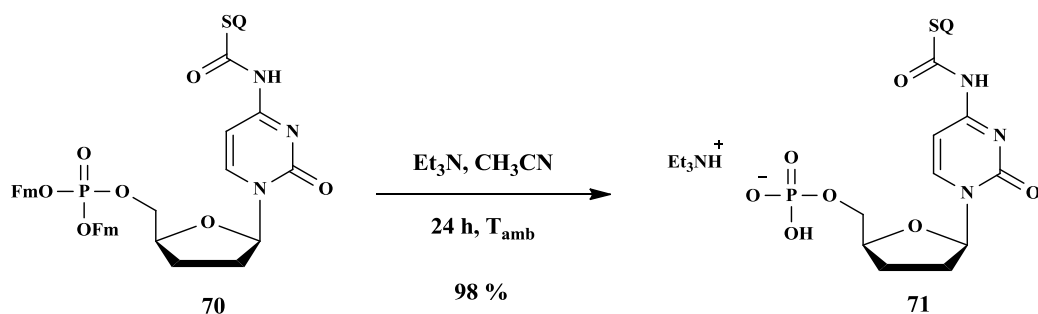


Schéma 25

II.1.3.3. Synthèse de la Gemcitabine-squalène monophosphate (31)

Avec une méthode de phosphorylation efficace, nous nous sommes ensuite intéressés au cas de la Gemcitabine qui semblait être plus compliqué, à cause de la présence d'une fonction hydroxyle en 3'.

Bien que les deux groupements hydroxy en position 5' et 3' puissent potentiellement réagir, nous avons étudié la phosphorylation directe par la méthode aux phosphoramidites de la Gemcitabine-squalène (**14**), synthétisée par couplage avec l'anhydride mixte de l'acide 1,1',2-trisnor-squalénique (**13**).⁴⁹ Cette réaction a été effectuée en utilisant un seul équivalent du phosphoramidite **68** et un excès de tétrazole. Le phosphite intermédiaire a été oxydé *in situ* par de l'eau oxygénée en large excès pendant 2 heures pour donner le phosphate de trialkyle **72** attendu. Cependant, celui-ci a été isolé avec un faible rendement (10 %), accompagné d'autres phosphates correspondant aux dérivés 3'-phosphaté **73** et 3',5'-diphosphaté **74** avec un rendement cumulé de 20 % (Schéma 26).

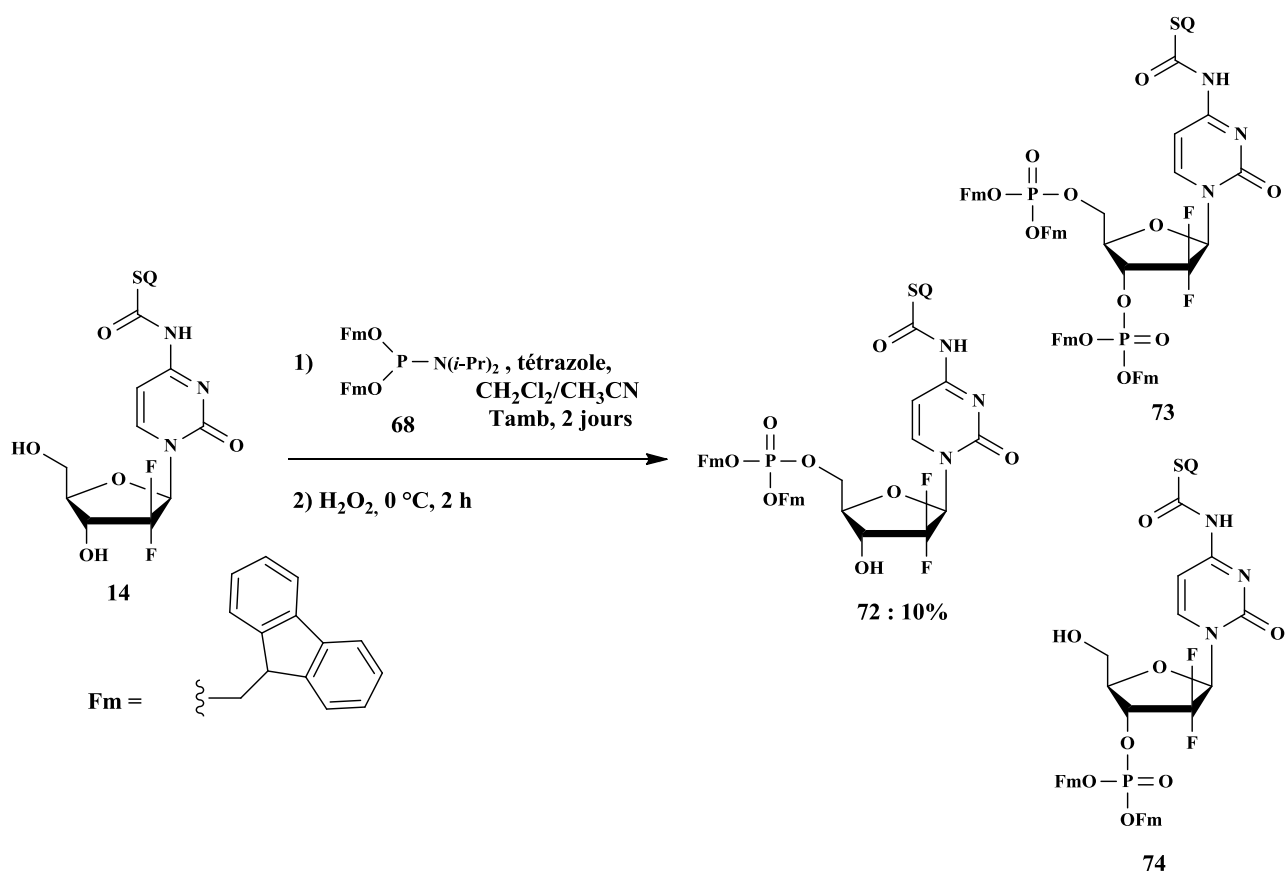


Schéma 26

La faible sélectivité de cette réaction et la difficulté de séparer les divers produits nous ont conduits à reconsidérer notre schéma synthétique. Il est en effet apparu qu'il nous fallait protéger l'alcool en 3' qui s'avère beaucoup plus réactif que prévu, compte tenu de son encombrement. L'accroissement de l'acidité dû à l'effet attracteur des deux fluors est probablement à l'origine de ce phénomène.

Pour palier la nucléophilie inattendue de l'hydroxyle en 3', il nous fallait le protéger, ce qui impliquerait une protection préalable en 5'. Cette stratégie a déjà été employée par Alexander et coll., en utilisant des groupements protecteurs *tert*-butyldiméthylsilyle en 5' et acétyle en 3', le noyau cytosine de la Gemcitabine étant benzylé.⁹³ Une première protection de l'alcool primaire suivie d'une protection de l'alcool secondaire et de la déprotection du premier permettrait d'obtenir l'intermédiaire clé protégé uniquement en position 3', la phosphorylation pouvant alors être effectuée dans des conditions forcées (**Schéma 27**).

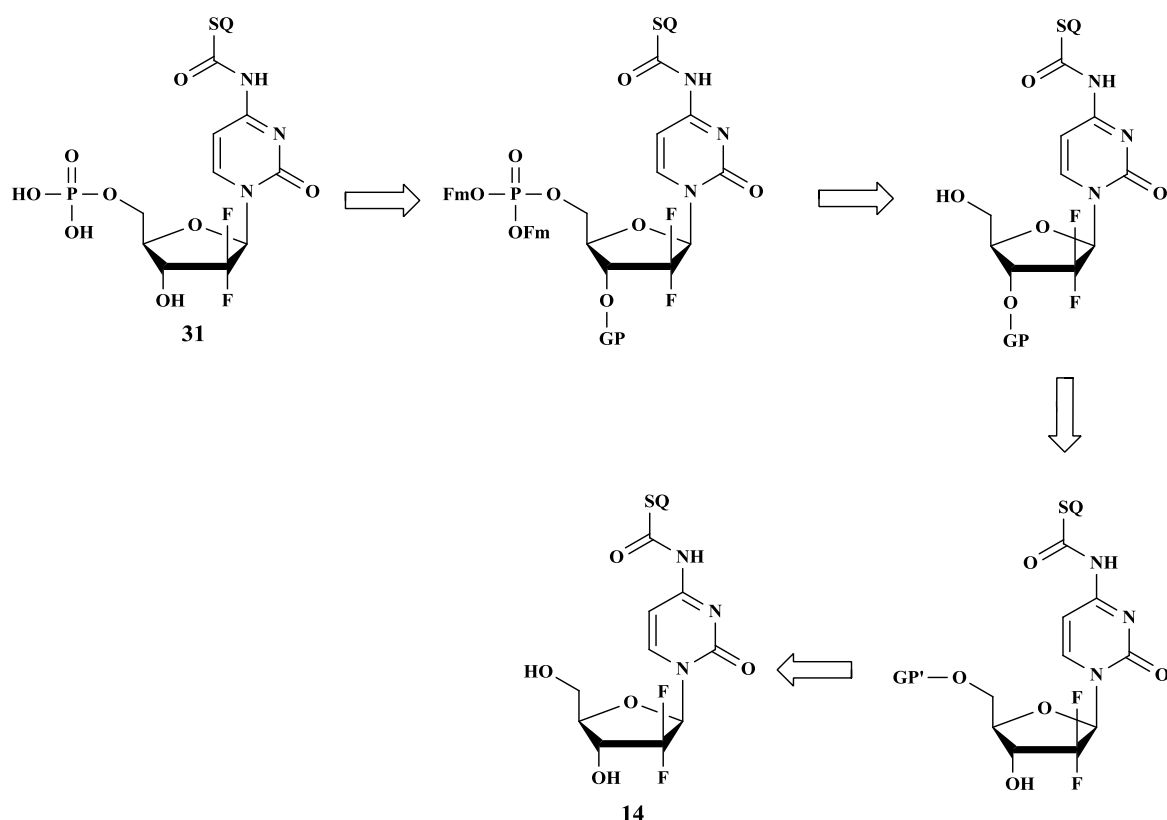


Schéma 27

Il fallait alors trouver des groupements protecteurs dont la déprotection était compatible avec la liaison amide entre le noyau cytosine et la chaîne squalène, celle-ci étant en fait beaucoup plus faible qu'une liaison amide ordinaire.

Nous avons choisi d'introduire un groupement *tert*-butyldiméthylsilyl en 5'. Après protection de l'alcool en 3', un traitement par les ions fluorure devrait régénérer l'hydroxyle en 5' sans affecter le groupe squalénoyle sur la cytosine. La Gemcitabine-squalène (**14**) a donc été traitée par le TBDMSCl en présence d'imidazole pour fournir chimiosélectivement l'éther silylé **75** avec 86 % de rendement (**Schéma 28**).⁹³ Nous n'avons pas isolé de composé silylé en position 3', contrairement à ce que nous avons observé avec les phosphoramidites.

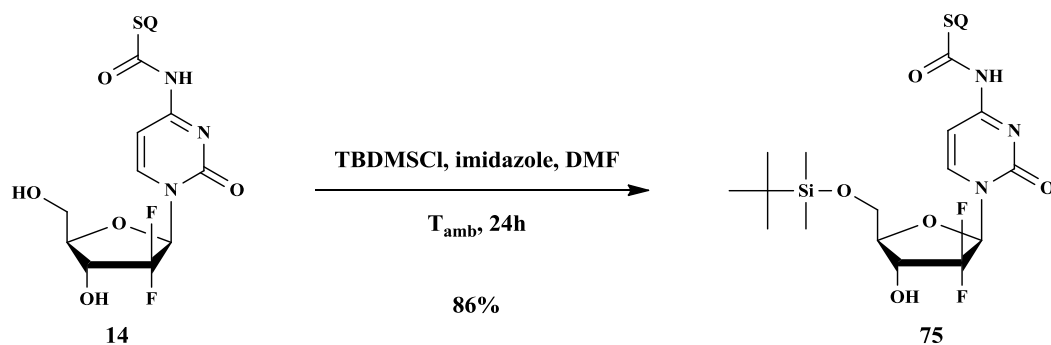


Schéma 28

La protection en 3' a ensuite été testée avec le DMTrCl, dans la pyridine. Cependant nous n'avons observé aucune réaction, l'hydroxyle en 3' étant probablement trop encombré.

La protection en 3' avec un groupement *para*-méthoxybenzyle a ensuite été testée. L'alcoolate du composé **75** a été formé dans un premier temps par traitement au NaH dans le THF, puis celui-ci a été traité par le bromure de *para*-méthoxybenzyle dans le DMF. Malheureusement, après purification, un mélange des composés **76** et **77** tous deux benzylés sur l'azote de la fonction amide a été isolé (**Schéma 29**). De fait, avec un pKa de 9,8 (ACD/Labs software) le proton porté par cet azote est beaucoup plus acide que celui d'un amide ordinaire ce qui expliquerait ce résultat à priori étonnant.

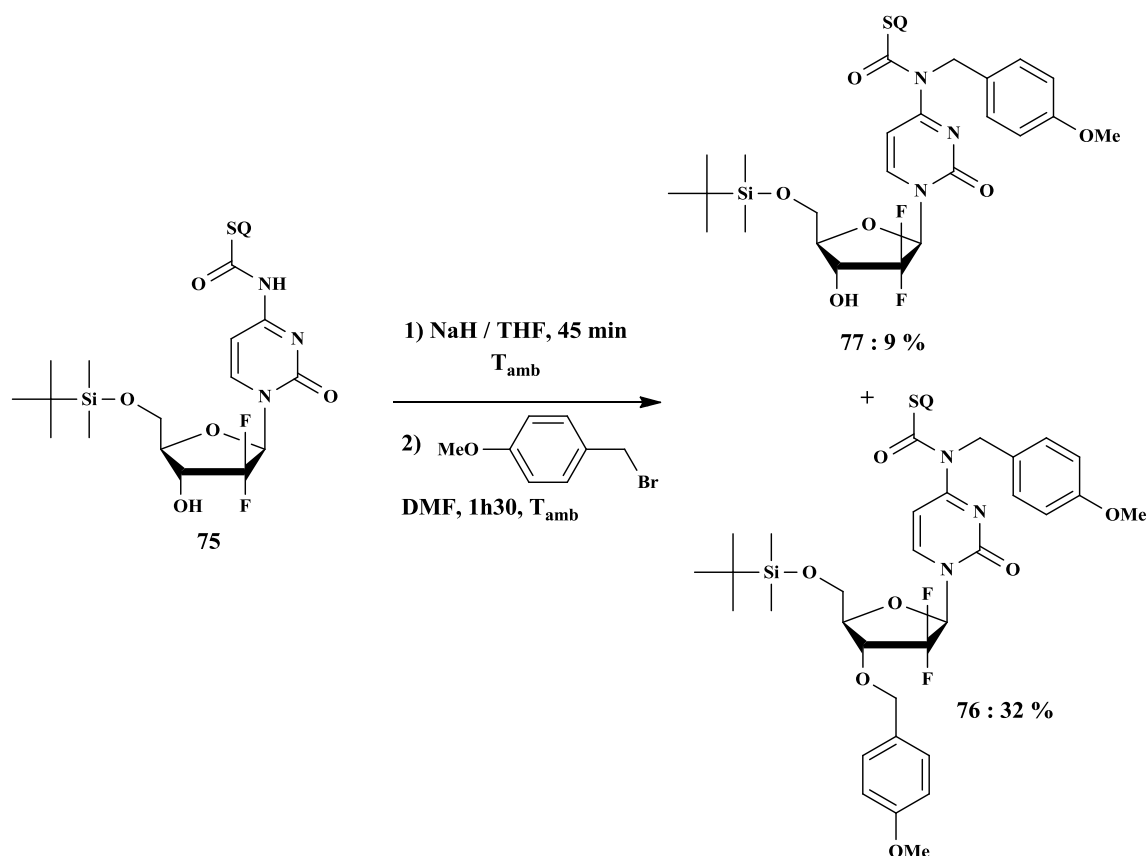


Schéma 29

Nous nous sommes alors tournés vers la protection de l'hydroxyle en 3' par un groupement acétal relativement labile en milieu acide, le groupe 1-éthoxyéthyle. Cette protection, effectuée par réaction de l'éther de vinyle et d'éthyle avec la Gemcitabine-squalène protégée **75** en présence de PPTS fournit avec un rendement quantitatif l'acétal **78** sous forme d'un mélange de 2 diastéréoisomères inséparables par chromatographie sur colonne. Le clivage du groupement TBDMS a ensuite été réalisé par le TBAF dans le THF pour fournir l'alcool primaire **79** avec un rendement de 86% (**Schéma 30**).



Schéma 31

Nous devons dans un premier temps effectuer la protection en 5' avec un groupement protecteur orthogonal autre que le *tert*-butyldiméthylsilyle. Notre choix s'est porté sur le

diméthoxytrityle. Celui-ci est une variante du groupement trityle qui a été largement utilisée dans la synthèse d'oligonucléotides, pour la protection sélective des groupements hydroxy en 5', et notamment des cytidines.¹³⁴ Le diméthoxytrityle est bien plus utilisé que le groupement trityle simple, en raison du temps de déprotection en milieu acide plus court que ce dernier. La déprotection d'un tel groupement s'effectue par l'acide acétique, comme l'a décrit Khorana,¹³⁵ mais l'acide trichloroacétique peut également être utilisé dans un mélange nitrométhane/méthanol quand il s'agit de déprotéger sélectivement ce groupement diméthoxytrityle, en 5' de la déoxyadénosine. L'utilisation d'autres conditions, comme l'APTS dans le méthanol ou ZnBr₂ dans le nitrométhane provoque très rapidement le clivage de la liaison osidique.¹³⁶

La protection de groupements hydroxyles d'analogues nucléosidiques en 5' par le diméthoxytrityle (DMTr) suivie d'une protection en 3' par le TBDMS est une stratégie déjà décrite dans la littérature.^{137,138} Toutefois elle nécessite une protection préalable de l'atome d'azote de la cytosine. En effet, le traitement de la déoxycytidine par le chlorure de diméthoxytrityle dans la pyridine, en présence de 4-DMAP, fournit un mélange de nucléoside protégé en position 5' et sur la cytosine.¹³⁹ Ikehara et coll. ont décrit en 1985 la diméthoxytritylation en 5' d'une cytidine préalablement protégée par un groupement benzoyle sur le noyau cytosine.¹⁴⁰ Le groupe de Hata a également décrit la synthèse d'une cytidine diméthoxytritylée en position 5', en utilisant un groupement protecteur tris-(benzoyloxy)trityle en position N-4.¹⁴¹

Le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle a été utilisé dans un premier temps avec une quantité catalytique de DMAP dans la pyridine.¹³⁴ Cette réaction, quoiqu'assez lente dans le cas présent, a permis d'obtenir le composé **81** avec un rendement de 90%. La protection en 3' a été effectuée par traitement avec le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence de DBU pour fournir le composé **82** complètement protégé avec un rendement global sur les deux étapes de 75 %. Nous avons ensuite étudié la déprotection du groupement DMTr en 5'. Le traitement de **79** dans les conditions ordinaires de détritylation (AcOH 80 %, 48 h, 20°C)¹⁴² a donné un mélange contenant le substrat de départ, l'alcool primaire attendu **83**, le produit désilylé **81**, ainsi que de la Gemcitabine-squalène (**14**) (Schéma 32). L'absence totale de sélectivité de cette réaction nous a incités à tester un acide plus fort, pendant un temps plus court. De fait, un traitement par l'acide formique dans un mélange DCM/MeOH à 0 °C pendant 45 minutes¹⁴³ a fourni l'intermédiaire clé **83** avec un rendement de 77 %.

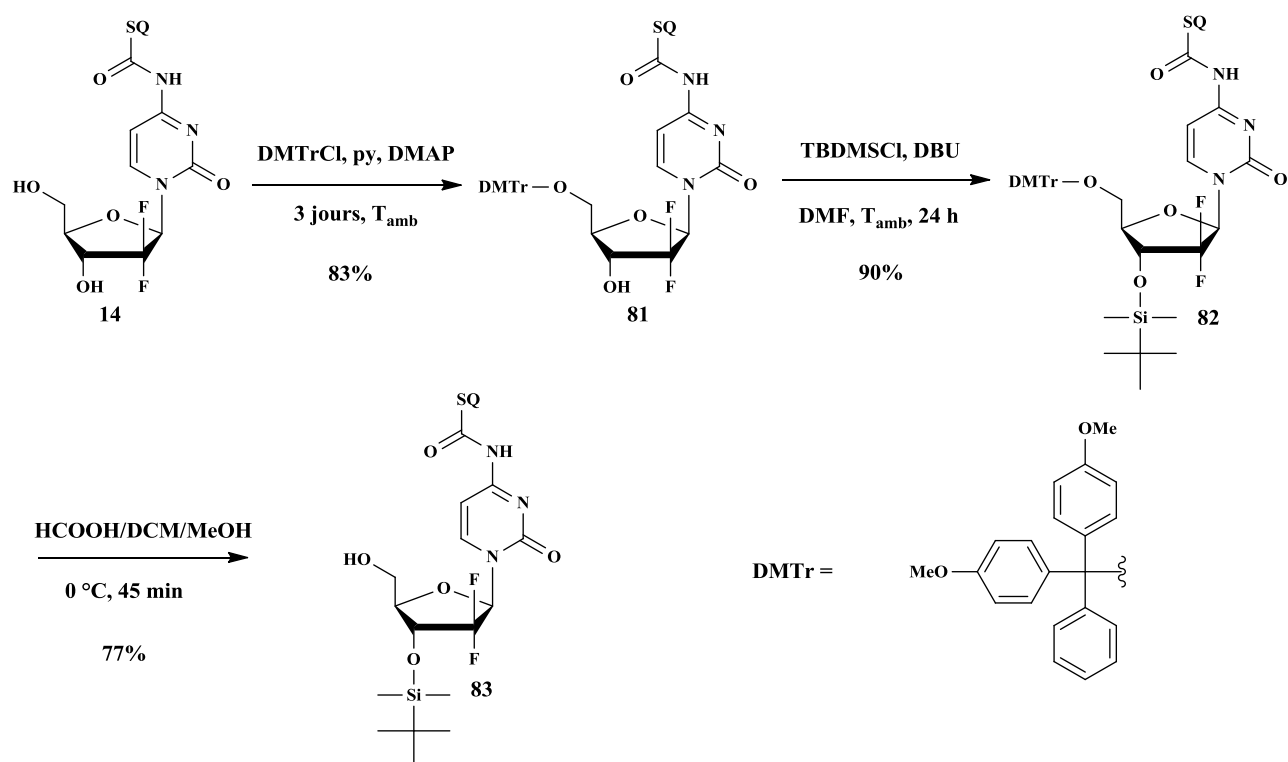


Schéma 32

La condensation de l'alcool **83** avec un excès de bis-(9-méthylfluorényl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite (**68**) et de tétrazole, suivi d'un traitement oxydatif à l'eau oxygénée a fourni le phosphotriester **84** avec un rendement de 80 %. A ce niveau de la synthèse, le groupement hydroxy en 3' a été désilylé par HF.pyridine¹⁴⁴ pour donner l'alcool **72** avec un rendement de 69 % (**Schéma 33**). Il faut noter que ces conditions n'affectent en rien la chaîne squalène pourtant assez sensible en milieu acide.

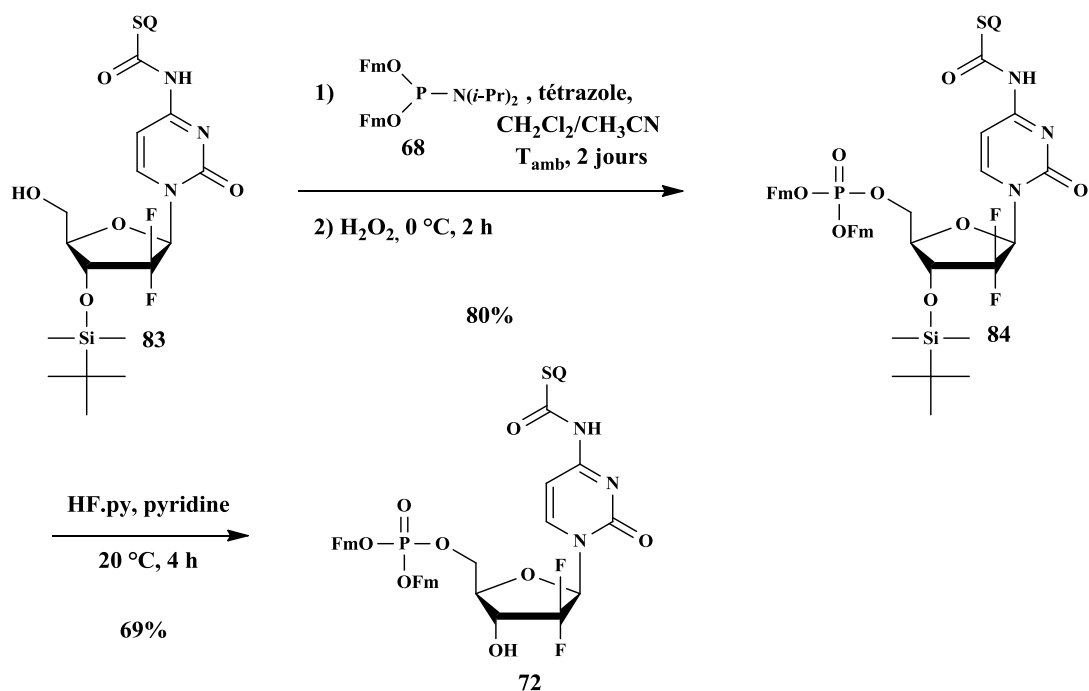


Schéma 33

La déprotection du phosphate **72** a également été réalisée comme dans le cas de la ddC-SQ par la triéthylamine suivie d'un lavage à l'éther pour éliminer le méthylènefluorène. Dans ces conditions, le sel de triéthylammonium **31a** a été obtenu avec un rendement de 98 % (Schéma 34).

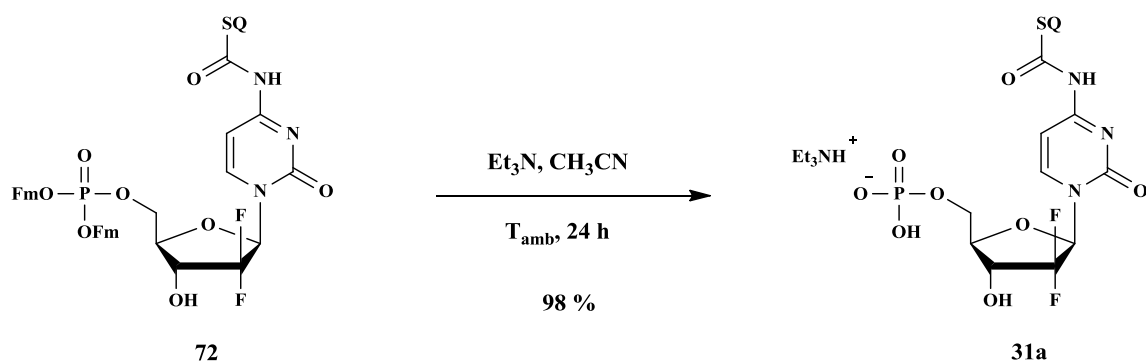


Schéma 34

Nous avons montré précédemment dans le cas de la ddC-SQ monophosphatée et de la Gemcitabine-squalène monophosphatée **72** que la triéthylamine était efficace pour effectuer la déprotection des groupements fluorényles. Cependant, cette amine est une substance relativement toxique, métabolisée en *N*-oxyde de triéthylamine et inhibant les monoamines oxydases. A ce jour,

aucun sel de triéthylammonium n'a été développé dans l'industrie pharmaceutique. Nous avons donc envisagé l'utilisation d'autres amines, permettant d'engendrer un sel biocompatible et permettant une déprotection sélective des groupements fluorényles. Nous avons donc décidé de tester plusieurs amines, secondaires ou tertiaires basicités différentes, connues pour leur innocuité (**Figure 42**).¹⁴⁵

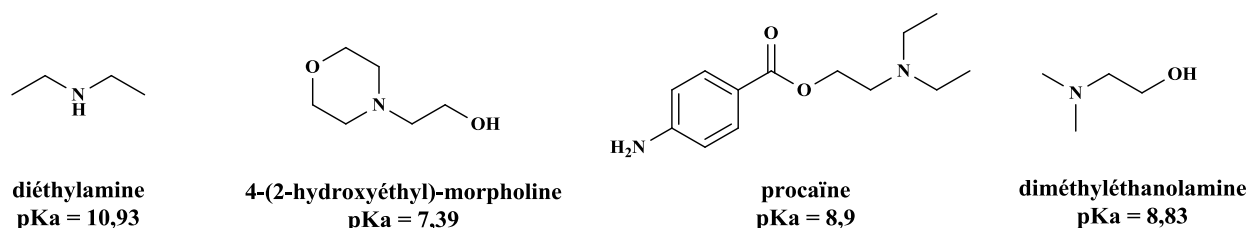


Figure 42

La diéthylamine est utilisé en clinique en tant que contre-ion dans différentes spécialités acides, comme le Diclofénac (Voltarène®), un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé pour le traitement symptomatique des rhumatismes inflammatoires, et le Phénobarbital (Gardénal®), un barbiturique antiépileptiques (**Figure 43**).

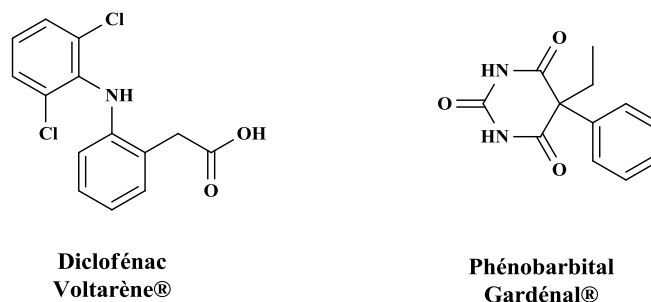


Figure 43

De plus cette amine a un pKa proche de celui de la triéthylamine [$\text{pKa}(\text{Et}_2\text{NH}) = 10,93$; $\text{pKa}(\text{Et}_3\text{N}) = 10,78$] et est donc assez basique pour déprotéger les groupements fluorényles. Malheureusement, dans les mêmes conditions qu'avec la triéthylamine, nous avons bien observé la déprotection des fluorényles, mais également une transamidification de la chaîne squalène. La

séparation des différents produits n'étant pas envisageable, nous avons abandonné l'utilisation de cette amine secondaire nucléophile.

La 4-(2-hydroxyéthyl)-morpholine est également utilisée dans l'industrie pharmaceutique notamment comme ester dans deux prodrogues, le Morniflumate (Nifluril®), un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé pour le traitement des rhumatismes inflammatoires chroniques, et le Mofetil mycophénolate (CellCept®), un immunodépresseur utilisé dans la prévention des rejets d'organe. L'hydrolyse de ces prodrogues permet donc de relarguer cette amine dans l'organisme sans toxicité apparente (**Figure 44**).

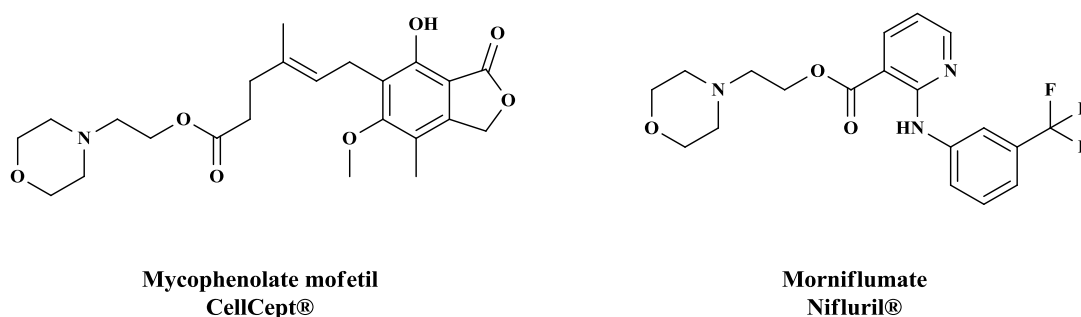


Figure 44

La déprotection avec cette amine tertiaire a été testée dans les mêmes conditions que précédemment. Malheureusement, nous n'avons observé aucune réaction, sans doute à cause de la trop faible basicité de l'amine ($pK_a = 7,39$) comparée à celle de la triéthylamine. De plus, compte tenu de sa température d'ébullition très élevée ($T_{eb} = 225,7\text{ °C}$), elle est extrêmement difficile à éliminer.

La procaine est un anesthésique local commercialisé sous le nom de Novocaïne® et possédant un pK_a intermédiaire de 8,9. L'action de cette amine tertiaire sur le bis-fluorényl phosphate a fourni un mélange de composés déprotégés mais également déacylés au niveau de la fonction amide de la cytosine, comme dans le cas de la diméthylamine. La procaine contient en effet une fonction aniline qui est légèrement nucléophile et transamidifie la chaîne squalène (**Figure 42**).

Enfin, la diméthyléthanolamine est utilisée comme la diéthylamine pour former un sel de Diclofénac. Cette amine possède un pK_a plus faible que celui de la triéthylamine (8,83 au lieu de 10,78) mais est assez basique pour déprotéger les groupements fluorényles (**Figure 42**).

De fait, le phosphate **72** a été traité par la diméthyléthanolamine dans l'acétonitrile pour former le sel **31b** avec un rendement de 85 % (Schéma 35).

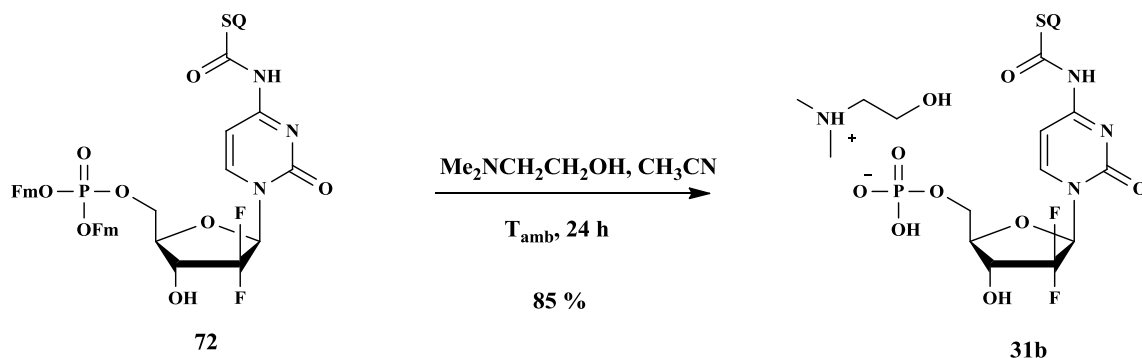


Schéma 35

Nous avons donc développé une synthèse en sept étapes à partir de la Gemcitabine, des deux sels de phosphates de Gemcitabine-squalène **31a** et **31b** avec des rendements respectifs de 16% et 13%. Cette voie de synthèse en 7 étapes à partir de la Gemcitabine relativement efficace comporte des étapes de protection et de déprotection des groupements hydroxyles en position 3' et 5', une étape de phosphorylation au moyen d'un phosphoramidite, ainsi qu'une étape de déprotection du groupement phosphate en utilisant deux amines non nucléophiles, la triéthylamine et la diméthyléthanolamine. Nous pouvons à présent étudier la formation des nanoparticules à partir de ces dérivés squalénisés.

II.1.3.4. Préparation et caractérisation des nanoparticules **31a** et **31b**

Les nanoparticules de triéthylammonium de Gemcitabine-squalène monophosphate **31a** ont été préparées par nanoprécipitation d'une solution éthanolique dans une solution isotonique à 5% de dextrose. Les nanoparticules se forment alors immédiatement et l'éthanol est évaporé sous pression réduite au rotavapor. La suspension laiteuse obtenue présente le reflet bleuté caractéristique des systèmes colloïdaux (effet Tyndall) et est conservée à 4 °C.¹⁴⁶ La taille ainsi que l'indice de polydispersité de ces nanoparticules ont été mesurés par diffusion quasi-élastique de la lumière au moyen d'un nanosizer Malvern. L'indice de polydispersité permet de déterminer si la taille des nanoparticules en solution est homogène. Aucun changement de taille significatif n'est observé après 3 jours de stockage à 4 °C. Cette stabilité peut être corrélée avec la valeur du potentiel zêta

très largement négative ($-43,1$ mV). Cette valeur, qui représente la charge globale en surface des nanoparticules doit en effet être relativement élevée de manière à ce que la répulsion électrostatique prévienne l'agrégation. Les 2 sels de Gemcitabine-squalène MP **31a** et **31b** ont ensuite été soumis aux conditions de nanoprécipitation à différentes concentrations dans l'eau. Cette étude montre que la taille de ces nanoparticules augmente lorsque la concentration finale dans l'eau s'accroît, tout en conservant une population de nanoparticules monodisperses avec des indices inférieurs à 0,3 (**Tableau 1**).

	Concentration (mg/mL)	Taille (nm)	PDI
31a	1	59 ± 2	0,27
31a	3	104 ± 2	0,14
31a	5	144	0,18
31b	2	56	0,29
31b	4	153 ± 15	0,06

Tableau 1. Taille et indice de polydispersité des nanoparticules des dérivés **31a** et **31b** en fonction de la concentration finale dans l'eau.¹⁴⁷

Des expériences de microscopie électronique en transmission (MET) ont été effectuées pour les nanoparticules de **31a** et **31b** respectivement à 3 et 4 mg/mL. Ces observations ont été effectuées avec un Microscope Jeol 2000EX au « Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay » (UMR 8080 CNRS). Une goutte (5 μ L) de la suspension de nanoparticules a été déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone. 5 minutes après le dépôt, l'excès d'eau est éliminé à l'aide d'un papier absorbant. Une goutte d'acide phosphotungstique 1% dans l'eau est déposée et laissée agir 30 secondes sur la grille. Les observations sont faites à un voltage de 200 kV sous un faible faisceau d'électrons. Les clichés obtenus montrent bien l'existence de nanosphères d'environ 100 et 150 nm de diamètre en accord avec les mesures de taille obtenues précédemment au nanosizer (**Figure 45**).

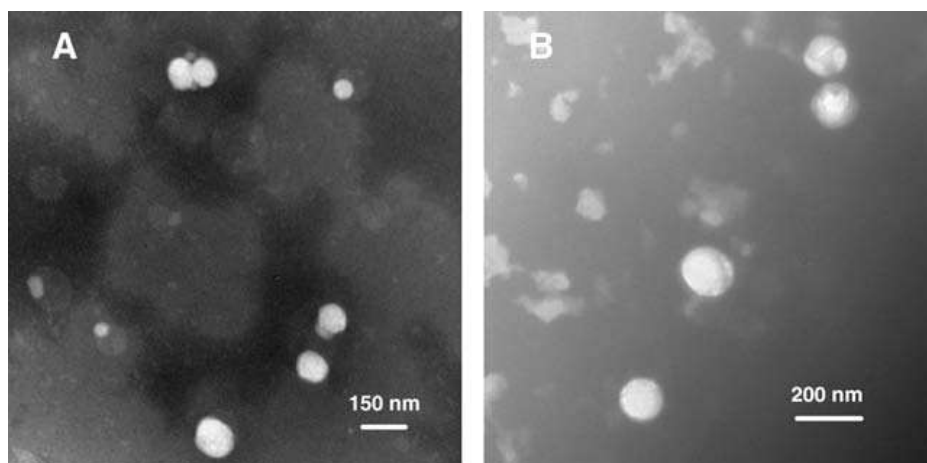


Figure 45. Images de MET des nanoparticules des dérivés **31a** (A) et **31b** (B) à des concentrations respectives de 3 mg/ml et 4 mg/ml.¹⁴⁷

Des expériences de Cryomicroscopie électronique en transmission (CryoMET) ont ensuite été effectuées dans le but d'observer plus précisément la structure des nanoparticules de triéthylammonium Gemcitabine-squalène MP (**31a**). Ces expériences ont été effectuées avec un Microscope Electronique Jeol 2100 au service de « Microscopie Electronique de l'Institut de Biologie Intégrative » (IFR 83 CNRS Paris). Comme précédemment une goutte (5 μ L) de la suspension de nanoparticules à 2 mg/mL est déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone. L'échantillon est vitrifié rapidement en le plongeant dans l'éthane liquide, puis transféré vers un conteneur à cryo-échantillons. Comme en MET, les observations sont faites à un voltage de 200 kV sous un faible faisceau d'électrons. De manière inattendue, compte-tenu des images de MET, les clichés obtenus ont révélé l'existence d'une population de liposomes unilamellaires avec un diamètre allant de 100 à 300 nm et dotés d'une membrane d'une épaisseur d'environ 70 Å (**Figure 46**).

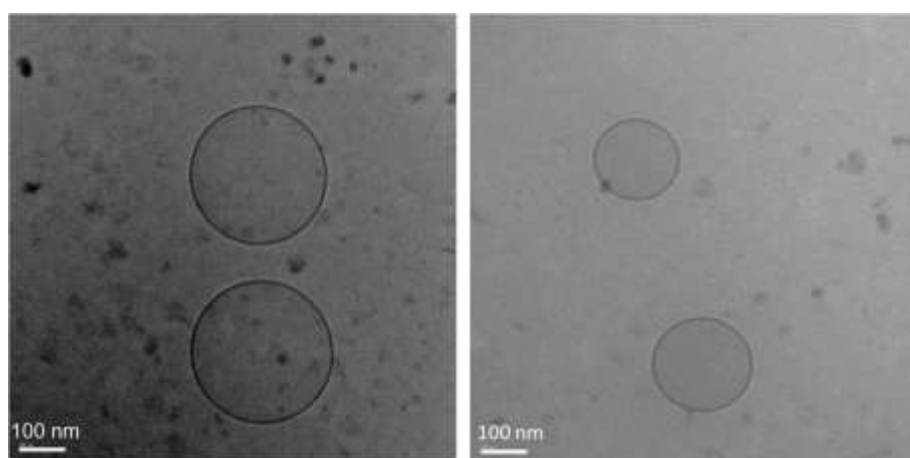


Figure 46. Images sélectionnées de CryoMET montrant des vésicules unilamellaires du composé **31a**.¹⁴⁸

Ces observations se corrèlent parfaitement avec des études de diffusion de rayons X aux petits angles effectuées par Claudie Bourgaux et Elise Lepeltier au synchrotron Elettra de Trieste en Italie qui ont permis de caractériser pleinement le mode d'organisation des molécules de Gemcitabine-squalène MP **31a**. Le profil de la courbe permet de confirmer l'épaisseur de la membrane d'environ 70 Å, ainsi que l'existence d'une structure planaire (**Figure 47**).

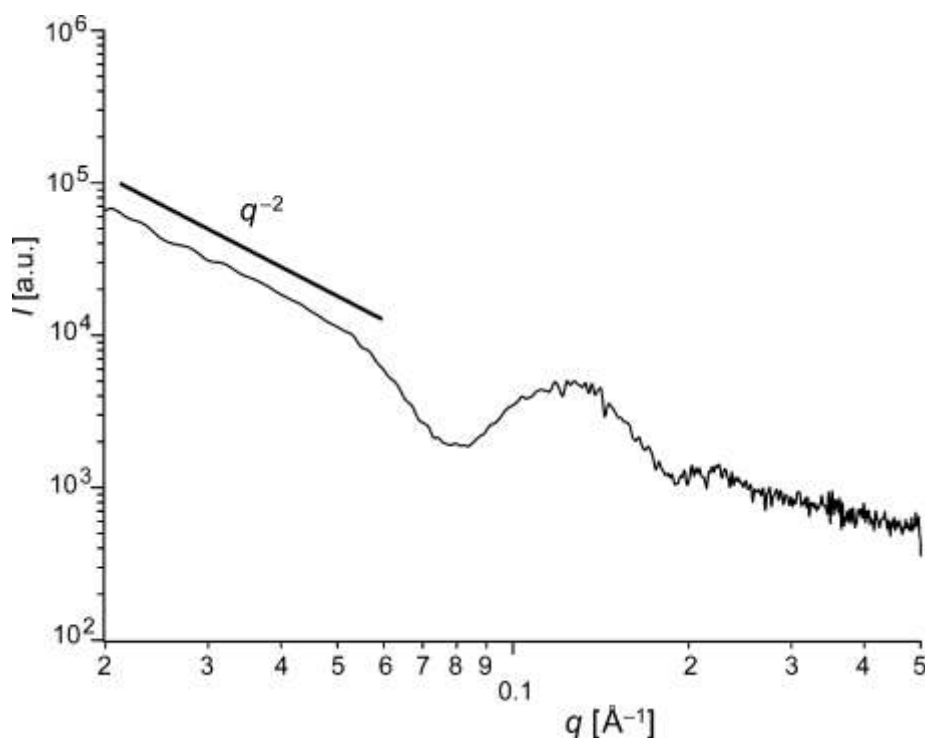


Figure 47. Profil de diffusion des rayons X aux petits angles des liposomes de Gemcitabine-squalène MP **31a** sur une échelle logarithmique.¹⁴⁸

La taille des vésicules observées en CryoMET correspond également à la distribution en taille des nanoparticules, mesurée par diffusion dynamique de la lumière, avec des nanoparticules allant de 70 à 300 nm de diamètre (**Figure 48**).

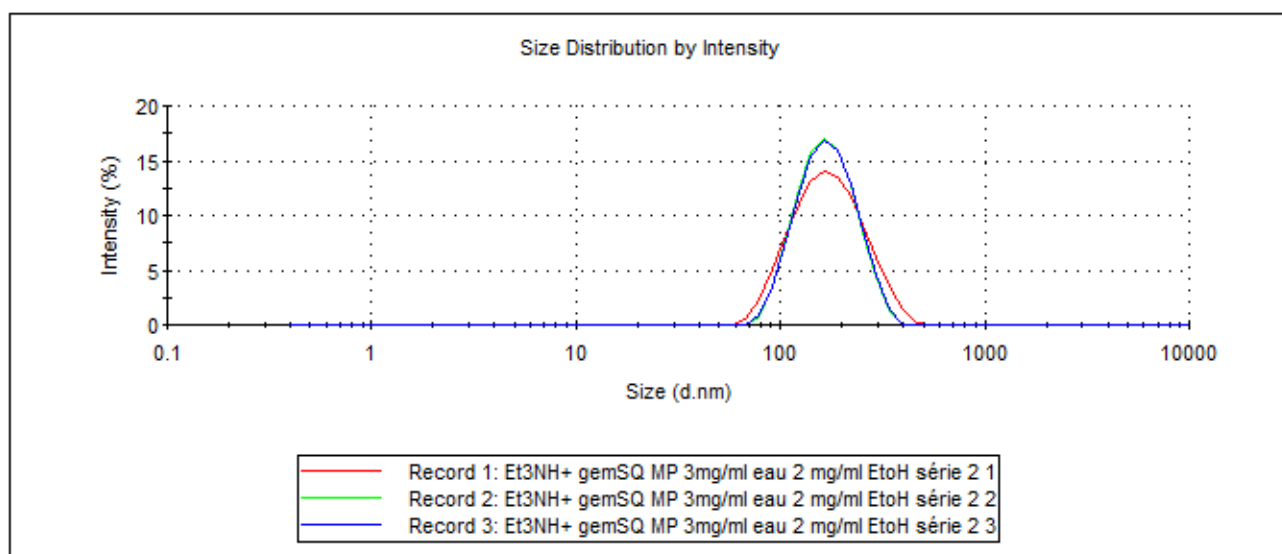


Figure 48. Distribution de la taille des nanoparticules de Gemcitabine-squalène MP **31a**

Les études de CryoMET et de SAXS vont donc dans le même sens et semblent indiquer que les molécules de triéthylammonium de Gemcitabine-squalène MP (**31a**) s'auto-organisent en vésicules liposomiales, contrairement à la Gemcitabine-squalène (**14**) qui s'organise selon une structure hexagonale inverse, formée par l'empilement de cylindres dans lesquels le cœur aqueux abrite les têtes hydrophiles de Gemcitabine, les bords étant constitués des chaînes squalène hydrophobes. Cette différence de structure supramoléculaire entre ces composés, somme toute très proches, peut s'expliquer par de simples considérations géométriques d'empilement. En effet la forme moléculaire de la Gemcitabine-squalène peut être considérée comme un cône tronqué, avec une petite tête polaire et une volumineuse queue hydrophobe. L'addition d'un groupement phosphaté en position 5' rendrait la tête polaire plus volumineuse et probablement plus hydratée. Cela conduit à une forme plus cylindrique des molécules de Gemcitabine-squalène MP, stabilisant ainsi les bicouches. La répulsion électrostatique entre ces bicouches favorise alors l'existence dans l'eau de liposomes unilamellaires (**Schéma 36**).

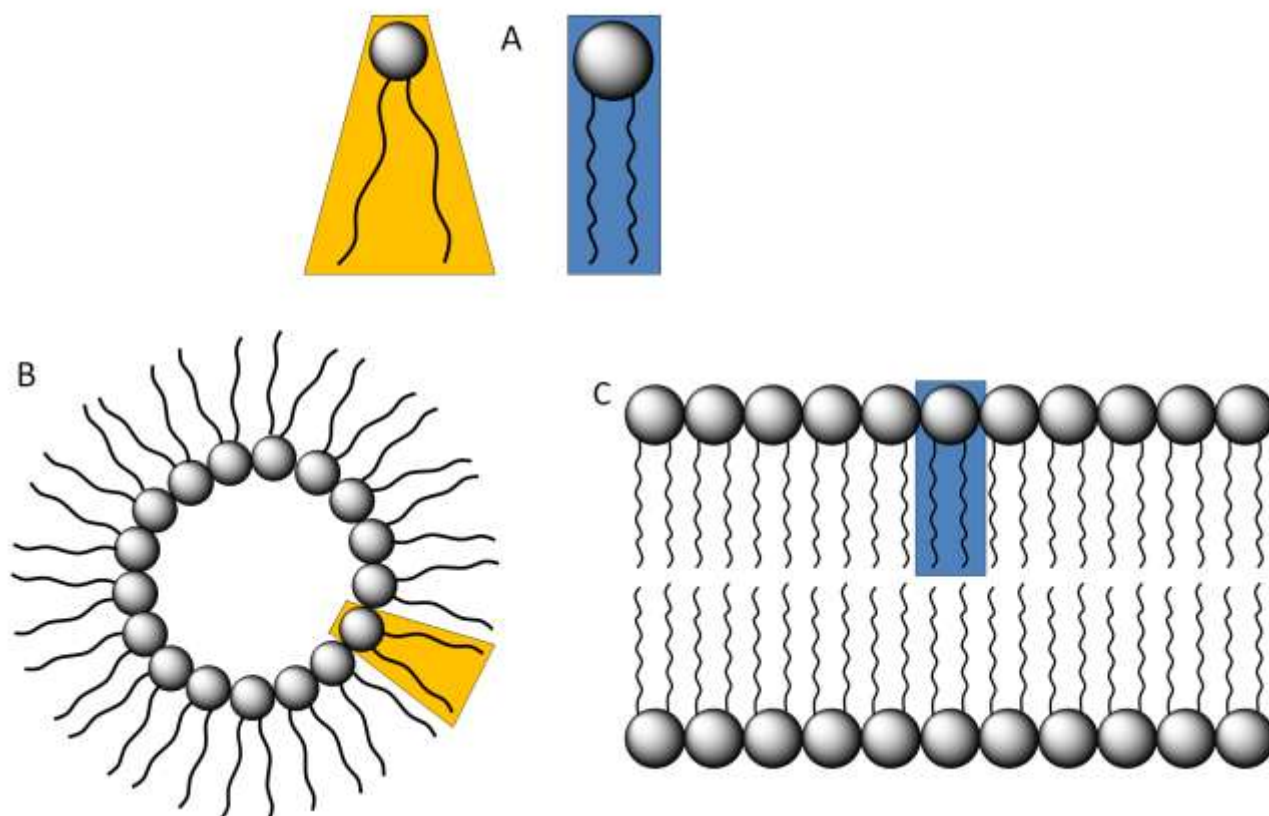


Schéma 36. Exemple de modes d'association de molécules amphiphiles A) Formes moléculaires coniques (orange, cas de la Gemcitabine-squalène) ou cylindrique (bleu, cas du Gemcitabine-squalène MP **31a**) en fonction de la taille de la tête polaire hydrophile et de la queue hydrophobe des molécules. B) Association des molécules « coniques » en micelles inverses. C) Association des molécules « cylindriques » en bicouche lamellaire.

II.1.3.5. *Evaluation de l'activité anticancéreuse in vitro*

Les activités anticancéreuses des nanoparticules de sels de trialkylammonium de Gemcitabine-squalène MP **31a** et **31b** ont été testées dans un premier temps sur la lignée cellulaire L1210 wt, une lignée de leucémie murine sensible à la Gemcitabine. Ces nanoparticules ont été testées en comparaison avec la Gemcitabine et les nanoparticules de Gemcitabine-squalène. Sur cette lignée, la Gemcitabine se montre très active avec une concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) de 3,2 nM. La Gemcitabine-squalène, sous forme de nanoparticules, montre une CI₅₀ supérieure (29 nM) et donc une activité anticancéreuse moindre. Ce résultat est conforme à ce qu'il est attendu d'une prodrogue. En effet, pour être active, celle-ci doit être métabolisée par l'appareil enzymatique de la cellule. Selon le type cellulaire, ces enzymes peuvent être plus ou moins exprimées, plus ou

moins actives. L'activité observée est donc généralement plus faible que dans le cas de la molécule parent. En revanche, les nanoparticules des dérivés monophosphorylés (**31a** et **31b**) affichent une CI_{50} inférieure à celle de la Gemcitabine-squalène, avec des valeurs respectives de 6,1 et 6,7 nM. On peut également noter que ces CI_{50} sont à peine supérieures à celle de la Gemcitabine, ce qui signifie que les dérivés monophosphorylés sont quasiment aussi actifs que la Gemcitabine sur cette lignée cellulaire, malgré leur nature de prodrogue (**Tableau 2**).

L'activité anticancéreuse du triéthylammonium de Gemcitabine-squalène MP (**31a**) a également été évaluée sur la lignée L1210 10K, une lignée cellulaire de leucémie murine, déficiente en dCK et donc résistante à la Gemcitabine (d'un facteur 6000).¹⁴⁹ En effet la sous-expression d'enzymes permettant la monophosphorylation intracellulaire induit une faible activation de la Gemcitabine. Comme attendu, la Gemcitabine possède une activité bien moindre sur ces cellules (CI_{50} de 19,4 μ M). En revanche, les nanoparticules de Gemcitabine-squalène possèdent de manière étonnante une meilleure activité que la Gemcitabine libre avec une CI_{50} de 9,8 μ M. Cela peut s'expliquer par le fait que les molécules de Gemcitabine-squalène pénètrent dans les cellules par un phénomène de diffusion passive à travers les membranes. Ainsi, ces membranes jouent le rôle de réservoir et libèrent les molécules de Gemcitabine-squalène progressivement dans le cytoplasme, à un taux inférieur au seuil de saturation des déoxycytidine kinases, sous-exprimées dans cette lignée cellulaire. Cette libération prolongée permet donc d'échapper en partie au phénomène de résistance au niveau de la première étape de phosphorylation.⁷⁵ Enfin, les nanoparticules du dérivé monophosphorylé **31a**, avec une CI_{50} de 3,7 μ M, présentent une activité supérieure à celle des nanoparticules de Gemcitabine-squalène (**14**).

Afin d'écarter la possibilité d'interférence du cation triéthylammonium sur l'activité anticancéreuse, la cytotoxicité d'une solution aqueuse de phosphate de triéthylammonium a été évaluée sur cette lignée cellulaire et n'a révélé aucune activité. Nous pouvons donc attribuer cette amélioration de l'activité au phosphate **31a** lui-même. Si **31a** est 6 fois plus actif que la Gemcitabine libre sur cette lignée, nous ne pouvons toutefois pas en conclure qu'il s'agisse d'une réversion de la résistance. En effet, il reste encore un facteur 1000 pour revenir à la CI_{50} de la Gemcitabine sur la lignée L1210 wt (3,2 nM) (**Tableau 2**). Il est fort possible que l'amélioration de l'activité anticancéreuse de ces liposomes soit due au contournement de l'étape limitante de monophosphorylation dans les cellules, comme nous l'avions espéré. Il faut toutefois rester prudent puisque les nucléosides monophosphatés sont facilement déphosphorylés *in vivo*. Nous ne savons pas si le Gemcitabine-squalène MP **31a** est substrat des phosphatases cellulaires. Si c'est le cas, après pénétration dans la cellule, la Gemcitabine-squalène MP pourrait être facilement transformée

en Gemcitabine-squalène. Cette dernière, une fois dans le cytoplasme, pourrait être déacylée et rephosphorylée en GemcitabineTP. De faibles différences cinétiques entre toutes ces étapes pourraient expliquer le modeste gain d'activité observé.

	CI ₅₀ sur la lignée cellulaire L1210 wt (nM)	CI ₅₀ sur la lignée cellulaire L1210 10K (μM)
Gemcitabine (1)	3,2	19,4
Gemcitabine-squalène (14)	38	9,8
Gemcitabine-squalène MP 31a	6,1	3,7
Gemcitabine-squalène MP 31b	6,7	Non testé

Tableau 2. Activité anticancéreuse *in vitro* de la Gemcitabine et des nanoparticules de **31a**, **31b** et de Gemcitabine-squalène sur les lignées cellulaires L1210 wt et L1210 10K.

II.1.4. Conclusion et Perspectives

Deux nouveaux dérivés lipidiques du monophosphate de Gemcitabine avec un groupement phosphate libre ont été synthétisés, avec un rendement global sur 6 étapes à partir de la Gemcitabine-squalène de 31 % et de 27 %. Cette synthèse a nécessité la protection sélective de l'hydroxyle en 3' et a été menée à bien en utilisant la chimie des phosphoramidites, étudiée dans un premier temps sur un modèle simplifié : la ddC-SQ, avant d'être appliquée à la Gemcitabine-squalène.

Les deux dérivés **31a** et **31b** ont ensuite été soumis aux conditions de nanoprécipitations et forment des nano-objets dans l'eau d'une taille moyenne de 50 à 150 nm de diamètre. La structure supramoléculaire d'un des 2 dérivés a été étudiée plus en détail grâce à des expériences de CryoTEM et de SAXS. Nous avons pu mettre en évidence qu'il s'agissait de vésicules liposomales unilamellaires d'une taille allant de 100 à 300 nm de diamètre dont la membrane avait une épaisseur d'environ 70 Å.

L'activité anticancéreuse de ces nouveaux composés a été évaluée sur des lignées de leucémie murine sensibles et résistantes à la Gemcitabine. Le sel de triéthylammonium du Gemcitabine-squalène MP (**31a**) possède une meilleure activité que la Gemcitabine sur la lignée résistante déficiente en dCK, ce qui peut faire penser que l'on contourne partiellement l'étape de monophosphorylation dans les cellules. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives quant à la découverte de nouveaux nanomédicaments non seulement dans le domaine des analogues nucléosidiques antitumoraux mais aussi pour les nucléosides antiviraux.

Il reste maintenant à évaluer l'activité anticancéreuse du monophosphate de Gemcitabine-squalène sur un modèle *in vivo*, pour confirmer le gain d'activité par rapport à la Gemcitabine-squalène. Enfin des études concernant la déphosphorylation des composés **31a** et **31b** en milieu biologique sont envisagées, afin de déterminer si la formulation sous forme de vésicules permet de protéger les phosphates de Gemcitabine-squalène contre les phosphatases extracellulaires.

II.2. Une approche originale pour vectoriser le Paclitaxel

II.2.1. Introduction

II.2.1.1. Le Paclitaxel

Le Paclitaxel (**85**) est un diterpénoïde naturel isolé en 1969 de l'écorce de l'If du Pacifique, *Taxus Brevifolia*, par Wall et coll.¹⁵⁰ Sa structure exacte a été élucidée en 1971 et montre, outre un système tricyclique sans précédent, une double liaison en tête de pont et un oxétane (**Figure 49**). L'activité anticancéreuse de ce taxoïde a été détectée en 1967, lors d'un programme lancé par le National Cancer Institute (NCI) qui a évalué l'activité biologique antitumorale de nombreux extraits de plantes et notamment un extrait brut d'écorces de *Taxus Brevifolia*, avec des résultats très prometteurs.

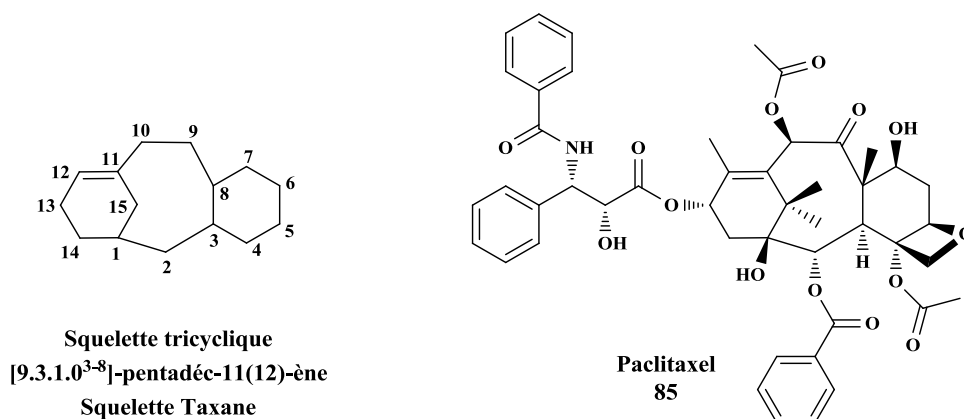
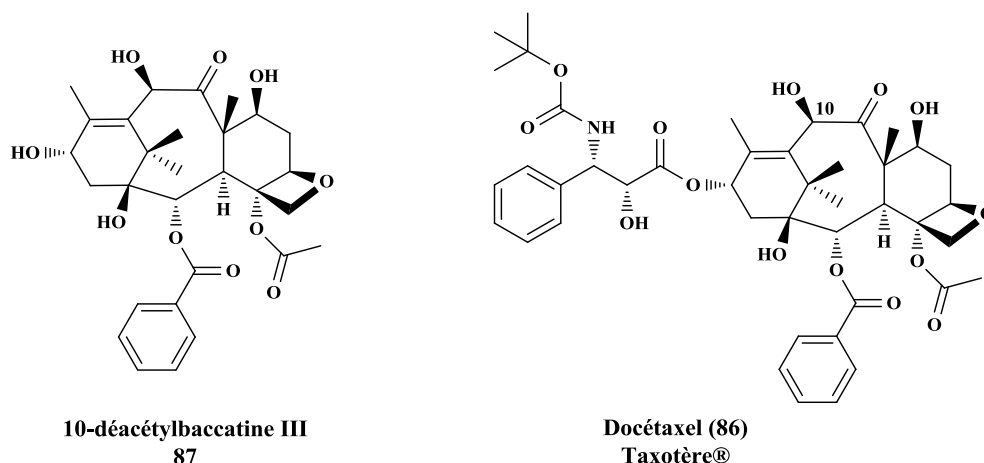


Figure 49. Structure générale du squelette taxane et du Paclitaxel

L'intérêt thérapeutique du Paclitaxel n'a pas été reconnu avant la fin des années 70, en partie à cause de sa faible solubilité dans l'eau. Il est également très difficile d'en isoler en grande quantité à partir de l'écorce des Ifs du Pacifique.^{151,152} C'est en 1979 que Susan Horwitz découvre que le Paclitaxel a un mécanisme d'action unique¹⁵³ et que le NCI décide d'en effectuer une évaluation plus complète.

Contrairement aux autres agents anticancéreux interagissant avec la tubuline, comme les Vinca-alcaloïdes, le Paclitaxel favorise la polymérisation de la tubuline en microtubules.¹⁵³⁻¹⁵⁸ Il stabilise très fortement ces microtubules qui deviennent alors dysfonctionnels, provoquant inévitablement la mort cellulaire.¹⁵⁹ Le Paclitaxel a une activité antinéoplasique, principalement contre le carcinome de l’ovaire, les cancers du sein, des muqueuses, du poumon ainsi que le sarcome de Kaposi lié au SIDA.¹⁵⁹⁻¹⁶² De nombreuses études ont permis l’approbation de ce médicament dans de nombreux pays pour le traitement de ces différents cancers.

Le Docétaxel (**86**) un autre taxoïde utilisé en thérapeutique et commercialisé sous le nom de Taxotère[®], a été synthétisé quelques années plus tard par l’Equipe du Professeur Pierre Potier à l’Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN). C’est en cherchant à obtenir le Paclitaxel à partir d’Ifs européens, présents sur le campus de Gif-sur-Yvette, que les chercheurs de l’ICSN ont isolé plusieurs taxoïdes, dont la 10-déacétylbaccatine III (10-DAB III, **87**) en grande quantité par rapport au Paclitaxel.¹⁶³ C’est en cherchant à synthétiser le Paclitaxel à partir de la 10-DAB III, qu’ils évaluèrent sur la plan biologique un intermédiaire de synthèse comportant un groupement Boc à la place du groupement benzoyle du Paclitaxel, ainsi qu’un groupement hydroxyle libre en position 10 (**Figure 50**).



dans le traitement du cancer du sein, du cancer bronchique à grandes cellules, du cancer de la prostate hormonorésistant et du cancer des voies aérodigestives supérieures.

Dans la suite de l'exposé, nous nous intéresserons uniquement au cas du Paclitaxel.

II.2.1.2. Limitations du Taxol®

L'extraction du Paclitaxel pour le traitement d'un seul patient (2 grammes de Paclitaxel) à partir de l'écorce d'if nécessite la coupe de 4 arbres. Un tel procédé n'est donc évidemment pas envisageable d'un point de vue économique et environnemental.¹⁶⁷ Bien que quelques synthèses totales aient été développées dans les années 90, le nombre d'étapes, ainsi que les très faibles rendements finaux, rendent peu rentable la synthèse industrielle d'un tel composé. Par exemple, le groupe de Nicolaou a effectué la synthèse totale du Paclitaxel en 51 étapes avec un rendement inférieur à 0,1 %.¹⁶⁸ D'autres synthèses totales ont été effectuées par les groupes de Holton, Danishefsky, et Mukaiyama, avec des rendements inférieurs à 0,3 %.

La solution adoptée par les industriels consiste à effectuer l'hémisynthèse du Paclitaxel par couplage d'une chaîne latérale préparée par synthèse totale avec la 10-DAB III, présente en grande quantité dans les feuilles d'If (jusqu'à 1 g/kg dans les épines de *Taxus Baccata*). En comparaison, 100 mg seulement de Paclitaxel peuvent être extraits à partir de 1 kg d'écorces de *Taxus Baccata*.¹⁵¹

Outre ces difficultés synthétiques, le Paclitaxel (Taxol®) souffre de limitations qui compliquent son utilisation en clinique. C'est un composé hydrophobe très peu soluble dans l'eau (0,25 mg/L). Il est en revanche soluble dans différents solvants organiques comme les alcools, le DMSO ou l'acétonitrile.¹⁶⁹ La forme commerciale utilisée en clinique est une solution stérile injectable dans un mélange de Crémophor® EL et d'éthanol,¹⁶⁰ qui doit être diluée 5 à 20 fois dans une solution de dextrose ou une solution saline à 5% pour une administration par perfusion chez le patient.

Le Crémophor® EL est un surfactant non-ionique obtenu par traitement de l'huile de ricin avec de l'oxyde d'éthylène. Si ce composé stabilise la dispersion du Paclitaxel dans l'eau, il n'est pas totalement inoffensif.¹⁷⁰ Il a en effet été démontré que le Crémophor® EL provoquait des

réactions d'hypersensibilité sévères imposant l'arrêt du traitement, comme de la dyspnée, de l'asthme, des détresses respiratoires, de l'hypotension, de l'urticaire ou encore des états de choc.^{9,11,171,172} Il est donc indispensable d'effectuer un prétraitement à base de corticostéroïdes, de Diphényldramine et de Cimétidine. A ces effets indésirables s'ajoutent ceux provoqués par le Paclitaxel lui-même comme la neutropénie, une neurotoxicité, une cardiotoxicité ainsi que de l'alopécie.

Le Paclitaxel souffre également de l'émergence de résistances dont la principale est due à la Glycoprotéine P (GPP). Cette protéine est localisée dans les cellules épithéliales de la membrane plasmique, ainsi que les cellules intestinales, les hépatocytes et les cellules du tubule des reins.^{173,174} Son rôle est de protéger les cellules et l'organisme contre les xénobiotiques, en agissant comme une pompe capable d'expulser les molécules étrangères hors des cellules. Ce mécanisme protecteur se retourne contre l'organisme lorsqu'il s'applique aux médicaments provoquant des phénomènes de multi-résistance. Une des stratégies de contournement de cette résistance est donc d'administrer en association au Paclitaxel des inhibiteurs de la GPP qui bloquent la pompe d'efflux, améliorant ainsi la biodisponibilité du Paclitaxel.

L'introduction du Paclitaxel en clinique constitue une avancée thérapeutique majeure ayant permis d'augmenter la survie des patients. Toutefois ses effets secondaires et l'émergence de résistances ont conduit de nombreux chercheurs à étudier de nouvelles formes, soit qu'il s'agisse de vecteurs nanoparticulaires ou de prodrogues.

II.2.1.3. Formes nanoparticulaires du Paclitaxel

Les développements de nouvelles formes galéniques nanoparticulaires ont été très largement rapportés dans la littérature depuis les années 90. L'incorporation du Paclitaxel dans des nanoparticules ou des liposomes permet de cibler préférentiellement les tumeurs par ciblage passif (effet EPR, Enhanced Permeability and Retention), d'améliorer la pénétration cellulaire à travers les membranes et de ralentir la métabolisation précoce par les Cytochromes. De plus, le développement de ces nouvelles formulations permet de diminuer le volume de distribution, réduisant ainsi la

Le meilleur exemple de ces nouvelles formulations plus efficaces et moins toxiques du Paclitaxel est celui de l'Abraxane® (cf partie **I.C. Les nanomédicaments**). Cette formulation nanoparticulaire du Paclitaxel lié à l'albumine humaine a montré une toxicité réduite par rapport au Taxol® dans des essais précliniques et cliniques de phase I^{14,15} et a permis en phase II et III d'administrer des doses supérieures en Paclitaxel, améliorant ainsi l'efficacité thérapeutique.¹⁷ L'Abraxane® est désormais indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique aux Etats-Unis et en Europe.

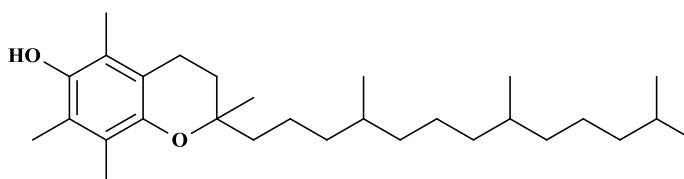


Figure 51. Représentation schématique d’une émulsion à base de Tocophérol. Le cœur de la particule consiste en une huile de tocophérol qui solubilise le principe actif tocophile (en orange). La nanoparticule est stabilisée par des surfactants dont les queues apolaires (en bleu) sont dans la phase tocophérol et les têtes polaires sont exposées à la phase externe aqueuse.¹⁷⁵

Chez la Souris porteuse d'une tumeur murine B16, le Tocosol Paclitaxel est bien plus efficace que le Taxol à doses équimolaires ou jusqu'à trois fois supérieures, tout en étant mieux toléré. Il en est de même sur des tumeurs humaines HCT-15 particulièrement résistantes au Paclitaxel.¹⁷⁷ Des études de biodistribution ont montré que la cause principale de cette amélioration est un accroissement de la concentration en Paclitaxel dans les tissus tumoraux. De plus l'aire sous courbe est environ 2 fois plus élevée pour le Tocosol Paclitaxel que pour le Taxol, ce qui se corrèle parfaitement avec l'efficacité de cette nano-émulsion. Les études pharmacocinétiques de phase I qui ont été effectuées ont donné des résultats similaires à l'étude pharmacocinétique réalisée chez la Souris, avec une aire sous courbe améliorée.

Après ces résultats précliniques et cliniques prometteurs, les tests cliniques de phase II et III se sont avérés décevants. Le Tocosol-Paclitaxel a présenté un taux de réponse inférieur à celui du Taxol chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique en test clinique de Phase III. En dépit de ce résultat, cette formulation en nano-émulsion a démontré une efficacité certaine dans les tests cliniques de phase I et II, liée à une amélioration du profil pharmacocinétique et de la biodistribution, notamment grâce à l'effet EPR.

D'autres formes liposomales du Paclitaxel ont également été étudiées. L'une d'entre elles, développée dans les années 1990, est particulièrement prometteuse.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Il s'agit de Paclitaxel encapsulé dans des liposomes de phosphatidylcholine/phosphatidylglycérol (9:1) à un taux paclitaxel/liposomes de 3 mol %. La taille des particules est d'environ 110 nm, avec un taux d'association du Paclitaxel avec les liposomes de plus de 90 %. Les liposomes chargés en Paclitaxel présentent une activité anticancéreuse *in vitro*, sur plusieurs lignées humaines ou murines, du même ordre de grandeur que le Paclitaxel libre.¹⁸⁰ Les études précliniques chez la Souris ont permis de déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT) chez la souris, qui est de 200 mg/kg pour la formulation liposomale et seulement de 30 mg/kg pour la formulation dans le Crémophore. Cette formulation liposomale permet donc d'administrer une quantité plus importante de Paclitaxel, avec une meilleure tolérance. L'activité antitumorale a été évaluée *in vivo* chez la Souris porteuse d'une tumeur murine résistante du colon. Le Taxol à 30 mg/kg est dénué d'activité sur ce type de tumeur. En revanche, la formulation liposomale s'est montrée efficace et mieux tolérée que le Taxol, à des doses équimolaires ou plus élevées que la DMT du Taxol.¹⁷⁸

Des études précliniques chez le Rat, sur un modèle de tumeur cérébrale, ont été menées afin d'évaluer les profils pharmacodynamiques des deux formulations. Même si certains effets

secondaires, notamment la neutropénie sont similaires pour les deux formulations à des doses équitoxiques, la formulation liposomale est bien mieux tolérée. En effet, lorsque 2 doses de 40 mg/kg sont administrées aux rats, seuls ceux traités pas le Taxol meurent. De plus, la formulation liposomale demeure plus efficace que le Taxol avec une augmentation de la durée de vie. Ce gain d'activité thérapeutique peut s'expliquer comme dans le cas du Tocosol Paclitaxel, par une moindre toxicité, due à un meilleur ciblage des tissus tumoraux, permettant une administration à des doses plus élevées. Enfin, les liposomes relarguent progressivement les molécules de Paclitaxel, ce qui permet un effet prolongé.¹⁸¹

II.2.1.4. Nouvelles prodrogues du Paxclitaxel

Les prodrogues sont en général utilisées pour palier certaines limitations dues aux propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du médicament, comme une faible solubilité en milieu physiologique, un mauvais passage membranaire, une faible absorption orale et une grande toxicité due à un mauvais ciblage. De nombreuses prodrogues du Paclitaxel ont été synthétisées, en couplant différents groupements en position 7 ou en position 2' sur la chaîne latérale, soit hydrophiles, soit permettant de cibler les cellules cancéreuses (**Figure 52**). En effet, pour que le Paclitaxel exerce son activité, il doit interagir avec les hétérodimères de la tubuline. La chaîne latérale et en particulier son hydroxyle en position 2' jouent un rôle crucial dans la formation de ce complexe. En revanche, l'hydroxyle en position 7 n'intervient pas (**Schéma 37**).^{182,183}

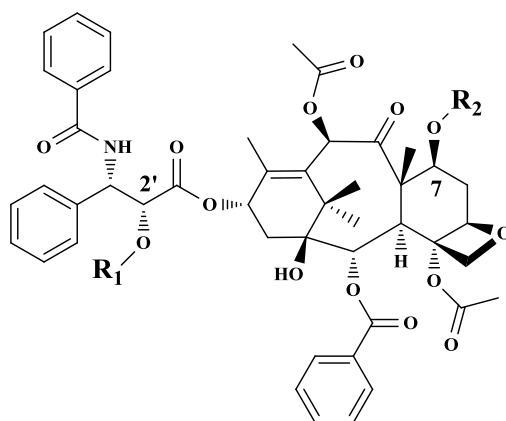


Figure 52. Structure simplifiée des prodrogues du Paclitaxel

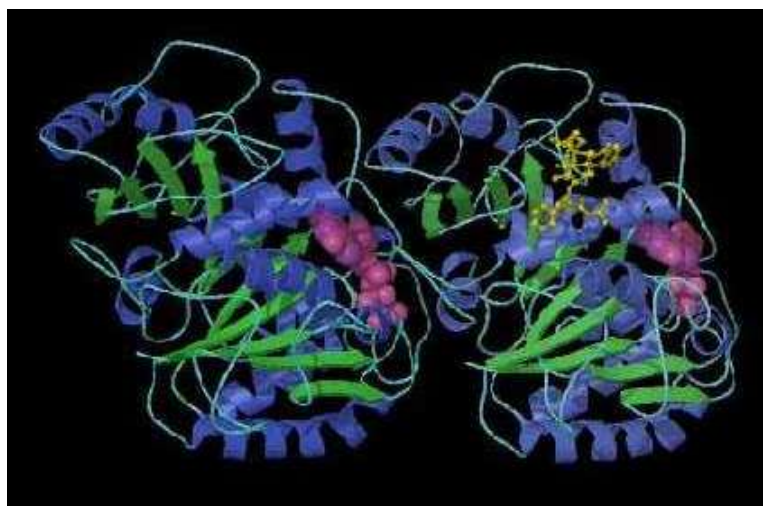


Schéma 37. Représentation schématique en 3 dimensions de la structure de l'hétérodimère de la tubuline constitué de deux monomères structurellement identiques. Chaque monomère est constitué par un cœur en feuillets β (en vert) entouré d'hélices α (en bleu). Chacun des monomères est lié à un nucléotide de guanidine (en rose) et possède un autre site d'interaction où se situe le Paclitaxel (en jaune).

D'un point de vue chimique, les esters en position 2' sont plus labiles et peuvent être synthétisés sélectivement sans protection de l'hydroxyle néopentylique en position 7. Les esters du Paclitaxel en position 7 sont quant à eux tellement stables en milieu physiologique qu'ils ne relarguent bien souvent pas la molécule active.

Prodrogues hydrosolubles du Paclitaxel

Le couplage du Paclitaxel avec des acides succiniques, glutariques, sulfoniques et des acides aminés en position 2' ou en position 7 s'est avéré infructueux.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ En effet, même si la solubilité en milieux aqueux est améliorée, les dérivés esterifiés en position 2' se sont montrés moins actifs que le Paclitaxel *in vitro* et *in vivo*, tandis que ceux esterifiés en position 7 sont inactifs car ils ne libèrent pas le Paclitaxel.

Un ester de 3-diéthylaminopropionate (**88**) a été synthétisé par Stella et coll.¹⁸⁶ et a montré une activité similaire à celle du Paclitaxel sur un modèle de carcinome mammaire chez la Souris. Cette prodrogue présente surtout l'avantage d'être beaucoup plus soluble dans l'eau que le Paclitaxel (> 10 mg/mL au lieu de 0,00025 mg/mL). Nicolaou a également développé un nouveau dérivé **89** hydrosoluble (1,2 mg/mL) qui devrait libérer le Paclitaxel en milieu basique, en prenant

en considération le micro-environnement basique supposé à cette époque autour des cellules cancéreuses.¹⁸⁷ Toutefois il a été démontré plus tard que ce pH serait plutôt légèrement acide.¹⁸⁸ De plus, cette nouvelle prodrogue s'est avérée trop stable et rapidement éliminée par les reins (**Figure 53**).

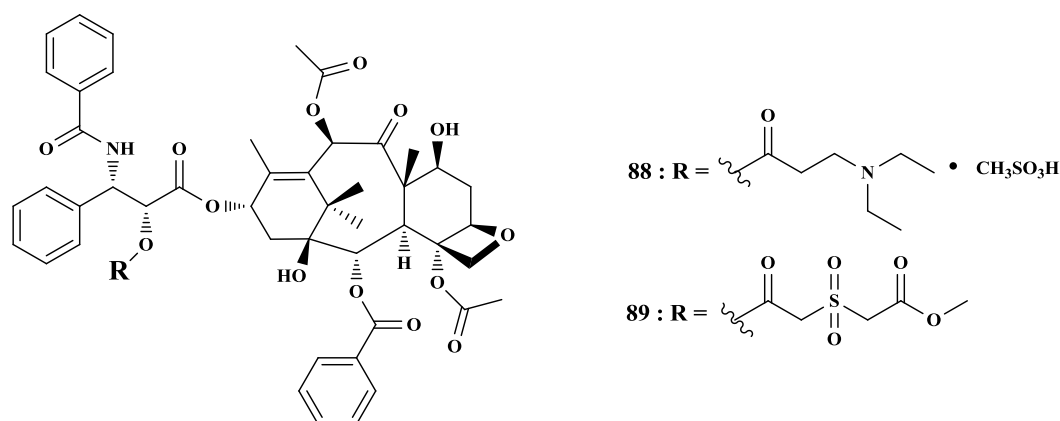


Figure 53

Les prodrogues phosphatées bénéficient d'une bonne solubilité dans l'eau et sont relarguées efficacement *in vivo* grâce à l'action des phosphatases. C'est pour ces raisons que le groupe Bristol-Myers Squibb (BMS) a développé deux prodrogues phosphatées du Paclitaxel (**90** et **91**), contenant un groupement phosphate en position 2' (**90**) ou en position 7 (**91**). Malheureusement, bien que la solubilité dans l'eau soit grandement améliorée, ces composés restent inchangés dans l'organisme et ne montrent aucune activité *in vivo*.¹⁸⁹ Les chercheurs de BMS se sont alors penchés sur la synthèse de dérivés phosphatés comportant un bras espaceur entre la partie Paclitaxel et le groupement phosphate, soit en position 2' (**92**) ou en position 7 (**93**).¹⁹⁰ Le bras espaceur comporte un groupement gemdiméthyle qui favorise l'attaque du groupement phénol (effet Thorpe-Ingold), libéré après l'action des phosphatases, sur l'ester et la formation de la chromanone qui en résulte. Cette stratégie permettrait d'accélérer la réaction de cyclisation et de relarguer le Paclitaxel. Cependant, ces composés nécessitent l'administration d'une dose 2 à 4 fois supérieure à celle du Paclitaxel pour observer une activité équivalente (**Figure 54**).

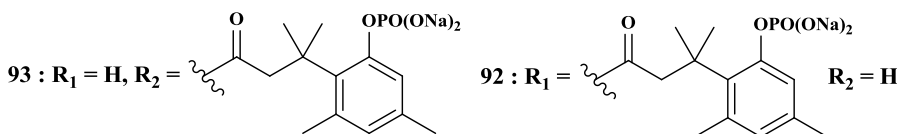


Figure 55

(Figure 55).

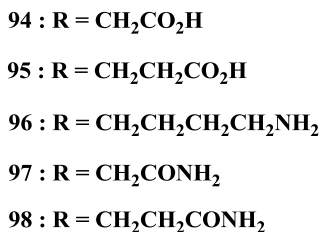


Figure 55

Nicolaou a proposé en 1994 une nouvelle modification en position 2'. L'acétate de méthylpyridinium du Paclitaxel (**99**) possède une bonne solubilité dans l'eau et est rapidement converti en Paclitaxel dans le plasma.¹⁹³ Par la suite, il a été montré que cette molécule possède une activité égale à celle du composé parent chez la Souris porteuse d'un cancer de la prostate expérimental. Ce composé est mieux toléré que le Taxol et est dénué d'effets secondaires chez les Souris *nude* (**Figure 56**). Cependant, aucun test préclinique supplémentaire n'a été rapporté dans la littérature depuis.¹⁹⁴

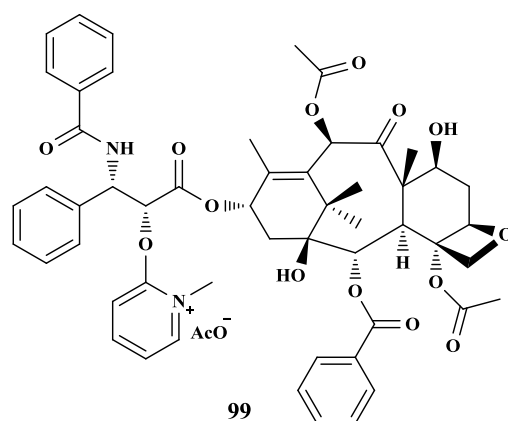


Figure 56

Damen a couplé le Paclitaxel à l'acide maléique en position 2'.¹⁹⁵ La nouvelle prodrogue **100** (**Figure 57**) possède une bonne solubilité dans l'eau (0,6 mg/mL au lieu de 0,00025 mg/mL) et libère la molécule de Paclitaxel dans le plasma avec un temps de demi-vie de 4 heures. La prodrogue **100** affiche une cytotoxicité similaire à celle du Paclitaxel, mais la DMT est supérieure à celle du Paclitaxel. A cette même dose, le maléate de Paclitaxel **100** possède un index thérapeutique supérieur, notamment sur un modèle de tumeur P388, et permet une survie à long terme des souris. En revanche, comme dans la plupart des cas, le dérivé couplé avec l'acide maléique en position 7 n'est pas actif *in vivo*, probablement parce que le Paclitaxel n'est pas libéré.

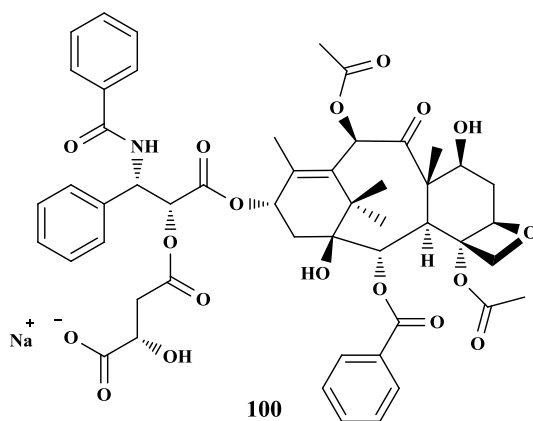


Figure 57

Si la plupart des dérivés du Paclitaxel modifiés en position 7 se sont révélés être inactifs, le Protaxel (**101**) est une exception.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Le principal problème de ces conjugués est que la fonction ester en position 7 est trop encombrée pour être substrat des hydrolases. Dans le cas du Protaxel, une cyclisation intramoléculaire pH-dépendante explique la facile libération du Paclitaxel dans le sérum (**Figure 58**). Le Protaxel (**101**) est beaucoup moins toxique que le Paclitaxel et est 3 fois mieux toléré que ce dernier. De plus une meilleure solubilité dans l'eau est observée (0,05 mg/mL au lieu de 0,00025 mg/mL). Enfin, ce dérivé montre une activité anticancéreuse *in vivo* très prometteuse sur différents modèles de cancers humains sensibles ou résistants (prostate, ovaire et colon) greffés chez la Souris.^{196,197} Ce phénomène est dû notamment à la libération progressive de Paclitaxel (**73**) dans l'organisme, ce qui se traduit par une meilleure pharmacocinétique. Malheureusement, malgré ces résultats très prometteurs, aucun nouveau développement n'a été rapporté.

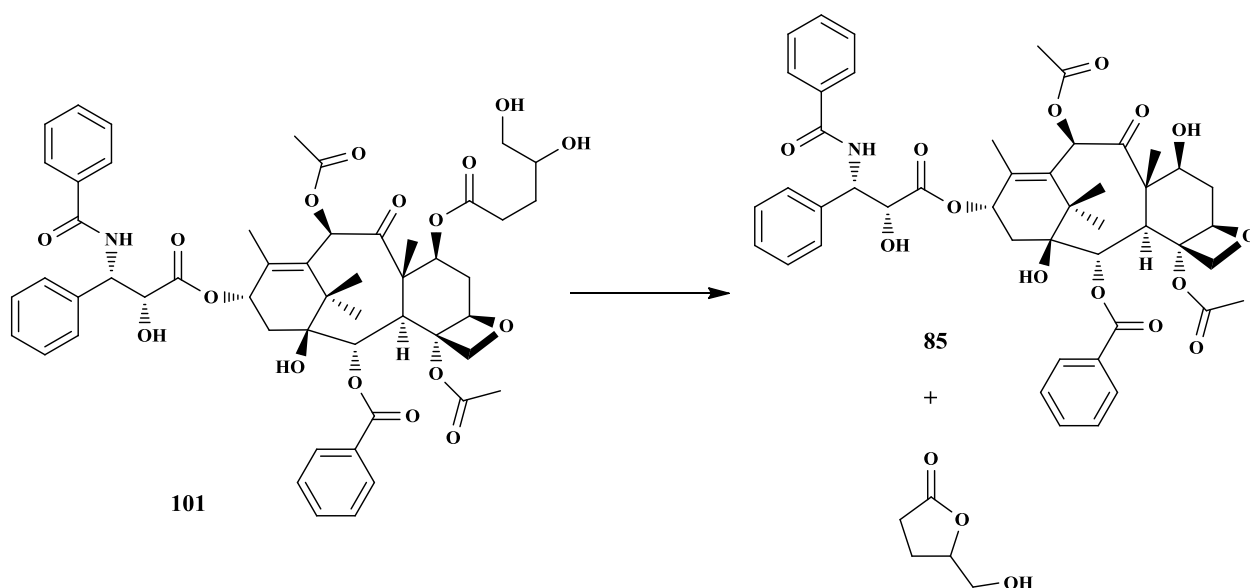


Figure 58

Malgré toutes ces études menées sur la synthèse et l'évaluation biologique de bioconjugués du Paclitaxel, le plus souvent hydrosolubles, aucun de ces composés n'a atteint des études cliniques avancées. Il est probable que le développement d'une forme hydrosoluble du Paclitaxel permettant de simplifier son administration ne constitue pas un avantage thérapeutique et économique suffisant pour justifier d'un développement industriel.

Bioprécurseurs du Paclitaxel

Kiso et coll. ont rapporté la synthèse et l'évaluation d'un nouveau dérivé du Paclitaxel (**85**), l'Isotaxel (**102**) qui est une isoforme 2'-O-acyl du Paclitaxel.^{199,200} Cette prodrogue est 1800 fois plus soluble que le Paclitaxel dans l'eau et libère le principe actif via une migration intramoléculaire O-N du groupe benzoyle dans les conditions physiologiques à pH 7,4 (**Figure 59**). Contrairement à tous les autres bioconjugués développés, nous avons ici une prodrogue qui ne libère aucun composé secondaire potentiellement toxique. Sur la base de ces résultats prometteurs, cette méthodologie a été appliquée à d'autres taxoïdes comme le Docétaxel. Toutefois, l'activité biologique de ces dérivés n'a pas été rapportée.^{201,202}

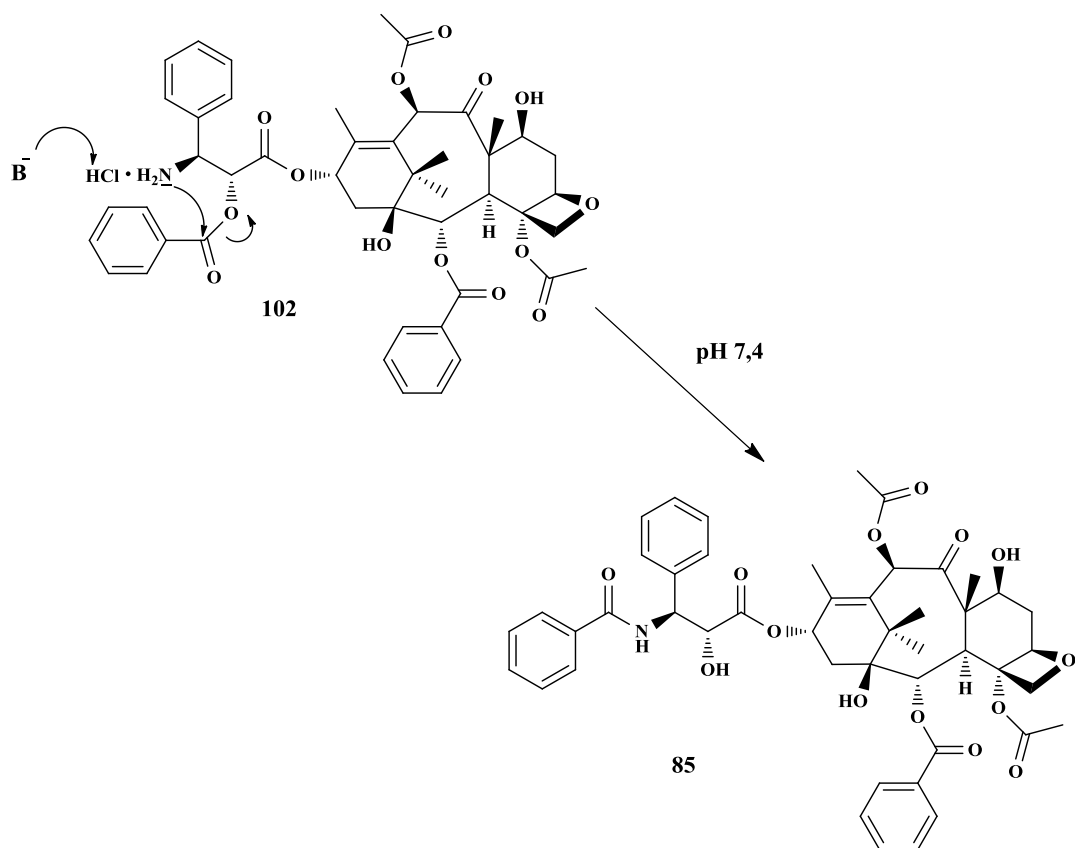


Figure 59

Prodrogues conçues pour cibler les tumeurs

La délivrance des principes actifs directement et exclusivement à leur cible, évitant ainsi les effets indésirables est le but ultime de la pharmacologie. Dans le cas des cancers, il est possible de mettre à profit certaines enzymes présentes sélectivement dans ou à proximité du tissu tumoral. Parmi ces enzymes, nous pouvons citer l'activateur tissulaire du plasminogène ou encore l'antigène spécifique de la prostate (PSA).

L'activateur du plasminogène UPa (Urokinase-type Plasminogen Activator) est une enzyme clé pour catalyser les processus protéolytiques requis dans l'invasion tumorale qui est surexprimée dans les cellules tumorales. L'UPa transforme le plasminogène en plasmine activée par une unique coupure spécifique entre l'Arg560 et la Val561. La plasmine est une enzyme protéolytique dont le rôle principal est de lyser la fibrine, étape indispensable de la coagulation sanguine. Une stratégie bien établie consiste à relier, généralement par une lysine, un principe actif à un tripeptide qui est un substrat spécifique de la plasmine. A proximité d'une cellule tumorale exprimant la plasmine

activée, la prodrogue est métabolisée par coupure de la liaison entre le principe actif et la lysine du tripeptide. Cette stratégie a été appliquée avec succès pour les moutardes à l'azote.²⁰³

Le groupe de Scheeren a conçu plusieurs prodrogues, telles que le bioconjugué **103** dans lesquelles le Paclitaxel est couplé en position 2', via une liaison carbonate et un bras espaceur, à un tripeptide substrat de la plasmine (**Figure 60**). Le bioconjugué **103** montre une libération plasmine-dépendante du Paclitaxel et affiche des CI_{50} inférieures à celles du Paclitaxel sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Cependant, après cette hydrolyse enzymatique, le bras espaceur est toujours lié au Paclitaxel. Le temps de libération réel du Paclitaxel demeure très long, avec un temps de demi-vie de 23 heures. Le bioconjugué **103** a finalement été sélectionné pour des études *in vivo* approfondies.

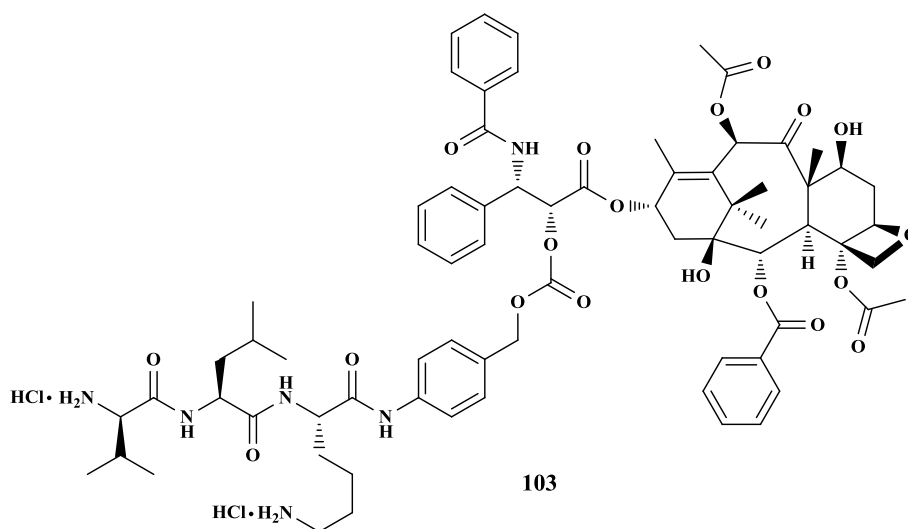


Figure 60

Il a été suggéré que certains acides gras sont reconnus par les tumeurs, à partir du sang artériel, vraisemblablement pour être utilisés comme précurseurs biologiques et sources d'énergie. C'est sur cette base qu'a été conçue une prodrogue lipophile : l'acide docosahexaénoïque (DHA)-Paclitaxel (Taxoprexin®, Protarga Inc.) (**104**) (**Figure 12**). Le DHA (**105**) est un acide gras ω -3 naturel trouvé notamment dans le lait humain. La prodrogue **104** n'étant malheureusement pas soluble dans l'eau, celle-ci est formulée dans le Crémophore. Toutefois, celui-ci est utilisé en quantité moindre que pour le Paclitaxel. Ce nouveau bioconjugué a montré une distribution tumorale ainsi qu'une activité anticancéreuse accrues sur différents modèles *in vivo* à des doses équitoxiques ou équimolaires.²⁰⁴ Il a également été démontré qu'*in vitro*, plus de 99% de ce

bioconjugué était lié au plasma humain, ce qui expliquerait en partie son profil pharmacocinétique unique.²⁰⁵

Des tests de phase I très prometteurs, ont été réalisés avec la prodrogue **104** seule,^{206,207} ou en association avec le Carboplatine.²⁰⁸ En général, les effets secondaires (hypersensibilité, perte de cheveux) observés avec le Paclitaxel ne sont pas observés chez les patients. Plusieurs études cliniques de phase II ont également été réalisées avec succès pour le traitement du cancer du poumon à grandes cellules,²⁰⁹ des adénocarcinomes gastriques ou œsophagiens²¹⁰ ou encore des mélanomes métastatiques.^{211,212} Plus récemment, Bedikian et coll. ont comparé l'activité du DHA-Paclitaxel avec celle de la Dacarbazine, dans un test clinique de phase III sur des patients atteints d'un mélanome métastatique. Malheureusement, aucun gain en terme de survie des patients, n'a été observé.²¹³

En dépit de ce premier échec en phase III, les résultats prometteurs lors des différents essais cliniques sur une large variété de tumeurs solides, laissent espérer que le DHA-Paclitaxel soit finalement utilisé en clinique (**Figure 61**).

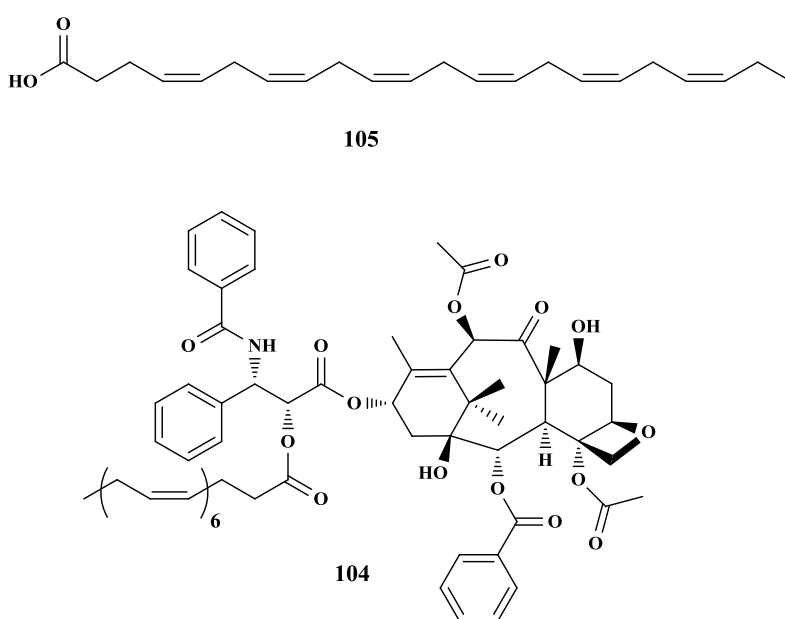


Figure 61

II.2.1.5. Squalénisation du Paclitaxel

Les résultats encourageants obtenus avec le DHA-Paclitaxel **104** ont incité Patrick Couvreur et Franco Dosio (Université de Turin, Italie) à explorer la squalénisation du Paclitaxel. Nous pouvions nous attendre à ce que la prodrogue obtenue possède des propriétés très proches de celles du DHA-Paclitaxel avec en outre la capacité de s'auto-organiser en milieu aqueux. La formulation nanoparticulaire serait un avantage décisif dans le cas du Paclitaxel, permettant de s'affranchir du Crémophore.

La prodrogue **23** a été préparée par simple couplage de l'acide 1,1',2-trisnor-squalénique (**13**) au Paclitaxel (**85**) en position 2', en utilisant l'EDCI et la 4-DMAP dans le DCM, avec un rendement de 65 % (Schéma 38).⁸³

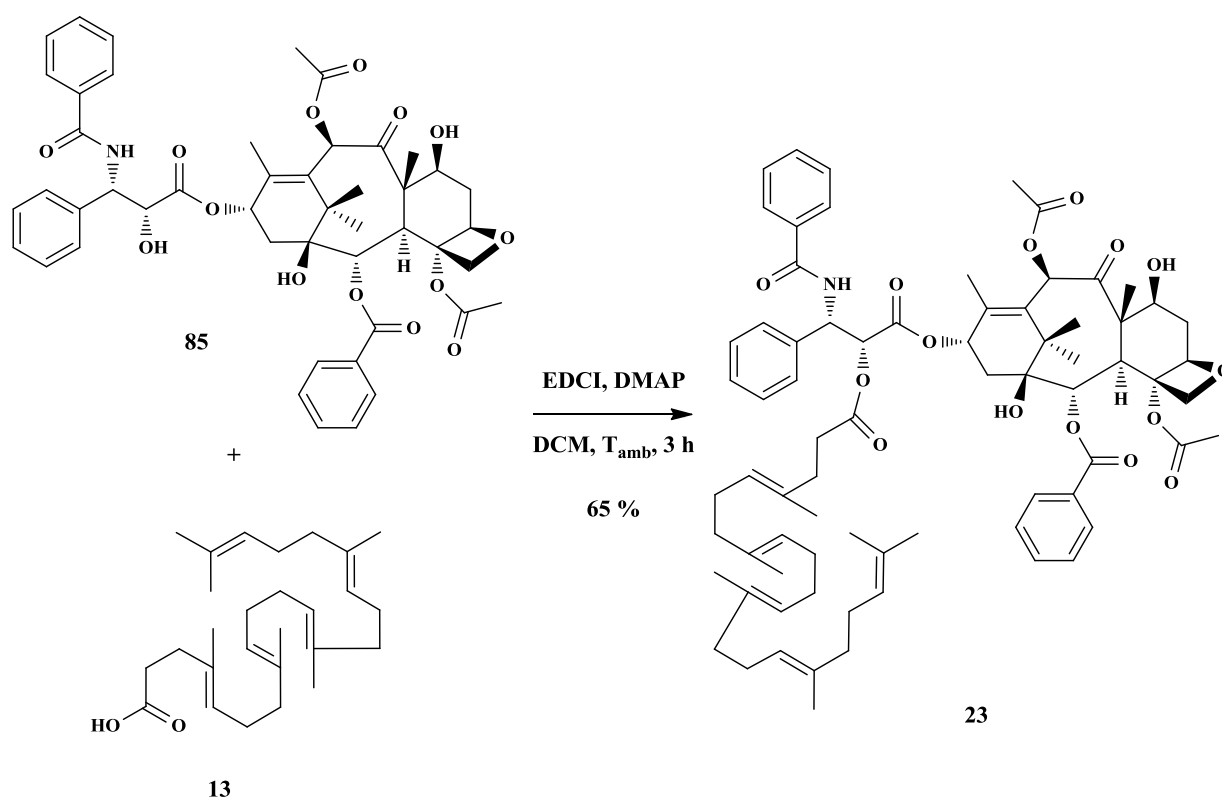


Schéma 38

Le Paclitaxel-squalène **23** forme des nanoparticules monodisperses par la méthode de nanopréciipitation évaporation de solvant. Les particules obtenues sont très stables, ce qui est en

accord avec le fort potentiel Zêta mesuré ($-36,9$ mV). Ce résultat est d'autant plus remarquable que le Paclitaxel est une grosse molécule lipophile dont les seuls groupements polaires sont l'amide en position 3' et les deux hydroxyles en positions 1 et 7. Les nanoparticules de Paclitaxel-squalène ont été testées sur la lignée de cancer du poumon murin M109. Malheureusement, la CI_{50} a été évaluée à $16,5$ μ M, soit près de 2000 fois celle du Paclitaxel ($9,0$ nM). Cette valeur est très élevée, même si le Paclitaxel-squalène est une prodrogue qui doit être hydrolysée dans l'organisme par les enzymes cellulaires pour libérer le principe actif. Ce résultat a toutefois été confirmé par une très faible activité *in vivo* chez la Souris porteuse d'une tumeur sous-cutanée M109.

Afin d'améliorer l'activité anticancéreuse de ces prodrogues, des bras espaceurs ont été insérés entre la chaîne squalène et le Paclitaxel, dans l'espoir que le Paclitaxel soit libéré *in vivo* plus aisément. Différents bras espaceurs, diglycolyle, succinyle ou encore des chaîne pégylées plus ou moins longues ($n = 3$; $n = 11$), ont été utilisés (**Figure 62**).

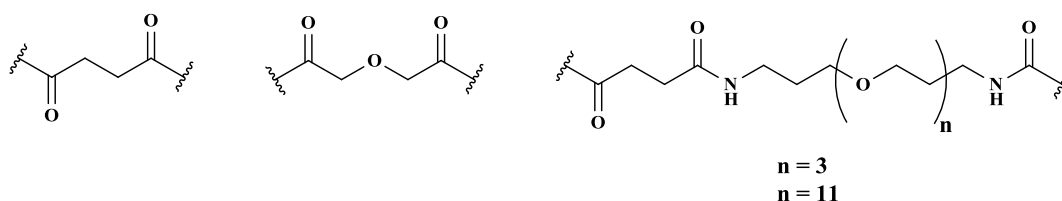


Figure 62. Bras espaceurs utilisés entre le Paclitaxel et la chaîne squalène

La libération du Paclitaxel à partir des nanoparticules des différents conjugués a été évaluée par dosage HPLC en présence de sérum. Les nanoparticules du composé **23** libèrent seulement 30 % de Paclitaxel après 100 heures d'incubation dans le sérum humain. Les nanoparticules des composés comprenant les bras espaceurs succiniques et pégylés libèrent le Paclitaxel plus rapidement, puisque après 100 heures d'incubation dans ce même sérum, environ 60 à 90 % de Paclitaxel est libéré. Enfin, les nanoparticules du dérivé comprenant le bras espaceur diglycolyle libèrent près de 90 % du Paclitaxel après seulement 50 heures d'incubation.

Les activités biologiques *in vitro* des différents analogues sous forme de nanoparticules, ont été évaluées sur la lignée cellulaire M109, en comparaison avec le Paclitaxel libre et les nanoparticules de Paclitaxel-squalène. Ces résultats sont en accord avec les tests de libération, puisque la prodrogue la mieux libérée (bras espaceur diglycolyle) est la plus active, avec une CI_{50} de 175 nM, contre $16,5$ μ M pour le Paclitaxel-squalène **23**. Les autres prodrogues (bras espaceurs succiniques et pégylés) possèdent des activités intermédiaires avec des CI_{50} allant de 365 nM à $6,45$

μM. Ainsi, même si les nanoparticules des prodrogues comportant des bras espaceurs restent moins actives *in vitro* que le Paclitaxel libre, nous pouvons observer un gain d'activité considérable par rapport au Paclitaxel-squalène (**23**), notamment pour la prodrogue possédant un bras espaceur diglycolyle (**Tableau 3**).

Composé	CI ₅₀ (nM)
Paclitaxel (85)	9,0 ± 2,65
Paclitaxel-squalène (23)	16500,0 ± 7,8
Paclitaxel-(succinique)-squalène	365,0 ± 5,3
Paclitaxel-(diglycolyle)-squalène	175,0 ± 5,5
Paclitaxel-(PEG₃)-squalène	490,0 ± 4,6
Paclitaxel-(PEG₁₁)-squalène	6450,0 ± 7,0

Tableau 3. Activité anticancéreuse *in vitro* des nanoparticules de prodrogues squalénisées du Paclitaxel sur la lignée cellulaire du cancer du poumon murin M109.⁸³

A la suite de ces résultats *in vitro* encourageants, les suspensions nanoparticulaires de ces différentes prodrogues ont été testées *in vivo*, chez la Souris, sur le modèle du cancer du poumon murin M109. Toutefois, les activités observées pour chaque prodrogue sont largement inférieures à celle du Paclitaxel, même pour le dérivé le plus actif *in vitro* doté d'un bras espaceur diglycolyle.

II.2.2. Objectif des travaux

Parmi toutes les prodrogues du Paclitaxel décrites dans la littérature, il semble que très peu aient une activité biologique supérieure à celle du Paclitaxel.

Le DHA-Paclitaxel (**104**) constitue très certainement une exception. La différence d'activité entre le DHA-Paclitaxel (**104**) et le Paclitaxel-squalène (**23**) est frappante, alors que les différences structurales sont minimales. Il apparaît que le point crucial est la coupure de la liaison entre le

principe actif et le vecteur lipidique, qui permet la libération du Paclitaxel efficacement dans un cas (**Figure 63, A**) et difficilement dans l'autre (**Figure 63, B**).

Faisant l'hypothèse que le système 4,7-diéniq ue induisait une conformation locale favorable à l'hydrolyse enzymatique du DHA-Paclitaxel (**104**), nous avons décidé de préparer de nouvelles prodrogues hybrides du Paclitaxel telle que **C** (**Figure 63**), comportant une unité 1,4-*cis*-pentadiène fixée en position 2', ainsi qu'une chaîne squalène. Cette chaîne confèrera sa capacité d'auto-assemblage dans l'eau aux prodrogues ainsi développées, tandis que l'unité 1,4-*cis*-pentadiène devrait permettre à la prodrogue de libérer plus efficacement le principe actif dans les conditions physiologiques, comme dans le cas du DHA-Paclitaxel (**104**).

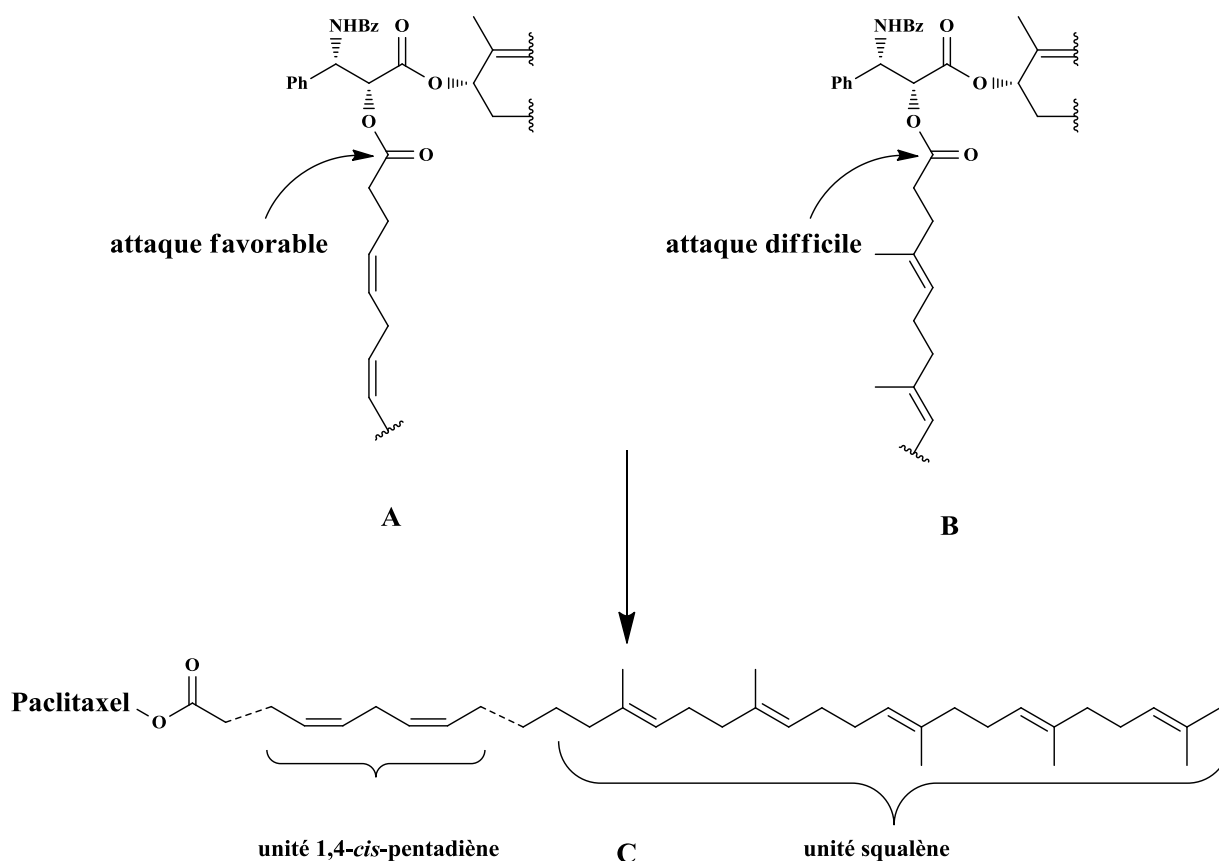


Figure 63. A) structure locale du DHA-Paclitaxel ; B) structure locale du Paclitaxel-squalène ; C) Structure générale des prodrogues hybrides du Paclitaxel.

Dans un premier temps, nous avons ciblé une prodrogue dans laquelle le système 1,4-*cis*-pentadiène est connecté au squalène et au Paclitaxel par deux groupements CH_2CH_2 , nous réservant de moduler ces motifs si la stratégie s'avérait fructueuse.

Nous évaluerons ensuite la capacité de chaque prodrogue à former des nanoparticules dans l'eau. Les structures de ces nanoparticules seront alors étudiées. Enfin, les différents composés synthétisés seront testés *in vitro*, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Les prodrogues les plus actives seront ensuite testées sur un modèle de cancer humain développé chez la Souris.

II.2.3. Exposé des travaux

II.2.3.1. Synthèse du conjugué du Paclitaxel 106

La synthèse de la prodrogue **106** sera effectuée par couplage du Paclitaxel (**85**) à l'acide **107**, en position 2'. Nous avons vu précédemment que la forte réactivité de cet alcool évite d'avoir à protéger l'hydroxyle en position 7. Les doubles liaisons *cis* de l'acide **107** seront construites par des réactions de Wittig successives, selon le **Schéma 39**. L'acide **107** sera obtenu par une première réaction de Wittig entre l'aldéhyde trisnor-squalénique (**59**), issu du squalène (**10**), et le phosphonium **108a** dérivé de l'ester bromé correspondant. Cet ester sera obtenu à partir du 4-oxobutanoate de méthyle (**109**) et du phosphonium **110** dérivé du bromopropanol protégé correspondant.

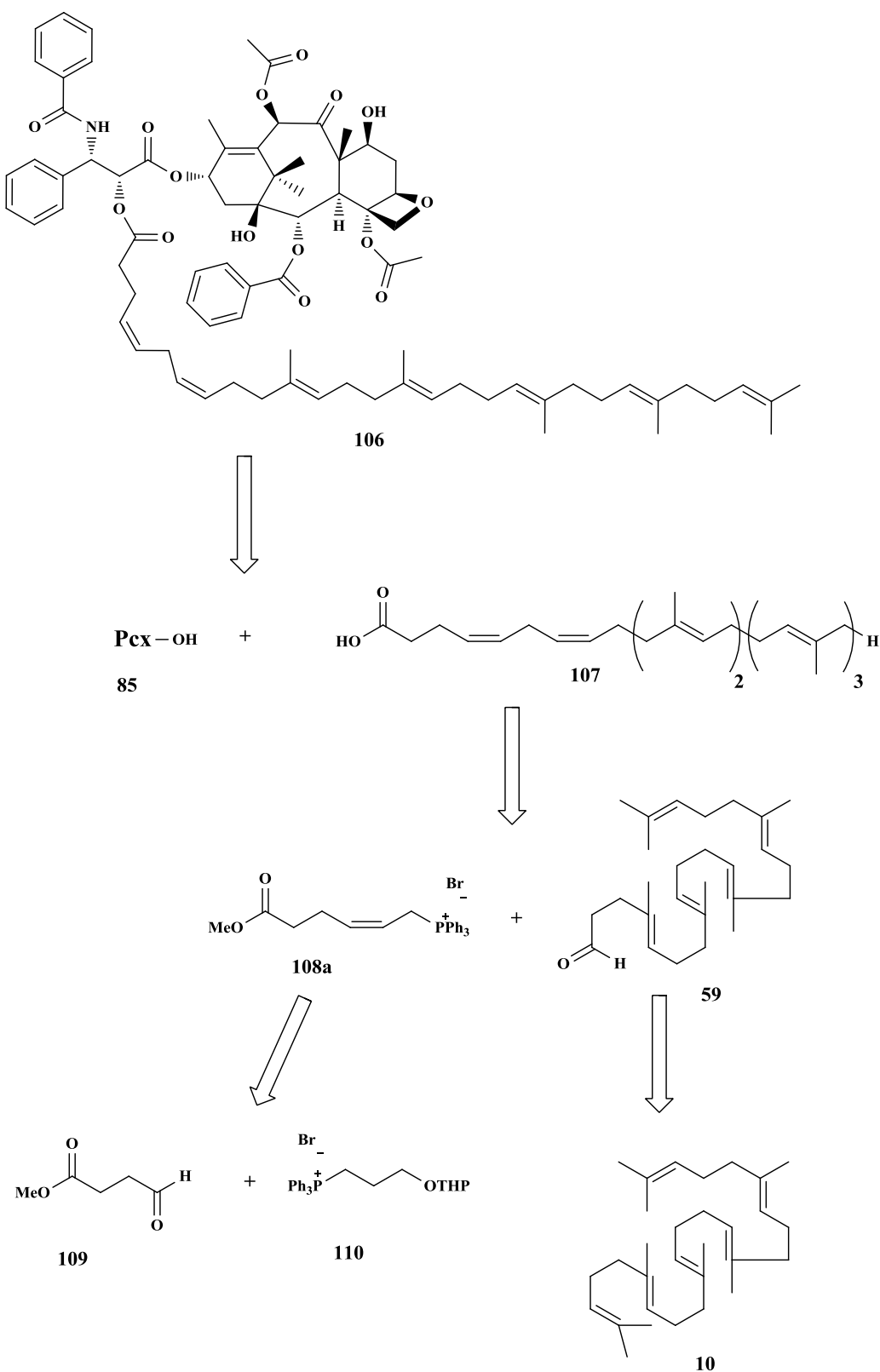


Schéma 39. Analyse rétrosynthétique de la synthèse du bioconjugué **106** à partir du squalène (**10**) et du 4-oxobutanoate de méthyle (**109**).

La préparation du phosphonium **108b** a déjà été rapportée dans la littérature par Delorme et coll. en 1989 en 9 étapes à partir de l'alcool homopropargylique **111** selon le **Schéma 40**. Cet alcool a été protégé dans un premier temps par un groupement silylé, puis l'anion lithié de l'acétylénique a été condensé sur l'oxirane pour donner l'alcool primaire **112** avec un rendement de 66 %. L'alcool **112** a ensuite été homologué par formation d'un mésylate intermédiaire suivie d'une attaque nucléophile de cyanure. Le nitrile formé a alors été transformé en l'ester de méthyle **113** par réaction de Pinner^{214,215} avec un rendement de 90 %. Enfin, l'oléfine *cis* **114** a été obtenue par semi-hydrogénation de **113** sur borure de nickel, avec un rendement de 90 %.²¹⁶ Le sel de phosphonium **108b** a finalement été obtenu par aménagement fonctionnel de l'alcool **114**.²¹⁷

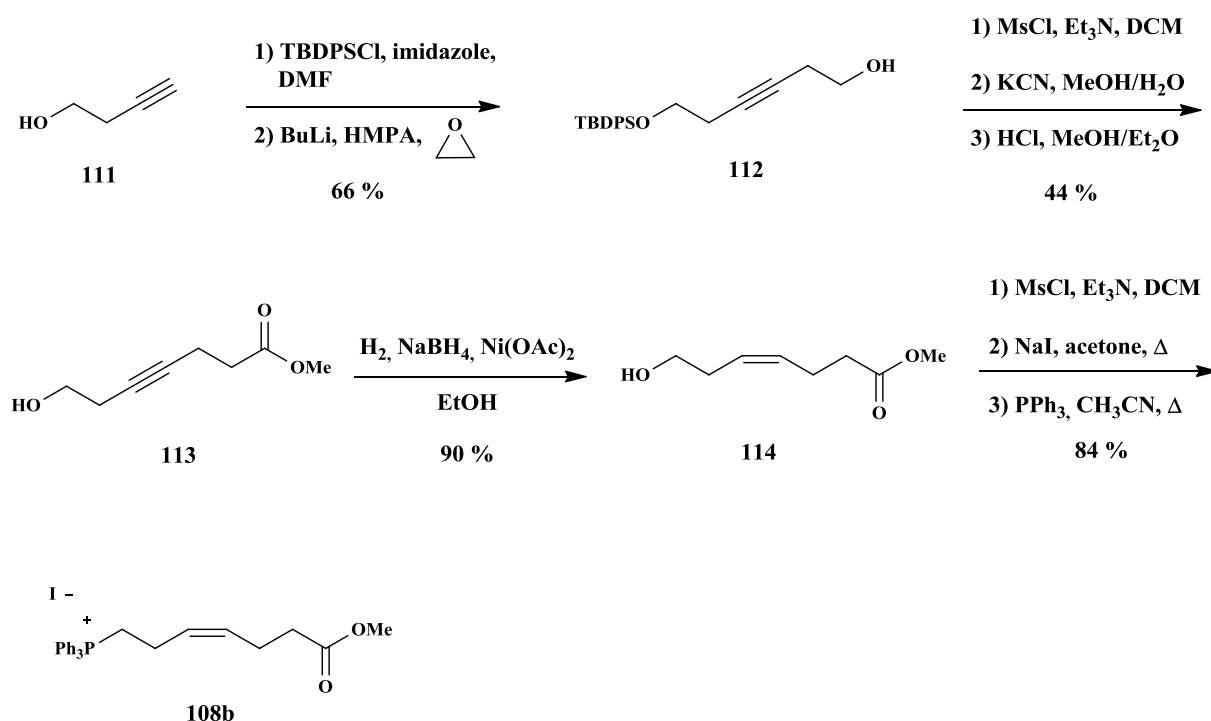


Schéma 40. Synthèse du phosphonium **108b** par Delorme et coll.

Pour notre part, nous avons décidé de synthétiser le phosphonium **108b** à partir de l'acide pent-4-énoïque (**115**) et du 3-bromopropan-1-ol (**116**). L'acide penténoïque (**115**) a été estérifié dans un premier temps, puis la double liaison terminale a été ozonolysée dans le DCM à -78°C , et l'ozonide intermédiaire réduit par la triphénylphosphine pour fournir l'ester méthylique du semialdéhyde succinique **109** avec un rendement de 60 % sur 2 étapes.²¹⁸ En parallèle, le bromure de phosphonium **110** a été préparé en 2 étapes à partir du 3-bromopropan-1-ol (**116**), par protection du groupement hydroxyle sous forme d'éther de tétrahydropyrane,²¹⁹ puis par condensation avec la

triphénylphosphine dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium. Dans ce processus, la base minérale préserve de la dégradation le groupement tétrahydropyrane. Le phosphonium **110** a été isolé après précipitation dans l'éther diéthylique avec un rendement de 56% (**Schéma 41**).²²⁰

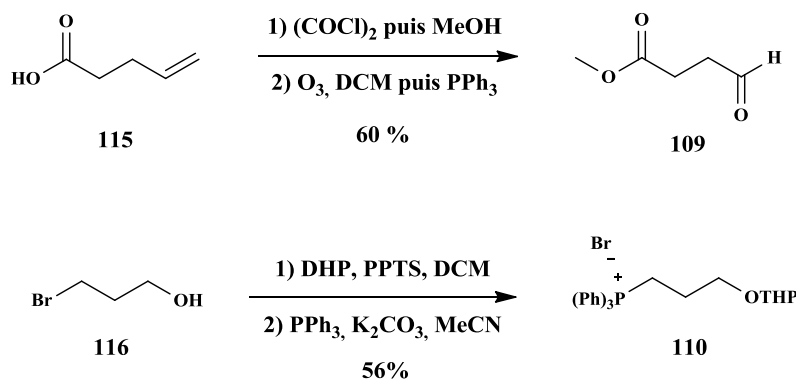
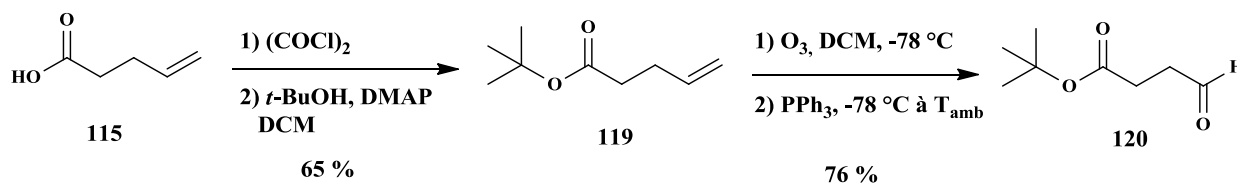


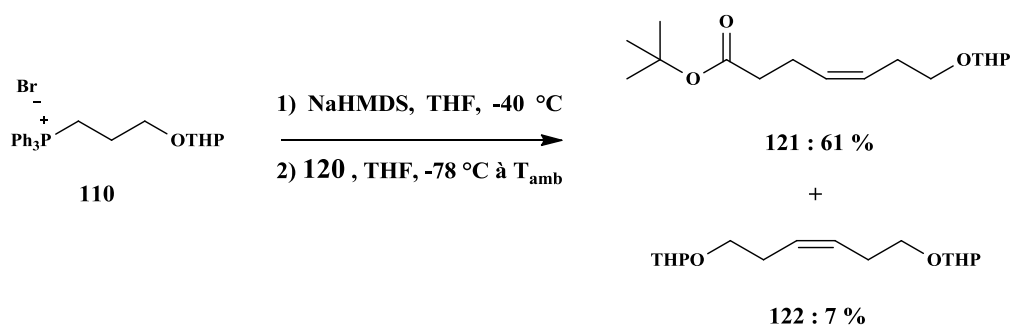
Schéma 41

Le NaHMDS semblait la base la plus appropriée pour établir la double liaison *cis* de **108b** compte tenu des précédents très proches décrits dans la Littérature par Coxon et coll.,²²¹ et Kobayashi qui ont effectué une réaction de Wittig avec le même phosphonium **110**.²²² L'éthylénique **117** a ainsi été préparé par réaction de Wittig entre l'ylure issu de **110** et le 4-oxobutanoate de méthyle (**109**), en présence de NaHMDS. L'oléfine **117** a été isolée avec un rendement de 60%, et une stéréosélectivité en faveur de l'oléfine Z de plus de 95 %, comme en témoignent les constantes de couplage observées par RMN du proton. Une fois établie la première double liaison, il fallait réaliser l'aménagement fonctionnel préparant l'introduction de la seconde. Ceci a été effectué très simplement en 4 étapes à partir de l'oléfine **117**. Le groupement hydroxy, déprotégé dans un premier temps par traitement à l'acide *para*-toluènesulfonique dans le méthanol a été converti en mésylate **118** par traitement au chlorure de mésyle dans le dichlorométhane avec un rendement quantitatif. La substitution du groupement mésyle par l'iode dans les conditions de Finkelstein a fourni le composé iodé correspondant. Le traitement de ce dernier par la triphénylphosphine dans l'acétonitrile a donné l'iodure de phosphonium **108b** avec un rendement global de 60% (**Schéma 42**).²¹⁷

très volatile et difficile à isoler. L'éthylénique **119** a ensuite été ozonolysé dans le DCM à basse température et l'ozonide formé réduit *in situ* par la triphénylphosphine pour fournir l'aldéhyde **120** avec un rendement de 76 % (**Schéma 44**).



L'aldéhyde **120** a ensuite été couplé à l'ylure issu du phosphonium **110** pour fournir l'oléfine *cis* **121** avec un rendement de 61 %, similaire à celui obtenu pour l'oléfine **117** comportant un ester méthylique. Cependant, l'examen du produit brut nous a permis d'identifier un produit secondaire formé au cours de cette réaction de Wittig, avec un rendement de 7 %. Il s'est avéré qu'il s'agissait de l'oléfine **122** issue du couplage oxydatif entre 2 molécules de phosphonium **110** (**Schéma 45**).



Ce type de réaction a déjà été rapporté dans la littérature par Poulain et coll.²²⁴ et appliqué à la synthèse du didéoxypetrosynol A par Gung et Omollo.²²⁵ Cette méthode permet à partir d'ylures non stabilisés l'accès à des oléfines *cis* symétriques par auto-oxydation. Par exemple, le couplage oxydatif du phosphonium **123**, comportant un groupement protecteur THP, comme dans notre cas, a permis de préparer l'oléfine *cis* **124**, par traitement avec un léger excès de NaHMDS dans le THF au reflux et dans un système ouvert à l'air, avec un rendement de 95 % (**Schéma 46**).²²⁴

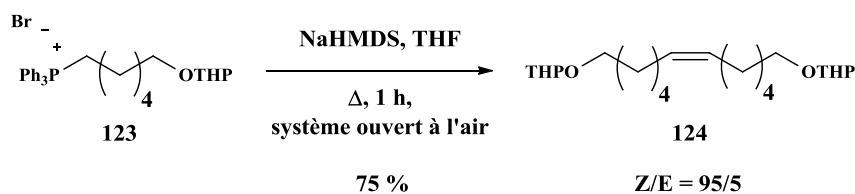


Schéma 46

La formation de l'oléfine symétrique **122** explique en partie le rendement moyen de notre couplage de Wittig. On pouvait espérer qu'en travaillant sous totale exclusion d'oxygène, on pourrait accroître le rendement. Malheureusement, même après un dégazage soigneux, celui-ci n'a pas été amélioré.

Malgré ce rendement de couplage modeste en partie inexpliqué, nous avons poursuivi cette voie de synthèse, en préparant l'iodure de phosphonium **125** à partir de l'alcool protégé **121** en 4 étapes, en utilisant la même méthode que pour l'iodure de phosphonium **108b** (**Schéma 47**).

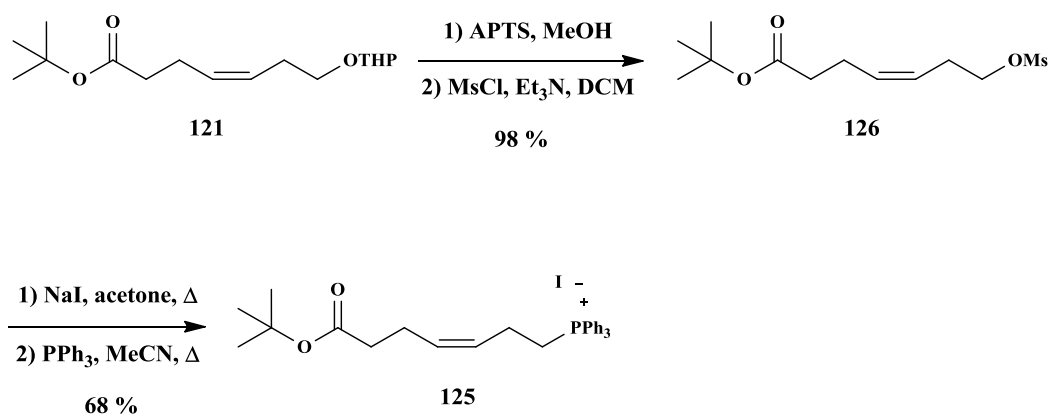


Schéma 47

Si les 3 premières étapes sont effectuées avec des rendements quasi-quantitatifs, l'étape de formation du phosphonium ne se fait qu'avec un rendement de 73 %. L'examen du brut réactionnel nous a en effet permis d'isoler puis d'identifier 20 % d'iodure de phosphonium **127** comportant une fonction acide carboxylique à la place de l'ester de *tert*-butyle (**Schéma 48**).

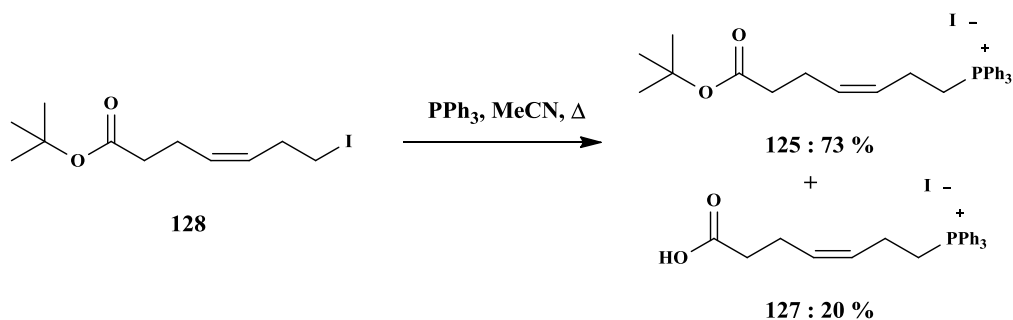


Schéma 48

Les ester de *tert*-butyle sont généralement clivés par des acides de Brønsted (HCl, H₂SO₄, TFA) ou par des acides de Lewis (TiCl₄, ZnBr₂). L'hydrolyse des esters de *tert*-butyle par l'iode en quantité catalytique a également été rapportée dans la littérature par le groupe de Yadav.²²⁶ La formation d'acide iodhydrique *in situ* a été invoquée par cet auteur pour expliquer ses résultats. Dans notre cas, il est possible que des traces d'eau présentes dans le substrat de départ aient solvolysé l'iodé **128** conduisant à la formation d'acide iodhydrique. Dans ce cas l'espèce responsable de la perte du groupement *tert*-butyle serait Ph₃PH⁺ I⁻.

Nous avons fait l'hypothèse que le bromé correspondant serait moins sujet à ce processus. Nous avons donc synthétisé le bromé **129** selon le même schéma réactionnel avec d'excellents rendements. Le bromure de phosphonium **130** a ensuite été préparé par traitement du bromure **129** par la triphénylphosphine au reflux de l'acétonitrile pendant 24 heures. Le phosphonium **130** a pu être isolé avec un rendement de 67 %, accompagné cette fois encore du phosphonium déprotégé **131** avec un rendement de 23 % (Schéma 49).

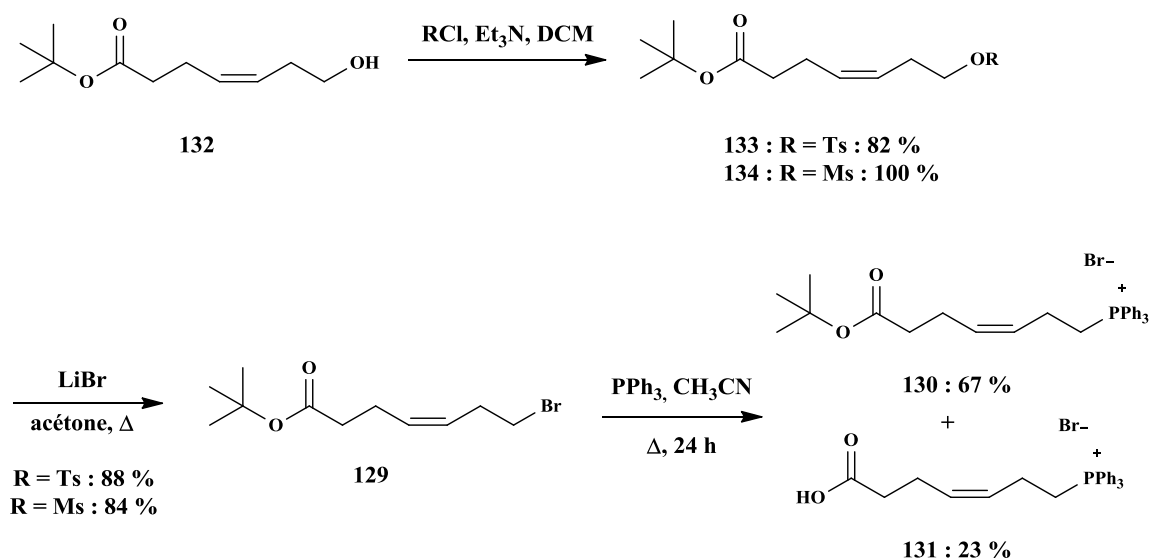


Schéma 49

Le rendement n'étant pas meilleur qu'avec le composé iodé **128**, l'iodure de phosphonium **125** a été couplé à l'aldéhyde trisnor-squalénique (**59**), après formation de l'ylure correspondant par traitement au NaHMDS. La fonction ester a été saponifiée au reflux du mélange eau/EtOH pour fournir l'acide hybride **107** avec un rendement sur 2 étapes de 68 %, légèrement meilleur que lors de la réaction de Wittig entre l'aldéhyde squalénique et le phosphonium contenant l'ester méthylique (**Schéma 50**).

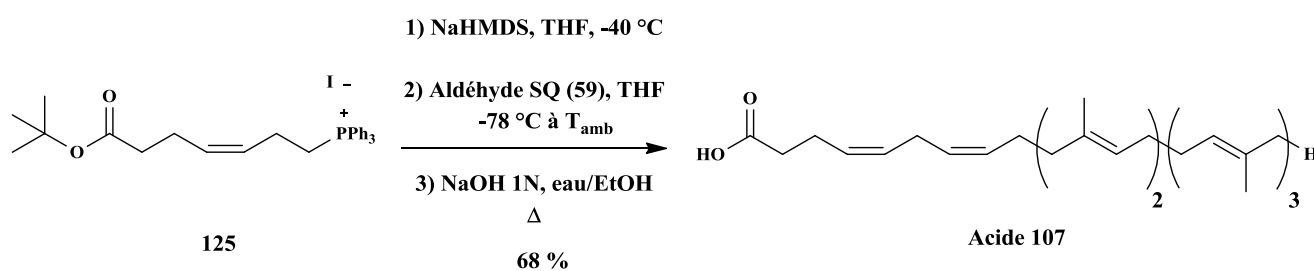


Schéma 50

Au final, cette nouvelle synthèse utilisant un ester de *tert*-butyle a été réalisée en 9 étapes avec un rendement de 14 % à la place de 10 % avec l'ester de méthyle, essentiellement grâce au meilleur rendement obtenu lors du couplage de Wittig.

L'acide **107** a alors pu être couplé au Paclitaxel (**85**), dans les conditions décrites dans la Littérature,^{83,227} en utilisant l'EDCI comme agent de couplage. Le biconjugué **106** a ainsi été obtenu sélectivement en position 2' avec un rendement de 71 % (**Schéma 51**).

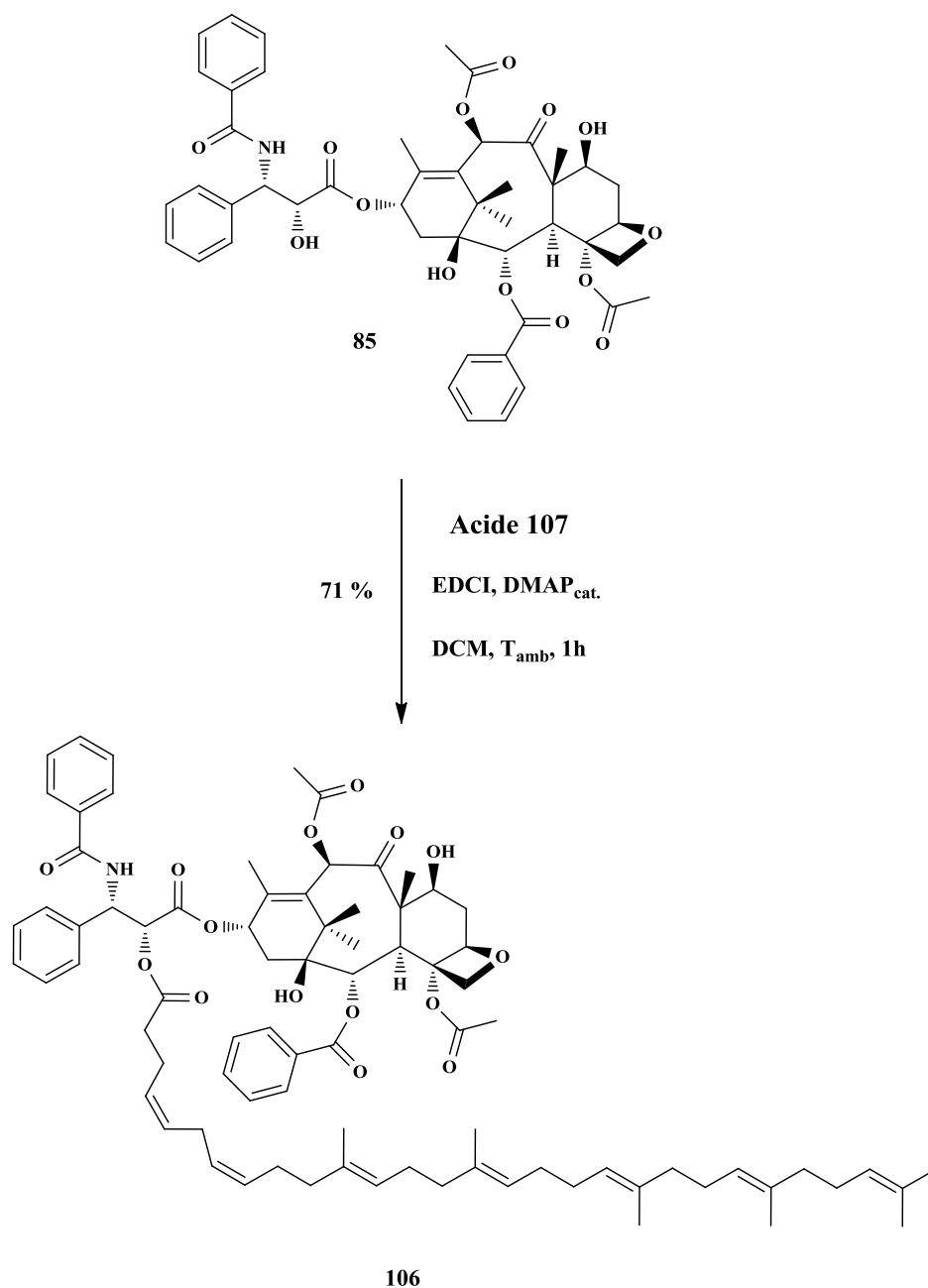


Schéma 51

Préparation et caractérisation des nanoparticules, évaluation biologique

Par la méthode de précipitation-évaporation de solvant, la prodrogue **106** forme des nanoparticules de 125 nm de diamètre moyen, avec un indice de polydispersité correct de 0,134, à 1 mg/mL dans l'eau (**Figure 64**).

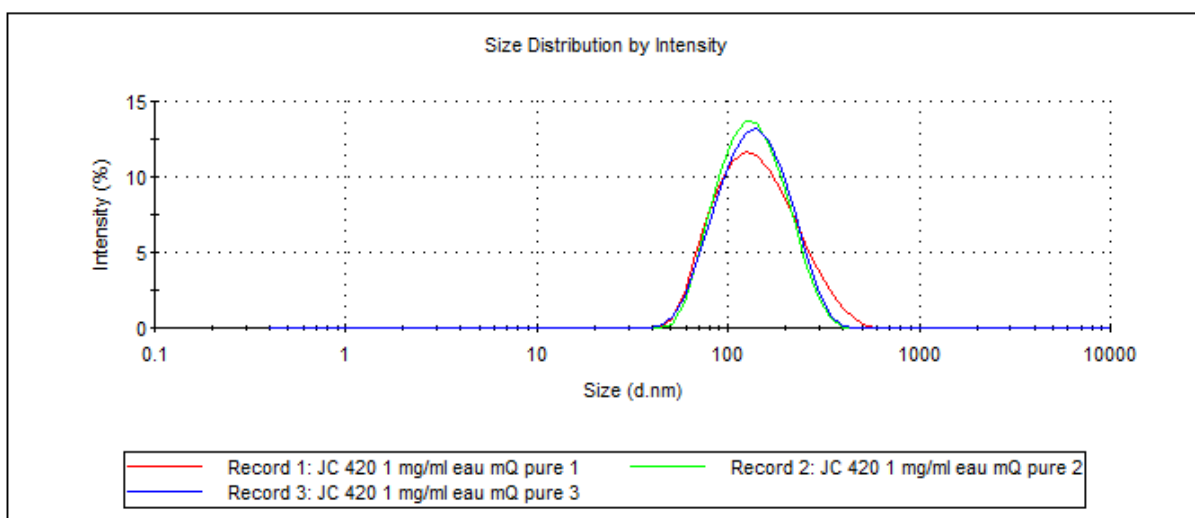


Figure 64. Distribution de la taille des nanoparticules du bioconjugué **106** en fonction de l'intensité, à 1 mg/mL dans l'eau pure.

Cependant, pour envisager une administration *in vivo* à des doses thérapeutiques, nous devons préparer des nanoparticules à des concentrations plus élevées. En effet, si l'on admet pour cette nouvelle prodrogue (**106**) une dose maximale tolérée (DMT) chez la Souris proche de celle du DHA-Paclitaxel (**104**) qui est de 120 mg/kg, il fallait envisager une concentration de l'ordre de 10 mg/mL sachant que nous ne pouvons pas injecter des volumes supérieurs à 200 μ L par voie i.v. chez la Souris. Malheureusement, nous avons obtenu des suspensions polydisperses à des concentrations supérieures à 5 mg/mL. A cette concentration, les nanoparticules ont un diamètre moyen d'environ 430 nm avec un indice de polydispersité de 0,067.

Même si la taille moyenne de ces nanoparticules était un peu élevée, l'évaluation biologique *in vivo* chez la Souris porteuse d'une tumeur expérimentale du cancer du poumon humain A549 a été effectuée dans notre Laboratoire par Séverine Wack. Le protocole a consisté en deux injections par jour, pendant 5 jours consécutifs, aux jours 27, 28, 29, 30 et 31, par voie i.v.. La dose par injection était de 45 mg/kg, et donc de 90 mg/kg par jour. Le Paclitaxel libre quant à lui a été administré deux fois par jour, avec des doses d'injection de 10 mg/kg (20 mg/kg/jour) (**Figure 65**).

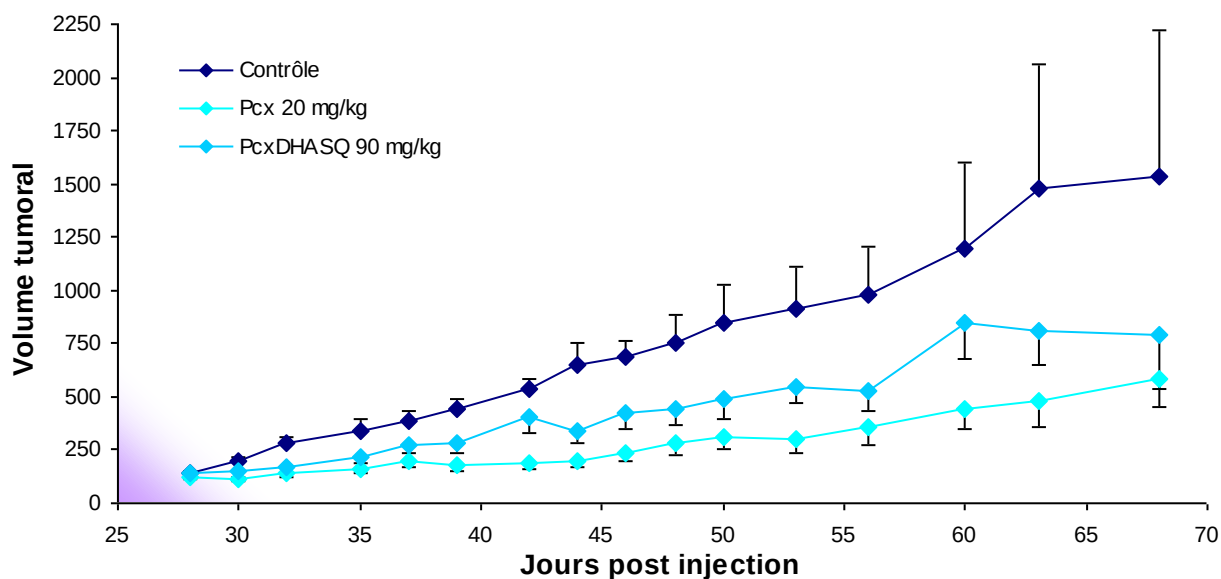


Figure 65. Croissance tumorale (en mm³) chez des Souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée A549, en fonction du traitement administré. Contrôle (bleu foncé), Paclitaxel **(85)** à 20 mg/kg (bleu turquoise), bioconjugué **106** à 90 mg/kg (bleu clair).

Après 68 jours d'expérience, nous avons pu observer que cette nouvelle prodrogue (**106**) présentait un effet significatif sur la croissance tumorale. En effet, pour le groupe contrôle, le volume moyen des tumeurs est passé d'environ 100 à 1500 mm³. Dans le groupe traité par le Paclitaxel **(85)**, les tumeurs ont atteint au final un volume moyen d'environ 500 mm³, ce qui correspond à une inhibition de la croissance tumorale de 71 %. Les nanoparticules du bioconjugué du Paclitaxel **106** (90 mg/kg) induisent quant à elle une inhibition de la croissance tumorale de 54%.

Des effets secondaires à court terme et à long terme ont été observés pendant l'expérience. Dans le groupe des souris traitées par le Paclitaxel **(85)**, deux d'entre elles sont mortes 15 jours après la dernière injection, et deux autres ont perdu leur queue. Dans le groupe du bioconjugué **106**, 2 souris sont mortes à cause de problèmes hépatiques et rénaux. Cette toxicité peut s'expliquer par une accumulation des nanoparticules au niveau des reins et du foie, à cause de leur taille trop élevée. Les nanoparticules d'une taille supérieure à 200 nm sont en effet généralement phagocytées par les cellules de Kupffer du foie. L'accumulation du principe actif dans cet organe explique la toxicité hépatique.

II.2.3.2. Nouveaux biconjugués du Paclitaxel

Ainsi, cette nouvelle prodrogue possède une activité non négligeable bien qu'encore inférieure au Paclitaxel libre. Une activité meilleure que celle de la prodrogue **23**, formée par simple couplage du Paclitaxel à l'acide trisnor-squalénique. L'hypothèse d'un effet bénéfique particulier du système 1,4-*cis*-pentadiène était donc confirmée.

Nous voulions cependant une prodrogue plus active que le Paclitaxel (**85**), mais permettant en outre de s'affranchir du Crémophor EL. D'autre part, il restait également à résoudre le problème de la taille des nanoparticules.

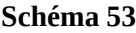
Nous avons donc envisagé de préparer une série de nouvelles prodrogues possédant le motif 1,4-*cis*-pentadiène, mais en incluant une liaison ester supplémentaire (**137**, **138**, **139**), un groupement gemdiméthyle (**136**, **139**), ou en homologuant la chaîne alkyle entre la fonction acide carboxylique et l'unité *cis*-pentadiène (**135**). Enfin, un composé comportant deux doubles-liaison conjuguées au lieu de l'unité *cis*-pentadiène (**140**), ainsi qu'un composé ne comportant qu'une seule double-liaison hormis la partie squalène (**141**), seront synthétisés à titre comparatif (**Figure 66**).



Figure 66

Synthèse de l'acide 135

Disposant de l'acide **107**, nous avons choisi de préparer **135** par simple homologation d'Arndt-Eistert,²²⁸ selon les conditions décrites par Seebach.²²⁹ L'anhydride mixte **142** a été préparé en traitant l'acide **107** par le chloroformiate d'éthyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane, puis traité par le diazométhane à 0 °C pour former l' α -diazocétone **143**, isolée après chromatographie avec un rendement de 50%. Celle-ci a ensuite été réarrangée en présence de trifluoroacétate d'argent dans un mélange THF/Méthanol pour fournir l'ester méthylique **144**. L'acide **135** a finalement été obtenu après saponification dans un mélange NaOH 1N/éthanol avec un rendement de 83 % sur les 2 étapes (**Schéma 52**).



150

1) NaHMDS, THF, -40 °C
 2) aldéhyde SQ (59), THF
 -78 °C à T_{amb}
 3) NaOH 1N, eau/EtOH

35 %

135

2 3

Schéma 54

Synthèse de l'acide **136**

La synthèse de l'acide **136** comportant un groupement gemdiméthyle en β de la fonction acide carboxylique a été effectuée en utilisant la même méthodologie que précédemment, au départ du 3,3-diméthyl-4-oxobutanoate d'éthyle (**153**). Ce composé a été obtenu à partir de l'alcool prénylique **151** avec 53 % de rendement par réarrangement de Claisen avec l'orthoacétate d'éthyle.²³⁰⁻²³² L'ozonolyse de l'oléfine **152** nous a permis d'isoler, après réduction de l'ozonide par la triphénylphosphine, l'aldéhyde **153** avec un rendement de 75% (**Schéma 55**).

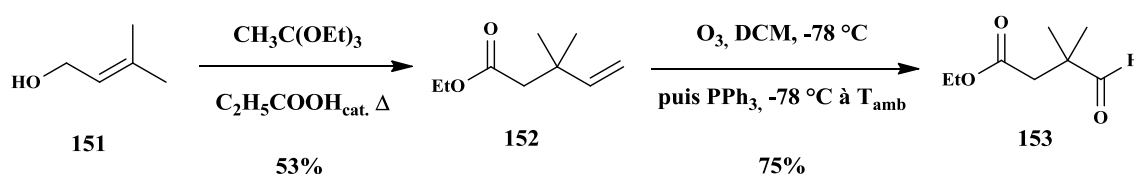


Schéma 55

L'aldéhyde **153** a ensuite été couplé avec l'ylure issu du phosphonium **110** pour donner l'oléfine **154** avec un rendement de 47%. L'aménagement fonctionnel de **154** a été réalisé comme précédemment selon une séquence en 4 étapes qui a permis de fournir l'iodure de phosphonium **155** avec un rendement de 58 %. Le couplage de Wittig final entre l'ylure issu du phosphonium **155** et l'aldéhyde trisnor-squalénique (**59**) a conduit à l'acide **136** avec un rendement modeste de 33%, probablement dû à l'encombrement stérique de l'ylure (**Schéma 56**).

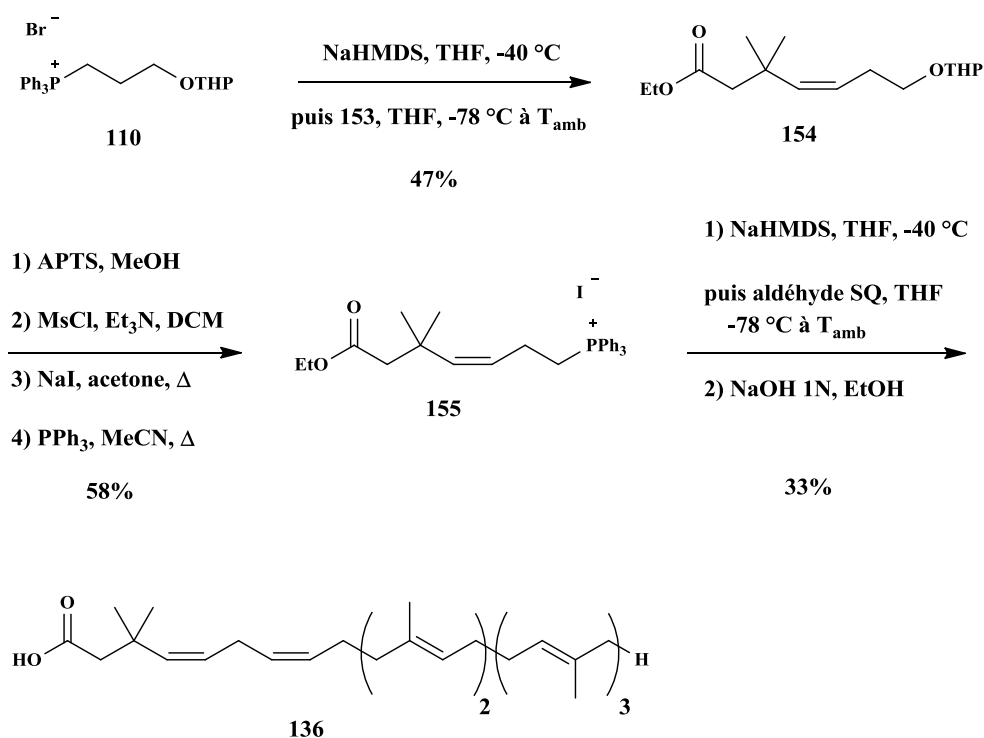


Schéma 56. Synthèse de l'acide DHA-SQ **136**

Synthèse de l'acide 137

Nous nous sommes ensuite tournés vers la préparation de l'acide **137** contenant une fonction ester entre l'unité 1,4-*cis*-pentadiène et la partie squalène. Nous avons pu utiliser les intermédiaires de synthèse **125** et **109** préparés auparavant. L'ylure du phosphonium **125** a été préparé par traitement au NaHMDS à basse température dans le THF, puis couplé au 4-oxobutanoate de méthyle (**109**) pour fournir le diène **156** avec un rendement de 50 %. Le triène **157** issu du couplage oxydatif du phosphonium a également été isolé avec un rendement de 6 % (**Schéma 57**).

L'expérience acquise au Laboratoire nous avait appris que les dérivés du squalène ne survivaient pas aux acides forts tels que l'acide trifluoroacétique. Il était donc vain de saponifier l'ester de méthyle, de coupler le squalénol sur la fonction acide carboxylique et de tenter la déprotection finale de l'ester de *tert*-butyle sur ce substrat. A la place, nous avons préféré saponifier simultanément les deux fonctions ester et tenter une mono-estérification en espérant que la taille du squalène permettrait une sélectivité. L'hydrolyse des deux groupements esters a été réalisée par la soude 1N au reflux de l'éthanol pour donner le diacide symétrique **158** avec un rendement de 98 %.

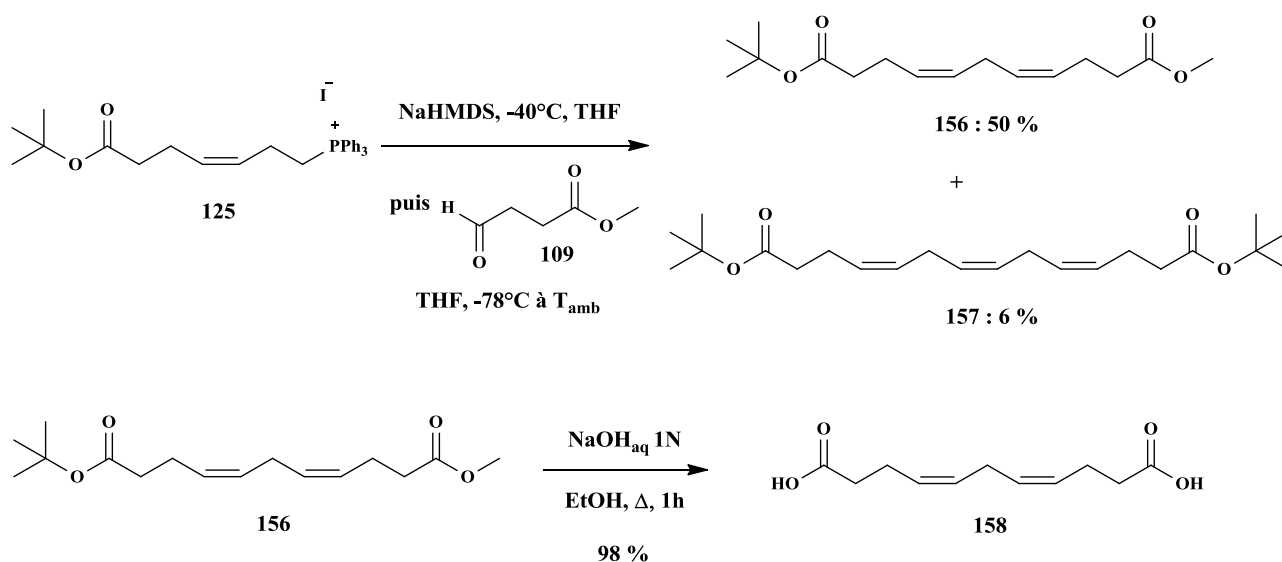


Schéma 57

Nous avons ensuite tenté de mono-estérifier le diacide **158** avec le squalénol (**159**), préparé lui-même par réduction de l'aldéhyde trisnor-squalénique (**59**) à l'aide du borohydrure de sodium. Pour cela, le diacide a été traité par 1 équivalent d'EDCI et 1 équivalent de squalénol (**159**) dans le DCM, pour fournir de manière étonnante un mélange comprenant le diester **160** avec un rendement de 49 % ainsi que le squalénol de départ. Aucune trace du composé monoestérifié n'a pu être isolée. D'autres essais utilisant un défaut de squalénol, ont donné les mêmes résultats (**Schéma 58**).

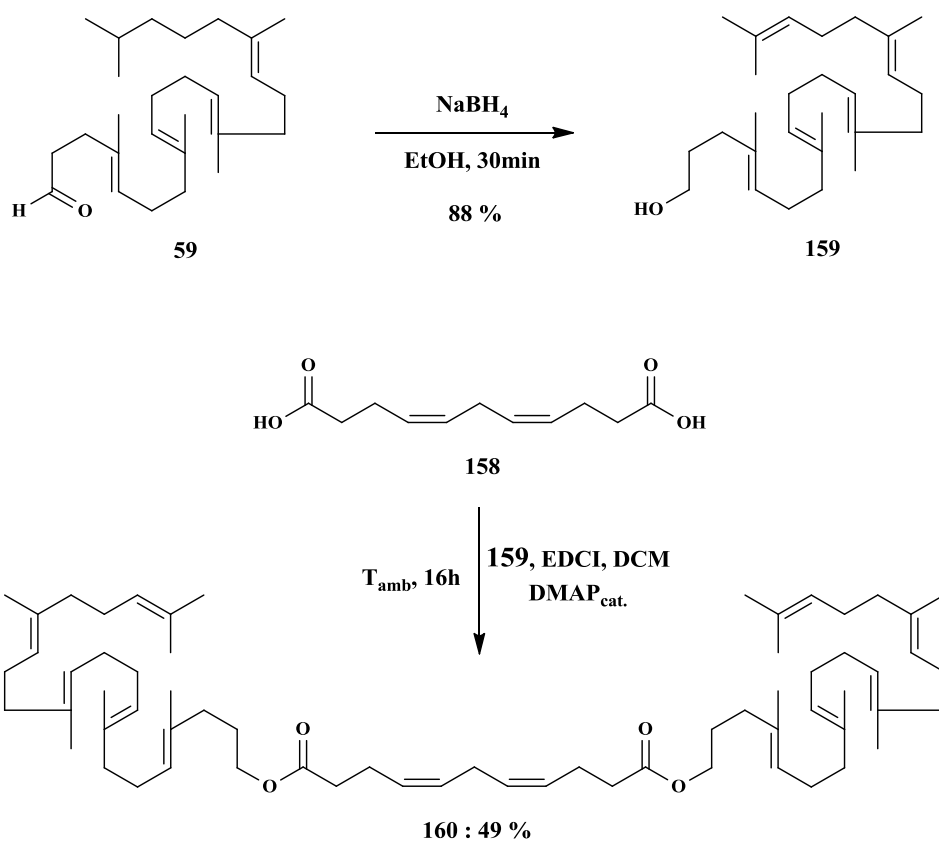


Schéma 58

Les tentatives pour monosaponifier le diester **160** se sont elles aussi soldées par un échec, donnant le diacide **158** accompagné du diester **160** inchangé. Quelle que soit l'origine de ce phénomène, cette voie de synthèse était une impasse. Le problème pouvait être cependant résolu par un choix plus judicieux des groupements protecteurs. Toutefois, nous avons préféré nous engager dans la synthèse des acides **124** et **125** possédant une fonction ester inversée par rapport à **123**, qui semblaient d'un accès plus direct.

Synthèse des acides **138** et **139**

Ces deux acides devaient être accessibles par couplage entre les alcools **161** et **162** et l'acide trisnor-squalénique **13**. Comme précédemment, il fallait adapter les groupes protecteurs de **161** et **162** de manière à être en mesure de démasquer la fonction acide de **138** et **139** pour effectuer le couplage avec le Paclitaxel (Schéma 59).

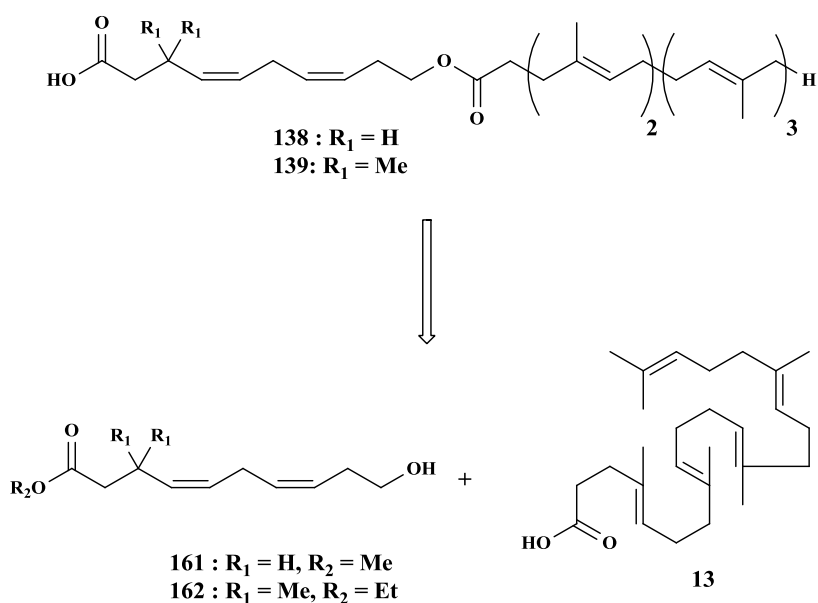


Schéma 59

Le système diénique de **161** et **162** a été établi par réaction de Wittig entre les phosphonium **108b** et **155** précédemment synthétisés et l'aldéhyde **165**, accessible à partir du 1,3-propanediol. Les oléfines **163** et **164** ont été isolées avec des rendements modestes de 22 et 25 % respectivement. Cela s'explique notamment par l'instabilité de l'aldéhyde **165** en milieu basique. Il fallait ensuite envisager une protection efficace permettant de différencier la fonction ester reliant l'unité *cis*-pentadiène à la partie squalène de celle devant être déprotégée sélectivement pour libérer la fonction acide carboxylique nécessaire au couplage avec le Paclitaxel (**85**). Nous avons donc décidé de protéger l'acide carboxylique sous forme d'esters de fluoréneméthyle **165** et **166**, qui peuvent être déprotégés sélectivement par traitement en milieu basique non nucléophile.^{233,234}

Les esters de méthyle et d'éthyle **163** et **164** ont été échangés pour un groupement fluoréneméthyle par saponification et réestérification par le fluorénylméthanol en présence d'EDCI. Enfin, la déprotection des fonctions hydroxyles par traitement à l'acide *para*-toluènesulfonique dans le MeOH a permis d'isoler les alcools **165** et **166** avec des rendements respectifs de 68 et 65 % sur les 3 étapes. Ces alcools ont alors été couplés à l'acide trisnor-squalénique **13** en présence d'EDCI et de 4-DMAP dans le DCM pour former les esters correspondants. Enfin, la fonction acide a été démasquée par traitement des esters de fluoréneméthyle par un excès de triéthylamine dans le DCM sans affecter la seconde fonction ester. Les acides **138** et **139** ont finalement été isolés avec des rendements respectifs de 22 et 51 % (**Schéma 60**).

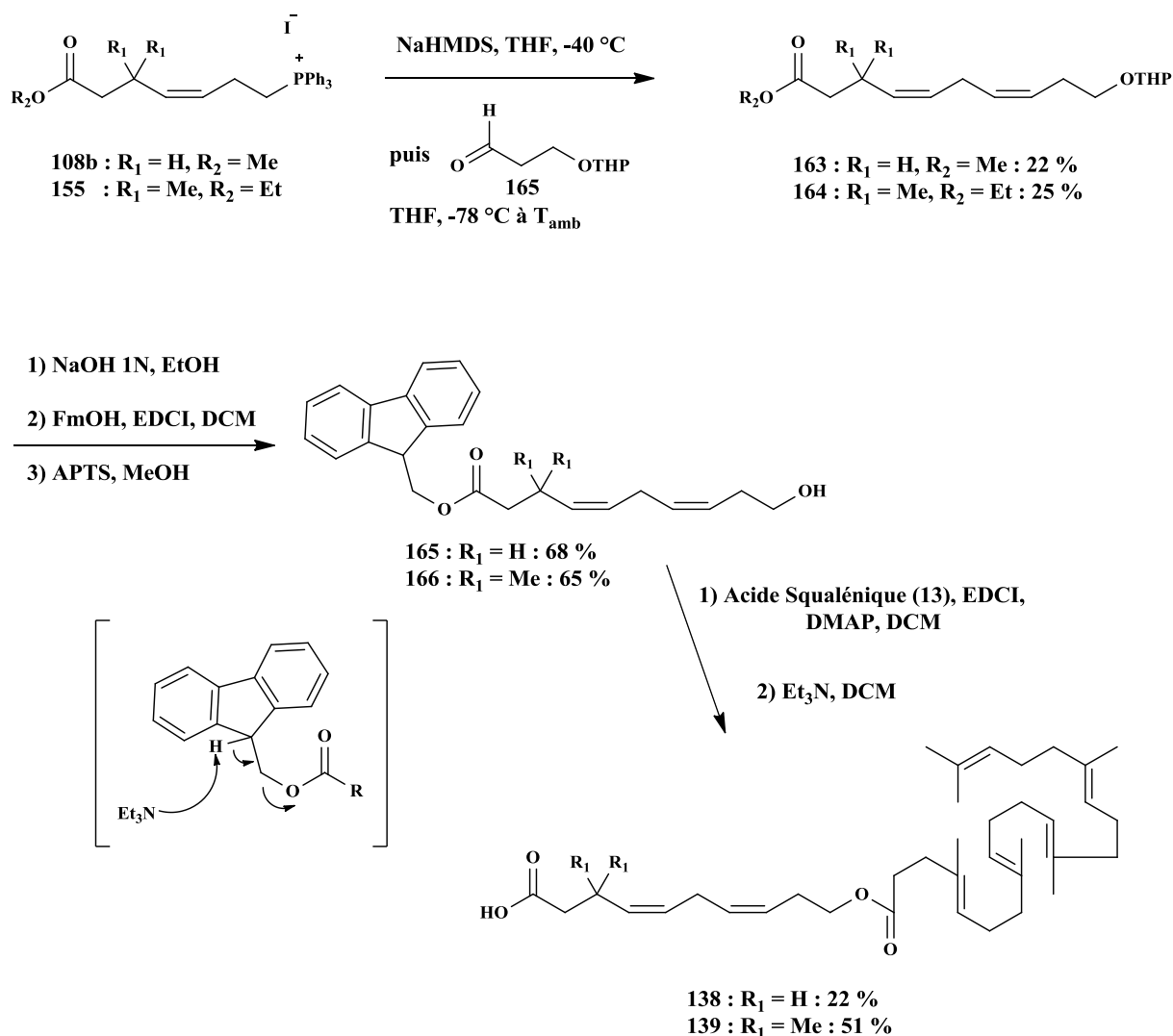


Schéma 60. Synthèse des acides **138** et **139**

Une fois ces différents analogues synthétisés, nous nous sommes tournés vers la préparation d'analogues ne comportant pas d'unité 1,4-*cis*-pentadiène. Les synthèses de ces nouveaux composés permettant de vérifier l'hypothèse d'un rôle crucial de ce motif dans l'étape de métabolisation de la prodrogue.

Synthèse de l'acide **140**

Nous avons élaboré la synthèse d'un acide comportant 2 double liaisons conjuguées à la place de l'unité *cis*-pentadiène. Notre approche met à profit la stéréochimie *cis* du *cis*-1,4-butènediol, disponible dans le commerce pour préparer le phosphonium **167** dont la synthèse a été

décrite par Deslongchamps et coll. en 1987.²³⁵ La monoprotection de **168** par un groupement THP conduit à l'alcool **169** avec un rendement de 53 %. Une fois acquise la différenciation des deux groupes hydroxyméthyles, l'alcool a été transformé en l'ester **172** par synthèse malonique avec un rendement global de 32 %.²³⁵⁻²³⁷ L'iodure de phosphonium **167** a ensuite été synthétisé en 4 étapes à partir du composé **172**. L'alcool protégé est libéré par traitement à l'APTS dans le méthanol, mésylé, et le mésylate obtenu est substitué par un atome d'iode dans les conditions de Finkelstein. L'iodure de phosphonium **167** est finalement obtenu par condensation de la triphénylphosphine sur le composé iodé intermédiaire (**Schéma 61**).²³⁸

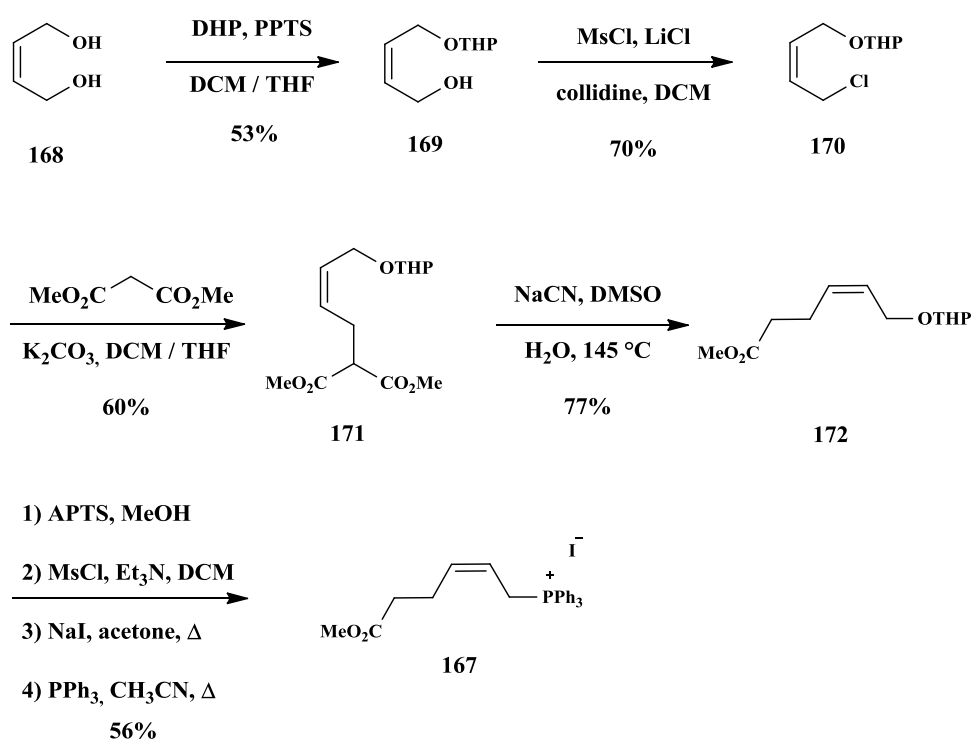


Schéma 61. Synthèse du phosphonium **167** par Deslongchamps.²³⁵

Le système diénique conjugué a été mis en place par une réaction de Wittig. Le phosphonium **167** a été traité par le NaHMDS à basse température puis par l'aldéhyde trisnor-squalénique **59**. L'ester obtenu a été saponifié pour fournir l'acide **140** avec 45 % de rendement. Toutefois, ce composé a été isolé sous forme d'un mélange 55/45 de deux isomères *Z,Z* et *Z,E*, inséparables par simple chromatographie sur colonne, comme l'attestent les expériences d'irradiation en RMN du proton que nous avons effectuées. Ce manque de stéréosélectivité

s'explique par le fait que l'ylure issu du phosphonium **167** est conjugué avec une double liaison (Schéma 62).

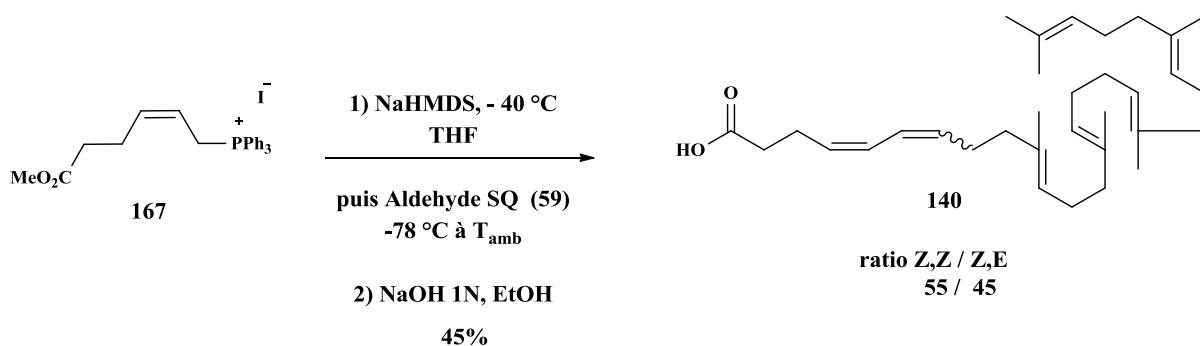


Schéma 62. Synthèse de l'acide 140

Un tel manque de stéréosélectivité dans une réaction de Wittig de ce type a déjà été rapporté dans la Littérature par Naito et coll.²³⁹ ainsi que par Wang et coll.,²⁴⁰ qui ont réalisé des couplages de Wittig à partir d'ylures allyliques engendrés par le NaHMDS ou le NaH (**Schéma 63**).

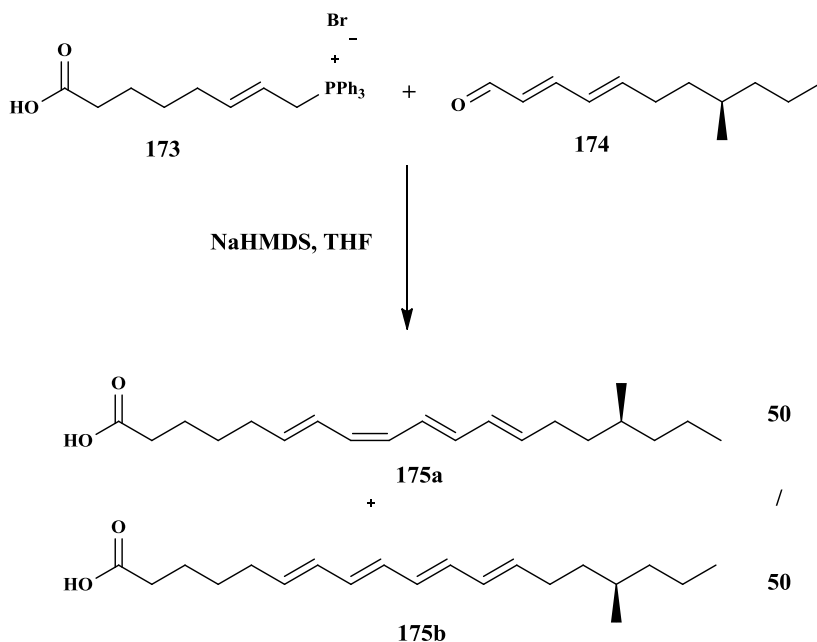


Schéma 63a

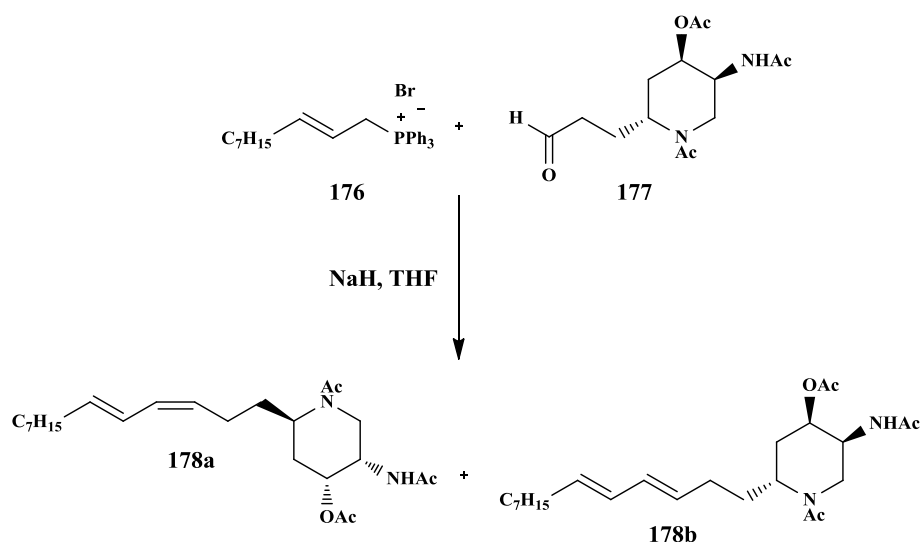


Schéma 63b

Synthèse de l'acide **141**

Enfin, la synthèse de l'acide **141** ne comportant qu'une seule double liaison *cis* en dehors du squalène a été effectuée rapidement en 3 étapes à partir du 7-bromoheptanoate d'éthyle (**179**). Ce dernier a été converti dans un premier temps en phosphonium **180** par traitement à la triphénylphosphine dans l'acétonitrile. L'ylure issu du sel de Wittig **180** a été ensuite préparé par traitement au NaHMDS puis couplé à l'aldéhyde squalénique **59** pour donner l'acide **141** avec un rendement de 35 % (Schéma 64).

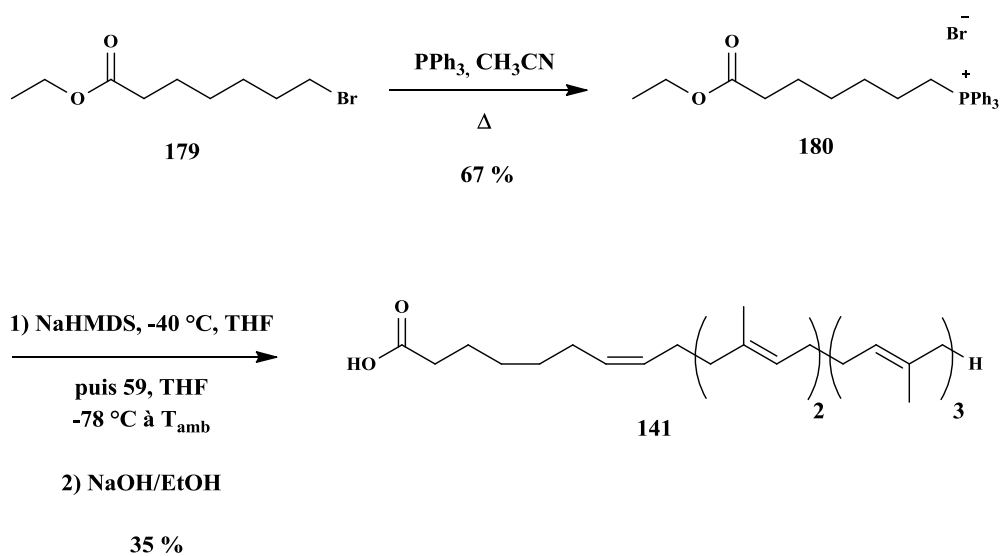


Schéma 64. Synthèse de l'acide **141**

Synthèse des Bioconjugués

Les acides préparés ont ensuite été couplés au Paclitaxel sélectivement en position 2', en utilisant l'EDCI comme agent de couplage ainsi que la 4-DMAP en tant que catalyseur. Les différents conjugués du Paclitaxel ont été obtenus avec de bons rendements allant de 75 à 90% (Schéma 65, Figure 67, Tableau 4).

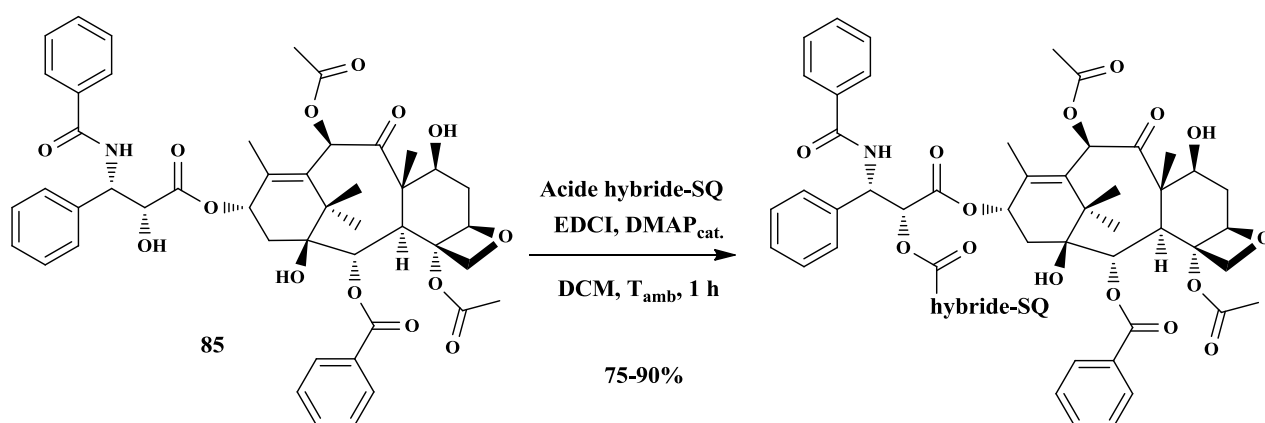


Schéma 65. Synthèse des bioconjugués hybrides squalénisés du Paclitaxel

Acide	Produit de couplage	Rendement
107	106	71 %
135	181	83 %
136	182	80 %
138	183	78 %
139	184	85 %
140	185	86 %
141	186	86 %

Tableau 4. Rendements des différents couplages acide hybride/Paclitaxel

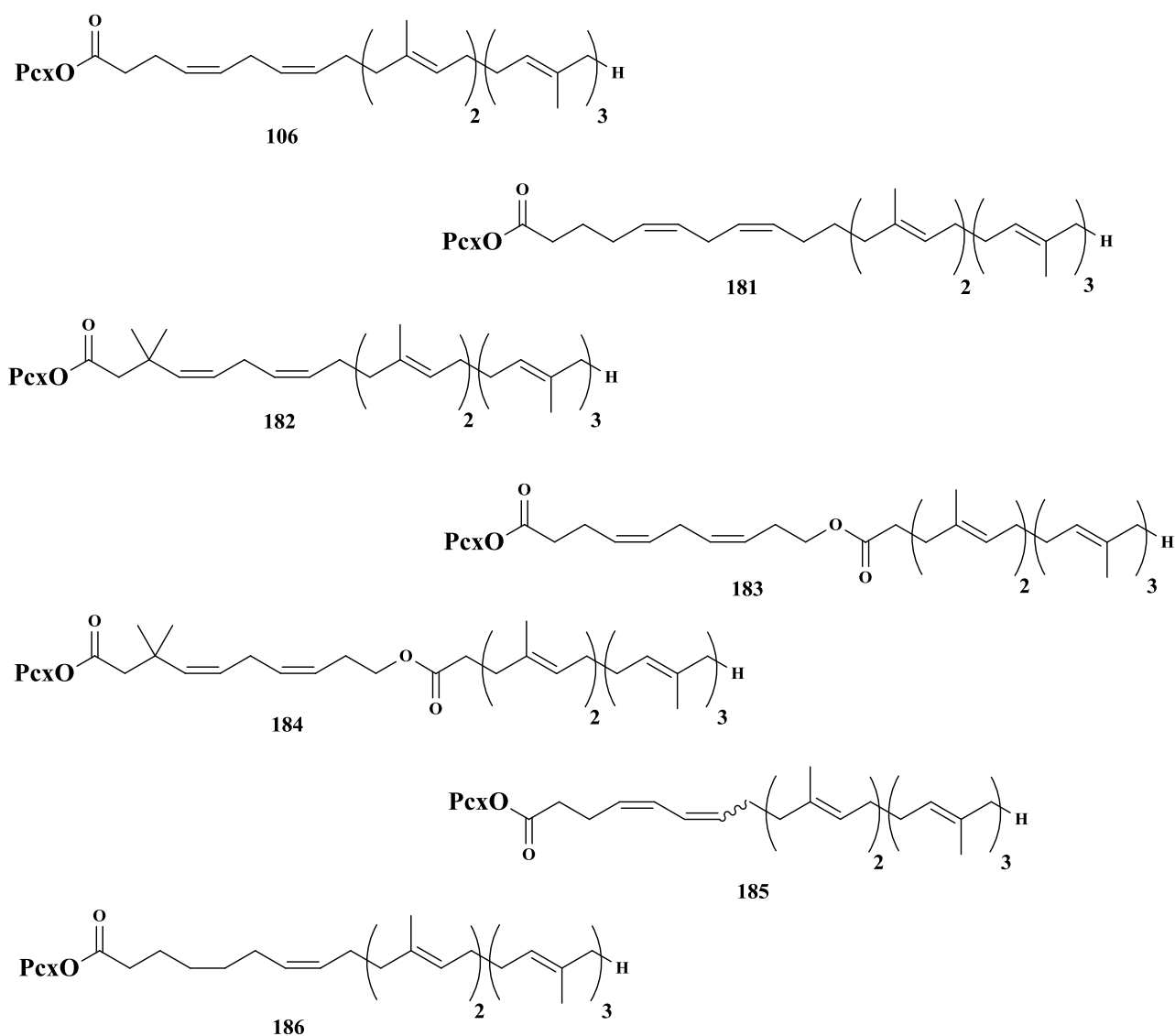


Figure 67. Structures des différents bioconjugués hybrides squalénisés du Paclitaxel

II.2.3.3. Préparation et optimisation de la taille des nanoparticules

Les différents analogues ont été soumis aux conditions de nanopréciipitation. Une solution éthanolique à 2 mg/mL de chaque composé est ajoutée à une solution à 5% de dextrose sous agitation. L'éthanol est alors évaporé sous pression réduite pour donner une suspension laiteuse de nanoparticules. La taille de ces nanoparticules, ainsi que l'indice de polydispersité à la concentration de 1 mg/mL dans l'eau ont été analysés avec un nanosizer Malvern. Le diamètre hydrodynamique varie très peu en fonction de la structure des analogues, allant de 95 à 120 nm. Les

nanoparticules obtenues sont monodisperses, avec des PDI corrects compris entre 0,071 à 0,187 (Tableau 5).

Prodrogue	Taille (nm)	PDI
106	102,8 ± 1,8	0,174 ± 0,024
181	94,1 ± 1,4	0,071 ± 0,018
182	123,1 ± 1,4	0,151 ± 0,011
183	98,7 ± 0,95	0,077 ± 0,010
184	120,3 ± 2,4	0,158 ± 0,017
185	109,9 ± 1,4	0,118 ± 0,017
186	118,6 ± 1,2	0,123 ± 0,024
Pcx-SQ (23)	154,1 ± 0,74	0,187 ± 0,010

Tableau 5. Tailles moyennes et PDI des différentes prodrogues à 1 mg/mL.

Concentration dans l'eau (mg/mL)	Taille moyenne (nm)	PDI
0,6	116,3 ± 0,79	0,171 ± 0,008
1	126,0 ± 0,149	0,149 ± 0,019
2	127,6 ± 2,1	0,136 ± 0,020
3	165,1 ± 0,85	0,099 ± 0,017
4	173,0 ± 0,87	0,081 ± 0,006
5	234,1 ± 3,6	0,096 ± 0,023

Tableau 6. Evolution de la taille des nanoparticules de **106** en fonction de la concentration dans l'eau.

Pour une évaluation biologique *in vivo*, il nous fallait préparer une suspension de nanoparticules à une concentration minimale de 5 mg/mL permettant des administrations à des

doses efficaces, tout en restant en dessous de 200 nm, pour éviter que les nanoparticules soient éliminées par les cellules de Kupfer notamment. Nous avons donc étudié l'évolution de la taille des nanoparticules en fonction de la concentration finale de la suspension dans l'eau. Nous avons choisi comme modèle la prodrogue **106**. Il faut également noter que nous restons à concentration constante de 2 mg/mL dans la solution éthanolique qui est ajouté à l'eau (**Tableau 6, Figure 68**).

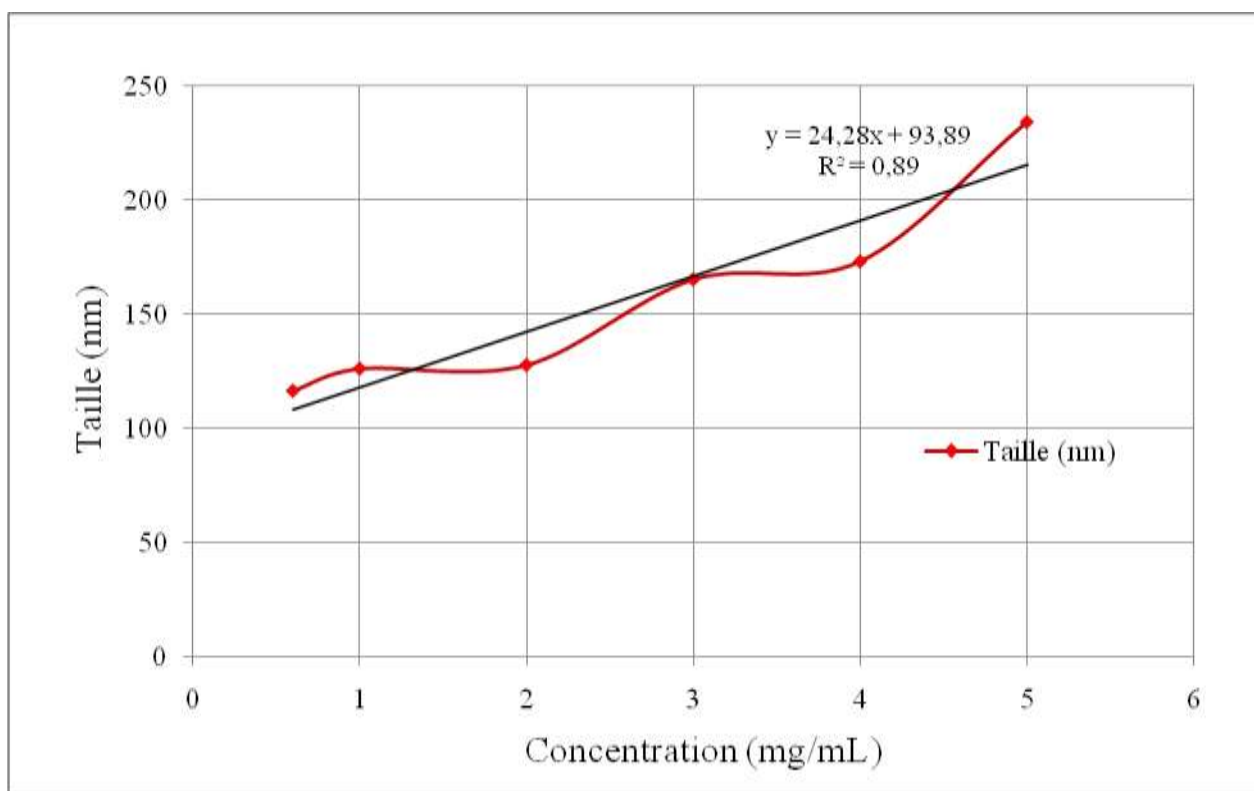


Figure 68. Evolution de la taille des nanoparticules de **106** en fonction de la concentration finale dans l'eau.

Cette étude a montré qu'à concentration égale dans l'éthanol pendant la nanoprécipitation, la taille des nanoparticules augmente en fonction de la concentration dans l'eau. A partir d'une certaine concentration (environ 4,5 mg/mL), le diamètre moyen des nanoparticules excède la valeur de 200 nm.

L'influence de la concentration dans l'éthanol a également été étudiée, en restant à concentration constante dans l'eau à 1 mg/mL. Nous avons effectué cette étude sur **181** qui est la prodrogue la plus prometteuse (voir chapitre sur l'évaluation biologique *in vitro*), en faisant varier la concentration dans l'éthanol de 20 mg/mL à 0,5 mg/mL (**Tableau 7, Figure 69**).

Concentration dans EtOH (mg/mL)	Taille (nm)	PDI
20	135,0 ± 1,07	0,113 ± 0,008
10	105,2 ± 1,23	0,107 ± 0,007
5	87,5 ± 1,14	0,114 ± 0,014
2	68,8 ± 0,76	0,096 ± 0,015
1	139,8 ± 1,85	0,029 ± 0,021
0,5	435,4 ± 8,12	0,036 ± 0,010

Tableau 7. Evolution de la taille des nanoparticules du composé **181** en fonction de la concentration dans l'éthanol.

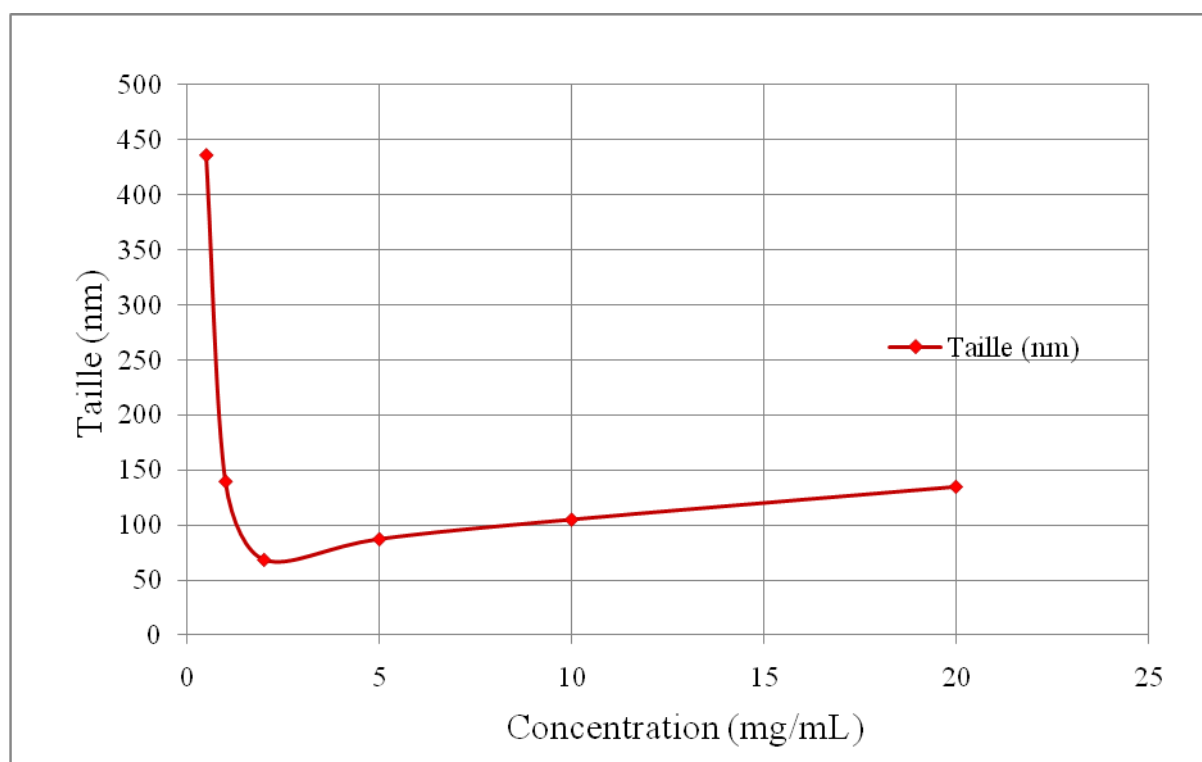


Figure 69. Evolution de la taille des nanoparticules du bioconjugué **181** en fonction de la concentration dans l'éthanol.

Sur la gamme allant de 2 à 20 mg/mL, la taille des nanoparticules s'accroît légèrement en même temps que cette concentration augmente, avec une taille moyenne allant de 69 à 135 nm. En

revanche, la taille des nanoparticules augmente brusquement lorsque l'on passe de 2 mg/mL à 0,5 mg/mL. Cette différence d'évolution de la taille des nanoparticules en fonction de la concentration initiale dans l'éthanol peut s'expliquer très simplement. Avec un faible volume d'éthanol ajouté, la formation des nanoparticules intervient immédiatement lors de l'addition dans l'eau, tandis qu'avec un volume d'éthanol important par rapport au volume d'eau, les nanoparticules se forment plutôt lors de l'évaporation de l'éthanol, et donc par des procédés différents. Pour conserver une taille inférieure à 200 nm, il nous fallait opérer à forte concentration dans la phase organique.

Pour vérifier cette théorie, des nanoparticules de la prodrogue **169** ont été préparées à une concentration finale de 5 mg/mL dans une solution de dextrose à 5 %, à partir d'une solution initiale éthanolique à 10 mg/mL. Des nanoparticules de diamètre moyen de 142 nm avec un PDI de 0,073, parfaitement adaptées à une administration chez l'animal, ont été obtenues (**Figure 70**).

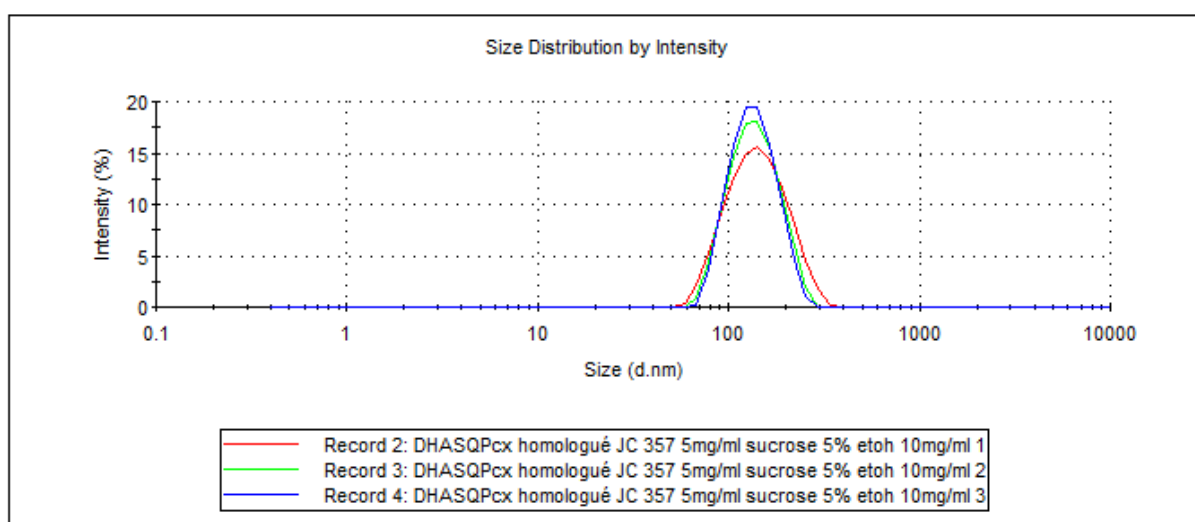


Figure 70. Distribution de la taille des nanoparticules du bioconjugué **181** en fonction de l'intensité, à 5 mg/mL dans une solution à 5 % de dextrose.

II.2.3.4. Caractérisation des nanoparticules

Les suspensions nanoparticulaires à 5 mg/mL des composés **106** et **181** obtenues dans ces nouvelles conditions, ont été observées par MET, en utilisant l'acide phosphotungstique comme agent de contraste. Les clichés obtenus nous permettent de vérifier qu'il s'agit de particules sphériques d'une taille moyenne allant d'environ 100 à 200 nm (**Figures 71 et 72**).

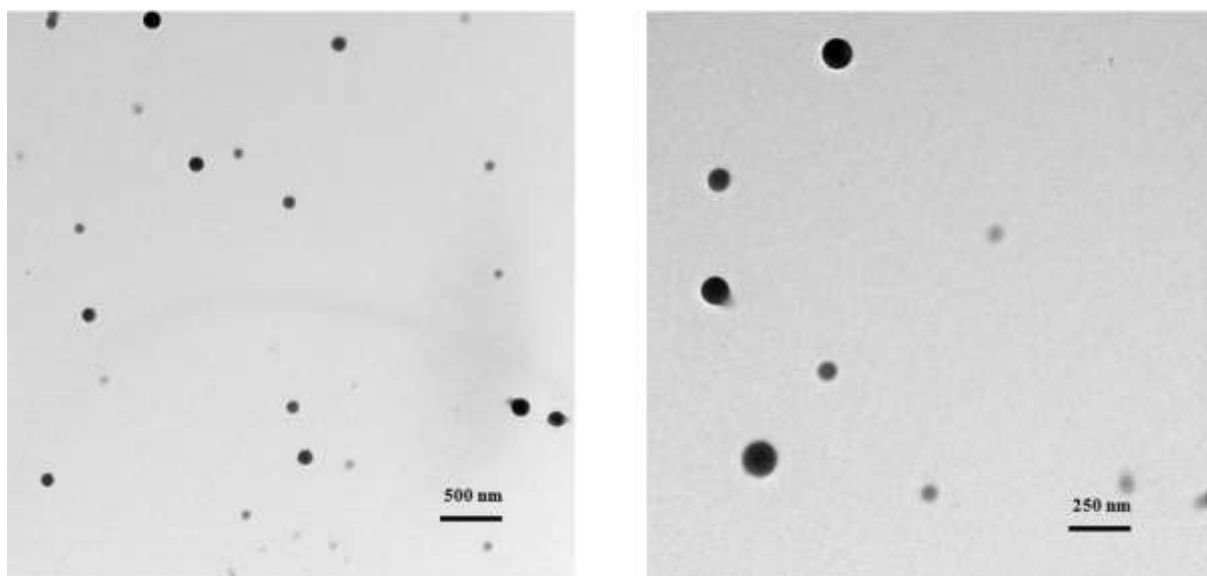


Figure 71. Sélection d'images de MET des nanoparticules du conjugué **106** à 5 mg/mL.

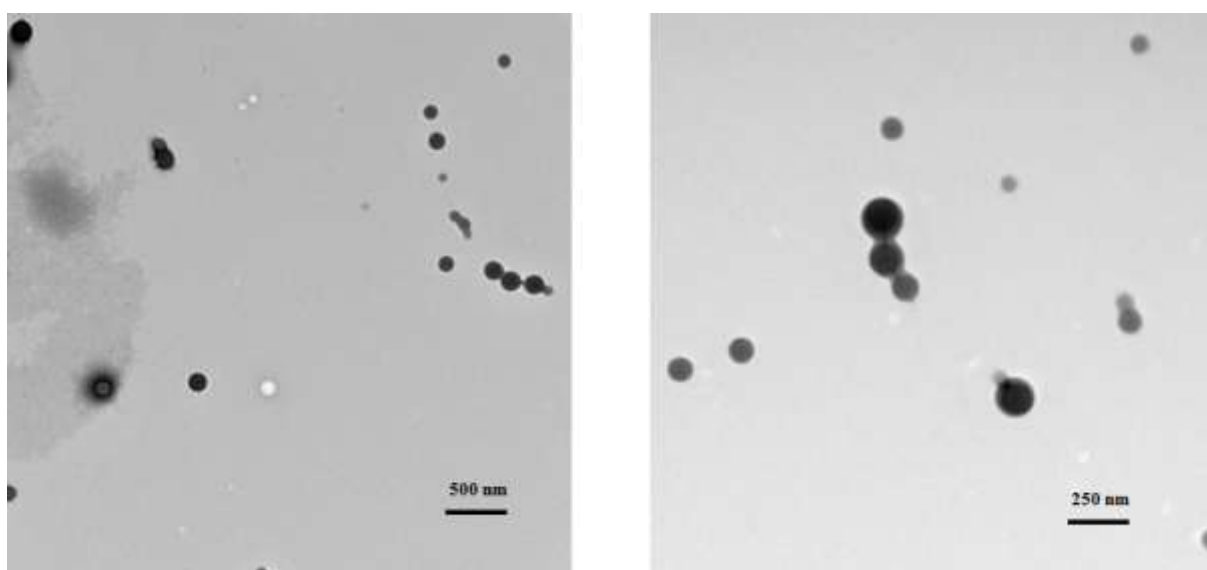


Figure 72. Sélection d'images de MET des nanoparticules du conjugué **181** à 5 mg/mL.

Afin d'obtenir plus d'information quant à la structure supramoléculaire de ces nanoparticules, celles du composé **181** ont été observées après congélation dans l'éthane liquide (CryoMET). Cependant ces nouveaux clichés ne révèlent que des sphères homogènes sans structure interne apparente, à l'exception du dernier qui montre un cœur dense entouré d'une couronne plus claire (**Figure 73**).

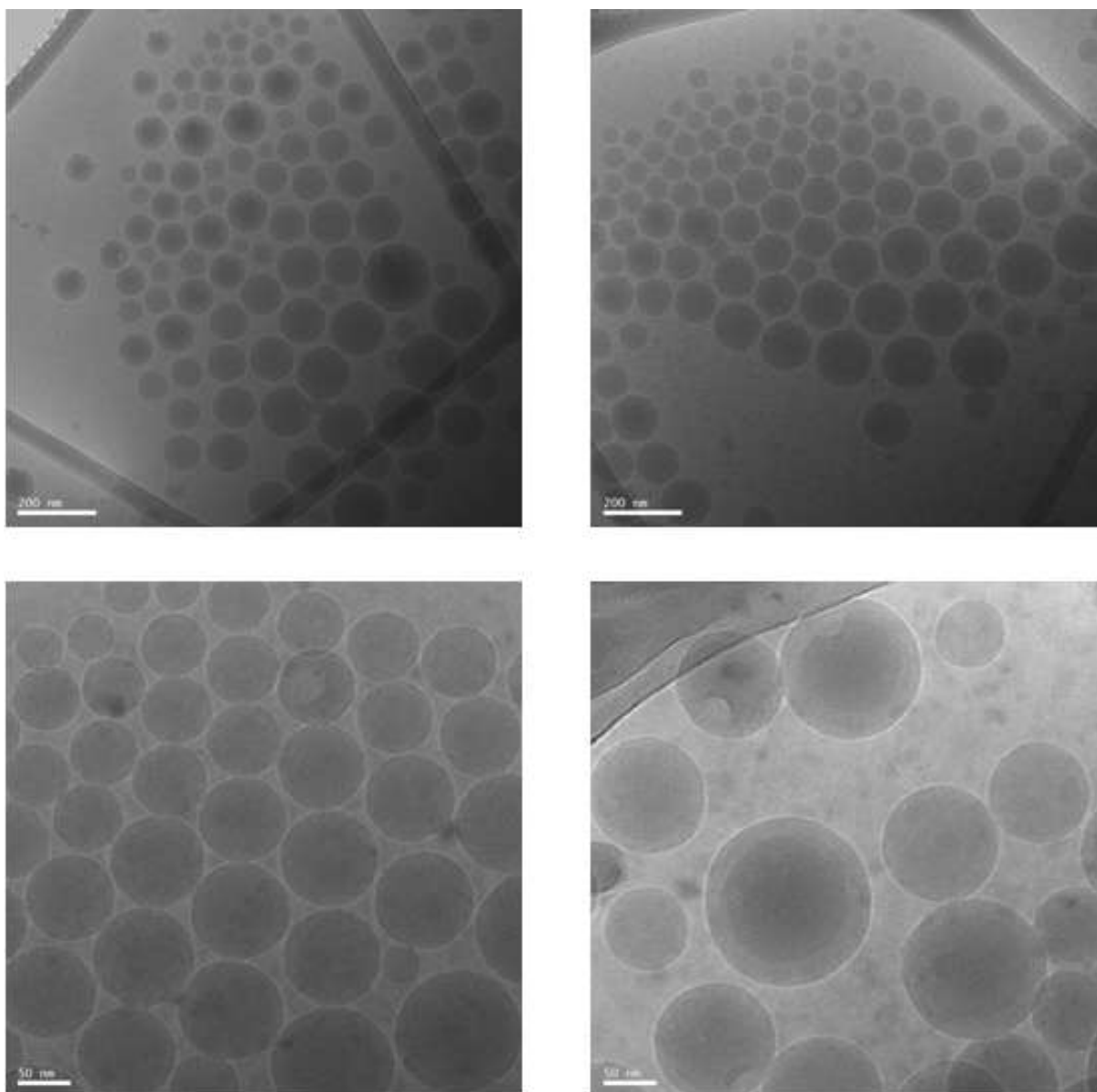


Figure 73. Sélection d'images de CryoMET des nanoparticules du bioconjugué **181** à 2,5 mg/mL.

II.2.3.5. Evaluation biologique in vitro des prodrogues

Les activités anticancéreuses des suspensions nanoparticulaires des prodrogues ont été évaluées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires de cancers humains, en comparaison avec le Paclitaxel (**73**) et les nanoparticules de Paclitaxel-squalène (**23**). Dans tous les cas, le Paclitaxel reste le composé le plus efficace avec des CI_{50} de l'ordre du nanomolaire allant de 4 à 12 nM, sauf dans le cas de la lignée résistante du cancer du sein MCF-7 MDR où la CI_{50} est de 2,2 μ M. Les

résultats sur la lignée cellulaire du carcinome du poumon A549 sont plus intéressants. En effet, même si les CI_{50} sont proches du micromolaire, les prodrogues **183** et **181** affichent des CI_{50} de 0,8 et 0,62 μM respectivement, contre 2,7 μM pour le Paclitaxel-squalène (**23**). Ainsi, l'homologation de la chaîne lipophile et l'insertion d'une fonction ester sur cette chaîne permettent d'augmenter considérablement l'activité anticancéreuse *in vitro*. Cet effet bénéfique se retrouve presque sur toutes les lignées puisque les prodrogues **183** et **181** possèdent une meilleure activité que le Paclitaxel-squalène sur HT-29, MCF-7 et KB 3.1. La prodrogue **185**, qui comporte deux doubles liaisons conjuguées au lieu d'une unité 1,4-*cis*-pentadiène, possède des activités intéressantes, notamment sur les lignées Hep G2 (carcinome du foie), KB 3.1 (carcinome épithélial) et Mia PaCa-2 (carcinome du pancréas), avec des CI_{50} inférieures à celle du Paclitaxel-squalène (**23**) et du même ordre de grandeur, voire inférieures à celles des prodrogues **183** et **181**. Ce résultat est plus surprenant et conduit à penser que le motif 1,4-*cis*-pentadiène n'est pas un élément crucial et qu'il peut être remplacé par une autre structure insaturée. Le fait que nous ayons testé un mélange d'isomères (Z,Z)/(Z,E) ne nous permet cependant pas d'apprécier complètement l'influence de la stéréochimie sur l'activité biologique. Néanmoins la présence d'une seule double liaison (composé **186**), sur l'espaceur entre le squalène et le Paclitaxel, entraîne une chute considérable de l'activité sur toutes les lignées testées. Enfin, l'insertion du groupement gemdiméthyle en α de la fonction ester (prodrogue **182** et **184**) permet d'améliorer l'activité, en comparaison avec la prodrogue **106**, sur les lignées A549, HepG2 et HT-29 (adénocarcinome colorectal) (**Tableau 8**).

Ainsi, les prodrogues **181** et **183** se détachent des autres, se révélant légèrement plus actives que le Paclitaxel-squalène (**23**). Sur une souche résistante (MCF-7 MDR), nous n'observons aucune amélioration, ce qui semble indiquer que ces prodrogues ne contournent pas les pompes d'efflux activées dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats ne nous permet pas de conclure quant au mécanisme par lequel le Paclitaxel est libéré de la prodrogue. Une hypothèse serait que les lipoxygénases (LOXs) pourraient être impliquées dans ces phénomènes par peroxydation de la position 4.²⁴¹ Il a en effet été montré que les lipides polyinsaturés comme le DHA par exemple étaient substrats d'une variété de LOXs qui peroxydent les positions 14, 20 et 7 mais aussi 4. Dès lors, si ce type de prodrogue est aussi substrat de ces enzymes, nous ne pouvons exclure que le Paclitaxel soit relargué par lactonisation selon le mécanisme décrit dans le **Schéma 66**.

IC 50 (μM)	A549	Hep G2	HT-29	MCF-7 MDR	MCF-7 wt	KB 3.1	Mia PaCa-2
Pcx (85)	0,012	0,12	0,044	2,2	0,022	0,004	0,047
Pcx SQ (23)	2,7	3	0,72	-	1,75	0,71	0,45
106	11,6	27	6,4	-	3	8,5	2,35
181	0,62	-	0,53	44	1,75	0,36	0,62
182	1,9	43	1,7	-	-	0,76	0,77
183	0,8	6,2	0,78	-	0,76	0,56	0,63
184	4,7	-	4,4	-	6,7	1,9	28
185	1,5	2,2	0,53	-	1,33	0,58	0,89
186	38	-	8,6	-	10,1	8	31

Tableau 8. Activité anticancéreuse *in vitro* du Paclitaxel, du Paclitaxel-squalène et des prodrogues hybrides squalénisés du Paclitaxel sur différentes lignées cellulaires humaines.

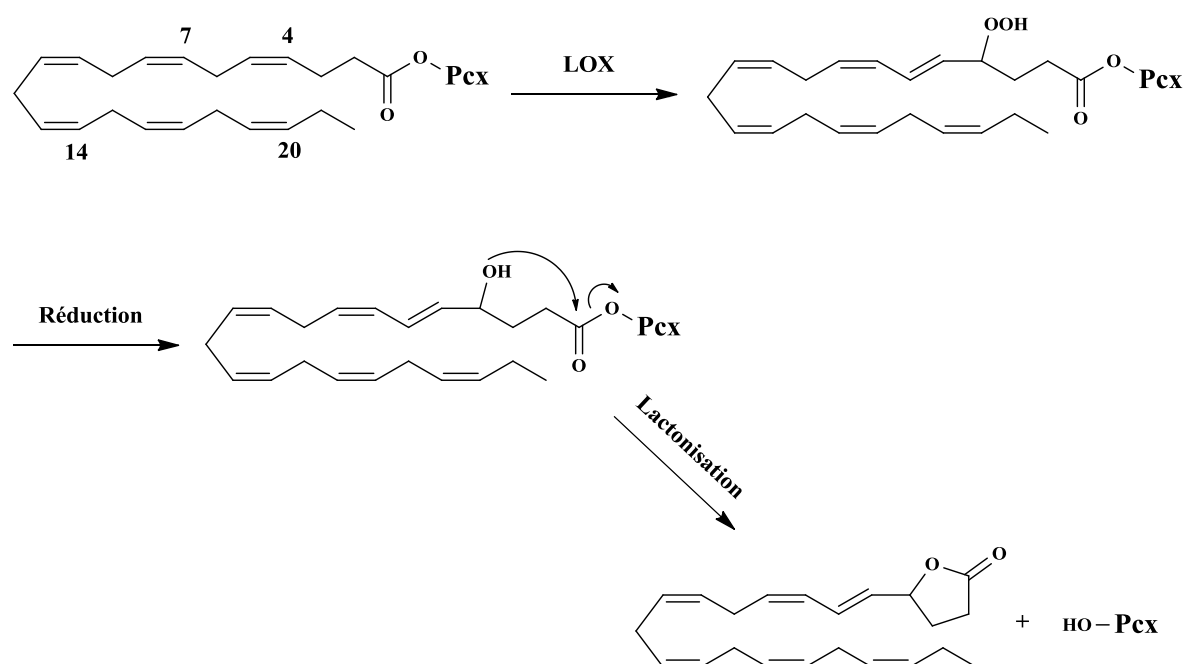


Schéma 66

Un tel mécanisme expliquerait la faible activité de la prodrogue **186** ne possédant qu'une double liaison, mais en revanche ne s'accorde pas avec la bonne activité du diène conjugué **185**. Enfin, cette hypothèse s'accorde mal avec le faible gain d'activité observé avec nos nouvelles prodrogues par rapport au Paclitaxel-squalène (**23**) qui ne peut pas être substrat des LOXs. Par conséquent, il est probable que les résultats obtenus s'expliquent plus simplement par un effet conformationnel autour de l'hydroxyle en position 2' favorisant l'hydrolyse directe (les esters en position 2' sont très labiles et peuvent être méthanolysés sans aucune catalyse par exemple) ou catalysée par les estérases cellulaires.

II.2.4. Conclusion et Perspectives

Afin d'améliorer l'activité anticancéreuse *in vivo* du Paclitaxel et du Paclitaxel-squalène, nous avons synthétisé plusieurs prodrogues originales par couplage en position 2' d'acides à longues chaînes comportant une partie squalène et un segment 1,4-*cis*-pentadiène, motif présent dans l'acide docosahexaénoïque. Ces différentes prodrogues ont été obtenues par couplage entre les différents acides et le Paclitaxel avec de très bons rendements allant de 75 à 90 %. Les acides squaléniques hybrides ont été obtenus simplement en environ 10 étapes à partir de composés commerciaux bon marché, incluant des réactions de Wittig permettant l'accès à des doubles liaisons *cis*.

Les différents dérivés ont été soumis aux conditions de nanoprécipitation, pour former des nanoparticules d'environ 100 à 150 nm de diamètre. L'influence de la concentration dans l'eau ainsi que dans la solution éthanolique a été étudiée, afin de contrôler la taille des nanoparticules. Il a été montré notamment pour le composé **106**, que le diamètre moyen des nanoparticules variait en fonction de la concentration dans l'eau et que nous pouvions moduler la taille de ces nanoparticules en accroissant le volume d'éthanol utilisé. Nous avons pu préparer des nanoparticules du composé **181** avec un diamètre moyen inférieur à 200 nm à une concentration de 5 mg/mL, permettant une administration à dose thérapeutique chez la Souris par voie i.v..

In vitro les prodrogues hybrides **181**, **183** et **185** ont montré des niveaux d'activité supérieurs au Paclitaxel-squalène même si l'ensemble reste très en deça de l'activité du Paclitaxel libre. Nous avons pu montrer que la lignée A549 était particulièrement sensible à ces prodrogues.

L'évaluation *in vivo* sur la Souris porteuse de tumeur expérimentale A549 est actuellement réalisée au Laboratoire par Andrey Maksimenko. En fonction des résultats obtenus, de nombreuses études complémentaires pourront être engagées comme par exemple la détermination de la vitesse de libération du Paclitaxel dans le sérum humain ou différents milieux de culture cellulaire complémentés, afin de mieux comprendre le profil pharmacocinétique de ces prodrogues. Si cette stratégie s'avérait être fructueuse, elle pourrait également être étendue au Docétaxel.

II.3. Squalénisation du Cisplatine

II.3.1. Introduction

II.3.1.1. Le Cisplatine

Le Cisplatine (*cis*-diamminedichloroplatine (II), Cisplatyl®) est un agent alkylant dérivé du platine, inhibant la synthèse de l'ADN par formation de ponts inter- et intracaténaux, doté d'une puissante action anticancéreuse sur un grand nombre de tumeurs. Il est indiqué dans le traitement des cancers du testicule, de l'ovaire, de l'utérus, de la sphère ORL, des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage, de l'estomac, de l'endomètre, de l'anus, de la vessie et aussi dans les cancers épidermoïdes. Ces nombreuses indications en font un agent majeur de la chimiothérapie des tumeurs solides.

Depuis la découverte de son activité anticancéreuse il y a 40 ans, de nombreuses études concernant son mécanisme d'action ont été menées.²⁴²⁻²⁴⁶ Le Cisplatine est activé préalablement au niveau intracellulaire par aquation d'un des deux ions chlorure, pour former un complexe métallique comportant une molécule d'eau à la place du chlore (**Schéma 67**).²⁴⁷

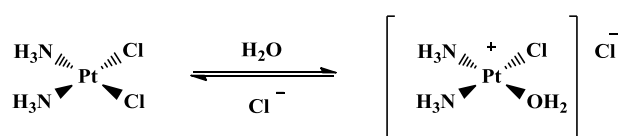


Schéma 67

Une fois dans le noyau, ce complexe réagit avec les bases purines. En particulier, il forme des liaisons covalentes avec l'azote N-7 de la guanine ou de l'adénine, menant à des adduits mono- ou bi-fonctionnels (**Figure 74**).²⁴⁸

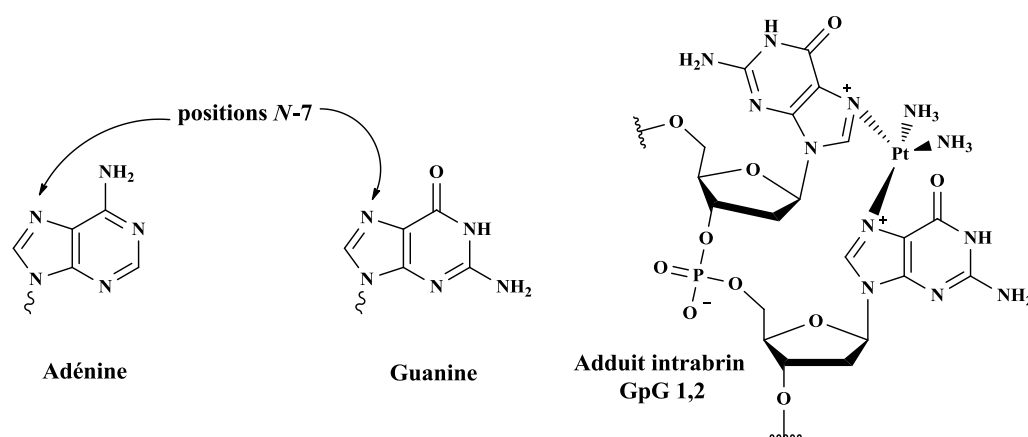


Figure 74

La formation d'adduits bi-fonctionnels a lieu généralement sur deux bases purines adjacentes du même brin d'ADN. Ces entités sont appelées adduits intrabrins GpG 1,2 (60 à 65 % du nombre total d'adduits) et ApG 1,2 (20 à 25 %). Plus rarement, des adduits intrabrins, appelés adduits GpXpG 1,3 (2 %), peuvent se former sur deux guanines non adjacentes, séparées par une base purine ou pyrimidique. Il peut également se former des adduits monofonctionnels sur les guanines (environ 2 %). Enfin, environ 2 % des adduits formés impliquent deux guanines appartenant à deux brins d'ADN opposés. Ils sont appelés adduits interbrins G-G. Les structures de certains de ces adduits Platine-ADN ont été élucidées par cristallographie²⁴⁹ (**Figure 75**) ou en solution par RMN.^{250,251}

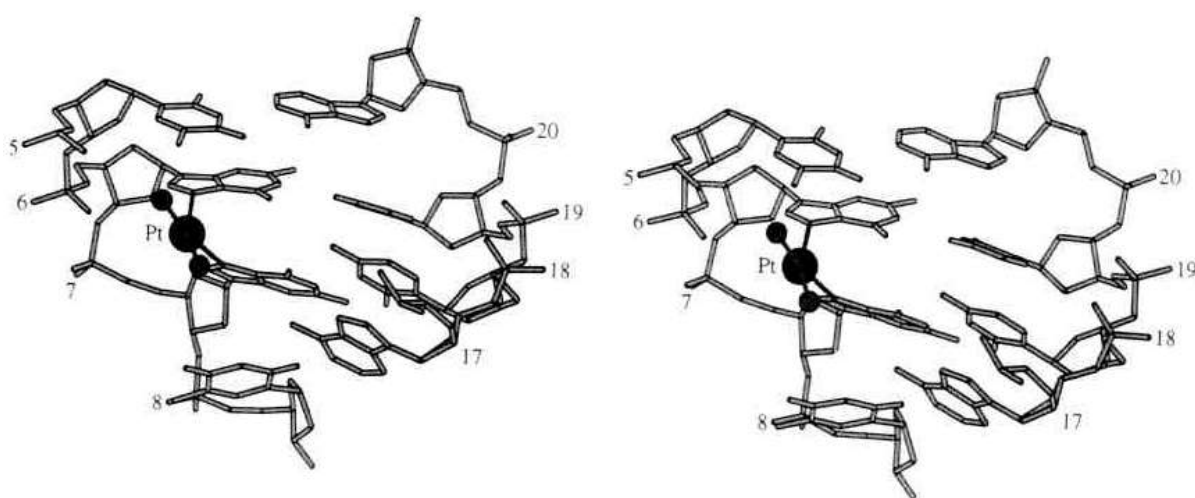


Figure75. Image stéréoscopique du site d'alkylation G-G intrabrain du platine. Les paires de bases sont enroulées en hélice mais conservent les liaisons hydrogènes entre les bases azotées.²⁴⁹

La formation de ces différents adduits platine-ADN bloque la réplication de l'ADN, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort cellulaire programmée. Toutefois elle active aussi la reconnaissance et la réparation des dommages de la chaîne ADN.

Même si le Cisplatine est un médicament anticancéreux efficace prescrit aux patients atteints de cancer des testicules ou de l'ovaire, de nombreux effets secondaires rendent le traitement difficile. Plus de 90 % des patients souffrent de nausées et de vomissements sévères. Des troubles dus à une néphrotoxicité et une ototoxicité surviennent avec un effet cumulatif. Pour réduire la toxicité rénale, une préhydratation doit être effectuée chez les patients. Ce traitement provoque fréquemment une myélodépression et plus particulièrement des thrombopénies, accompagnées d'une diminution du nombre de plaquettes dans le sang. La chimiothérapie à base de Cisplatine nécessite donc l'association systématique d'antiémétiques, ainsi qu'une surveillance stricte de la fonction rénale et l'administration de grande quantité d'eau avec le traitement.

De nombreux mécanismes moléculaires de résistance au Cisplatine ont émergé, diminuant largement son efficacité. Il faut distinguer les phénomènes de résistance intervenant avant la formation des adduits platine-ADN, de ceux qui ont lieu après.

Le Cisplatine est une molécule très polaire qui pénètre dans les cellules relativement lentement soit via des transporteurs du cuivre (CTR1)²⁵² soit par diffusion passive à travers les membranes.²⁵³ L'administration de cuivre ou de platine aux concentrations utilisées en clinique cause un dérèglement rapide de l'expression des transporteurs CTR1, dû à leur internalisation dans la membrane plasmique par macropinocytose, suivi d'une dégradation.²⁵⁴ La perte de ces transporteurs induit une résistance au Cisplatine.²⁵⁵

Le Cisplatine peut être désactivé au niveau intracellulaire par le glutathion, qui comporte une cystéine, ou la métallothionéine, une protéine riche en acides aminés soufrés comme la cystéine et la méthionine (**Figure 76**). Les atomes de soufre forment des liaisons avec le platine, qui ne peut alors plus se lier aux bases purines de l'ADN.²⁴⁷ Dans certaines cellules cancéreuses murines ou humaines, la surexpression de ces molécules et protéines riches en soufre provoque un phénomène de résistance.²⁵⁶

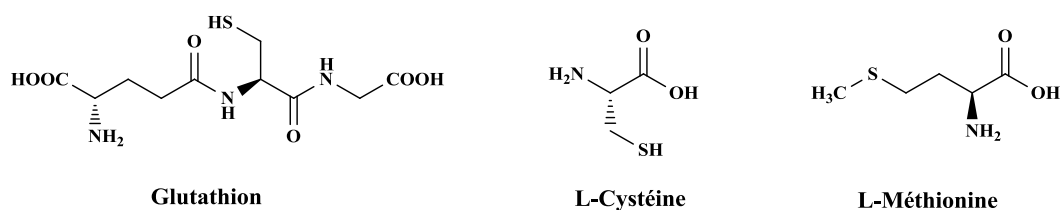


Figure 76

Les cellules cancéreuses développent également des mécanismes de réparation des lésions dues à la formation d'adduits platine-ADN. Les cellules peuvent en effet éviter l'apoptose en réparant l'ADN ou en éliminant ces adduits. Enfin, l'efflux du platine des cellules via les exporteurs ATP7A et ATP7B contribue à la résistance aux médicaments à base de platine.²⁵⁷

II.3.1.2. Nouveaux complexes du platine

Dans le but de contourner ces résistances et d'éviter les nombreux effets indésirables dus au Cisplatine, de nouveaux complexes du platine ont été proposés. Le développement du Carboplatine (Carboplatine®) (**Figure 77**) est basé sur l'hypothèse qu'un groupement labile plus stable que l'ion chlorure devrait engendrer moins de toxicité sans affecter l'efficacité anticancéreuse.²⁵⁸ Ce complexe provoque notamment 15 à 20 % de néphrotoxicité en moins par rapport au Cisplatine et est également moins toxique pour les systèmes nerveux et gastrointestinal ainsi que l'appareil auditif. Cependant, la myélotoxicité et plus particulièrement la thrombopénie est plus marquée qu'avec le Cisplatine. Les mêmes adduits platine-ADN sont formés avec le Carboplatine qu'avec le Cisplatine, mais la présence du cyclobutylmalonato plus stable que les chlorures requiert des concentrations 20 à 40 fois supérieures pour une efficacité similaire.²⁵⁹ Les nombreux essais cliniques ont mis en évidence des taux de survie équivalents pour le Carboplatine et le Cisplatine chez des patientes atteintes du cancer de l'ovaire.²⁶⁰ Ce dérivé est indiqué en première intention dans le cancer épithélial de l'ovaire et également dans le cancer du poumon à grandes cellules en association avec le Paclitaxel.

Depuis la commercialisation du Cisplatine et du Carboplatine, le développement de nouveaux composés anticancéreux dérivés du platine a connu un essor considérable.

L'Oxaliplatine est le troisième organoplatine à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il possède un spectre d'activité anticancéreuse plus large que les 2 premiers complexes. Ce

composé porte un ligand (*R,R*)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane et un oxalate à la place des ions chlorure, et est par conséquent plus lipophile que le Cisplatine et le Carboplatine.²⁶¹ Il est actif sur des cellules cancéreuses qui développent des résistances au Cisplatine.^{262,263} Les premiers tests cliniques n'ont pourtant révélé qu'une activité modeste chez les patients atteints de cancer colorectal,²⁶⁴ mais une activité plus prometteuse en association avec le 5-FU et l'acide folinique.²⁶⁵ Les essais cliniques qui ont suivi ont permis de démontrer une activité significative contre le cancer du colon métastatique, en association avec la combinaison 5-FU/acide folinique.^{266,267}

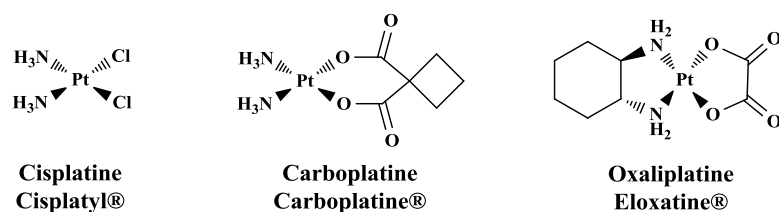


Figure 77

D'autres dérivés du platine (II) comme le Picoplatine, le Nédaplatine ou encore le Lobaplatine sont très prometteurs.²⁶⁸

Le Picoplatine a été conçu avec un ligand azoté encombré autour de l'ion de platine, dans le but de réduire l'inactivation par les espèces soufrées comme le glutathion et la métallothionéine. Ce complexe montre des activités significatives *in vitro* sur des lignées résistantes au Cisplatine et à l'Oxaliplatine.^{269,270} Son activité *in vivo* est également intéressante, par voie orale intraveineuse, tant en monothérapie qu'en combinaison avec le Paclitaxel.^{271,272} Les études cliniques de phase I et II se sont avérées positives sur le cancer du poumon résistant au Cisplatine et sur le cancer de l'ovaire sensible aux dérivés du platine.²⁷³ Différentes études cliniques de phase III sont actuellement en cours. Elles concernent le traitement du cancer du poumon à petites cellules en monothérapie, mais également le cancer de la prostate en association avec le Docétaxel et le cancer colorectal en association avec le 5-FU et l'acide folinique.

Le Nédaplatine (*cis*-diammine-glycolatoplatine (II)) est un dérivé du platine avec une structure très proche du Cisplatine. Ce composé est prescrit uniquement au Japon, pour le traitement de cancers du testicule ou de l'œsophage,²⁷⁴ seul ou en association avec le 5-FU.²⁷⁵ De nombreux essais cliniques de phase II sont en cours. Le Lobaplatine, quant à lui, est un mélange de deux diastéréoisomères d'un lactate du platine (II), portant un ligand stable 1,2-*trans*-

bis(aminométhyl)cyclobutane. Les études cliniques de phase II ont révélé des activités significatives sur différents types de cancer.²⁷⁶ Des études cliniques sont menées actuellement sur les carcinomes du foie et de l'œsophage, bien qu'il soit déjà prescrit en clinique en Chine (**Figure 78**).

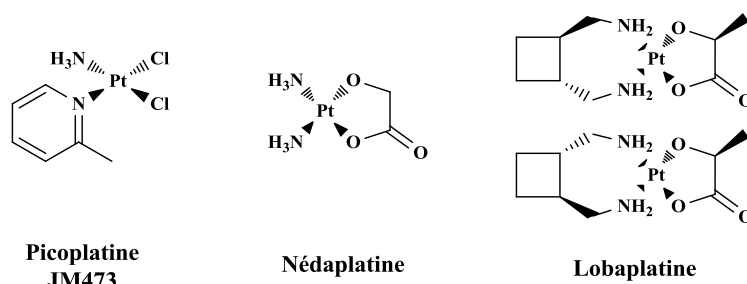
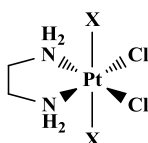


Figure 78

Les complexes du Platine (IV) constituent une importante famille d'analogues du Cisplatine. Leur état d'oxydation diminue en effet leur réactivité avant de pénétrer dans les cellules, réduisant la perte en principe actif ainsi que les réactions non désirées qui provoquent des effets secondaires toxiques. Le caractère lipophile de certains complexes du platine (IV) permet également d'améliorer leur pénétration cellulaire.

La réduction du platine (IV) en complexes du platine (II) est essentielle à leur activité anticancéreuse. Si la nature des ligands équatoriaux n'a qu'une faible influence sur le potentiel de réduction des complexes du platine (IV),²⁷⁷ les ligands axiaux ont une influence déterminante, comme le montrent les résultats du **Tableau 9**. La réduction s'effectue très facilement lorsque le ligand axial est un chloro et beaucoup plus difficilement lorsque celui-ci est un ligand hydroxo. Les ligands carboxylato ont un effet intermédiaire.^{278,279}

La nature des ligands axiaux influe sur le potentiel de réduction des complexes du platine (IV) et donc sur le taux de réduction *in vivo* en complexe du platine (II). Choi et coll. ont pu corréler la nature des ligands avec l'activité biologique des complexes du platine (IV) en observant une cytotoxicité accrue lorsque le potentiel de réduction augmentait.²⁷⁷



187

Ligand (X)	Potentiel de réduction (mV)
Cl	-4
OC(O)CH ₃	-326
OC(O)CH ₂ CH ₃	-301
OC(O)CH ₂ CH ₂ CH ₃	-273
OH	-664

Tableau 9. Potentiels de réduction du complexe **187** en fonction de la nature des ligands axiaux, par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène.^{278,279}

Le caractère plus ou moins lipophile des ligands axiaux a également une influence sur l'activité biologique des complexes du platine (IV). En effet, les complexes trop lipophiles montrent de faibles activités en raison d'une mauvaise solubilité dans les milieux physiologiques, tandis que les complexes trop hydrophiles pénètrent mal dans les cellules, notamment à cause de l'apparition de résistances au niveau des transporteurs du cuivre.

Le Satraplatine est un complexe du platine (IV) comportant deux ligands axiaux acétato, ainsi qu'un ligand cyclohexylamino. Les études précliniques ont montré que ce complexe du platine (IV) possédait une bonne activité antitumorale après administration par voie orale, en comparaison d'une administration intraveineuse de Cisplatine ou de Carboplatine, chez la Souris porteuse d'un cancer de l'ovaire expérimental.²⁸⁰ Ce dérivé s'avère également actif sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines qui ont développés des résistances au Cisplatine, notamment au niveau des transporteurs. Les études cliniques chez des patients atteints de cancer de la prostate ont prouvé son efficacité, avec un risque de progression de la maladie réduit. Le Satraplatine a un profil de toxicité similaire à celui du Carboplatine. Il est mieux toléré que le Cisplatine et ne requiert pas de préhydratation des patients avant traitement.²⁸¹

Le LA-12 est un analogue structural très proche du Satraplatine, qui possède un ligand adamantylamino très hydrophobe et encombré.²⁸² Ce complexe affiche des CI_{50} plus faibles que le Cisplatine sur les lignées de cancer de l’ovaire sensibles et résistantes A2780 et A2780cis.²⁸³ Des études précliniques chez le Rat²⁸⁴ et la Souris²⁸⁵ ont également montré que ce composé qui peut être administré par voie orale était capable de contourner la résistance au Cisplatine, et possédait une meilleure activité que le Satraplatine (**Figure 79**).

Si tous ces dérivés du platine ont démontré des activités significatives tant *in vitro* qu’*in vivo*, de nombreux autres composés n’ont pas dépassé le stade clinique. Le développement du Tétraplatine, combinant des ligands axiaux chloro ainsi qu’un ligand diaminocyclohexane, a été stoppé à cause d’effets indésirables sévères comme une neurotoxicité.²⁸⁶ L’Iproplatine a également été testé en clinique mais son développement a été suspendu à cause d’une activité trop faible attribuée à la faible cinétique de réduction des ligands axiaux hydroxo (**Figure 79**).²⁸⁷

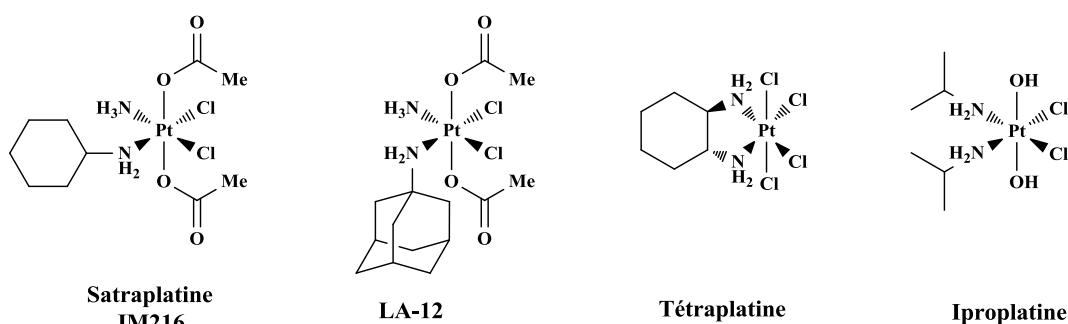


Figure 79

II.3.1.3. Vers une meilleure distribution du platine dans les tumeurs

Les formes liposomales apportent bien souvent un gain thérapeutique notable, comme c’est le cas par exemple des formulations liposomales de la Doxorubicine et de la Daunorubicine ainsi que des nanoparticules de Paclitaxel liées à l’albumine.

Une première forme liposomale du Cisplatine, le SPI-77 a été étudiée jusqu’en phases I et II.^{288,289} Malgré une toxicité réduite, cette formulation n’a montré qu’une activité antitumorale modeste en comparaison du Cisplatine libre chez des patients atteints d’un cancer du poumon avancé. Le profil pharmacocinétique du Cisplatine est totalement différent dans cette formulation,

avec une faible libération du principe actif et des concentrations réduites dans le plasma, le tissu tumoral et les leucocytes, ce qui explique le peu de toxicité mais également la diminution de l'activité antitumorale par rapport au Cisplatine libre. Les tests cliniques ont donc été stoppés mais peuvent être repris pour d'autres types de cancers.

La formulation la plus efficace est l'Aroplatine® (L-NDDP, *cis*-bis-néodécanoato-*trans*-(*R,R*)-1,2-diaminocyclohexane platinum (II) liposomal), un analogue structural de l'Oxaliplatine, comportant également un ligand 1,2-diaminocyclohexane. Ce complexe est incorporé dans des liposomes multilamellaires de 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et de 1,2-dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) (**Figure 80**).²⁹⁰

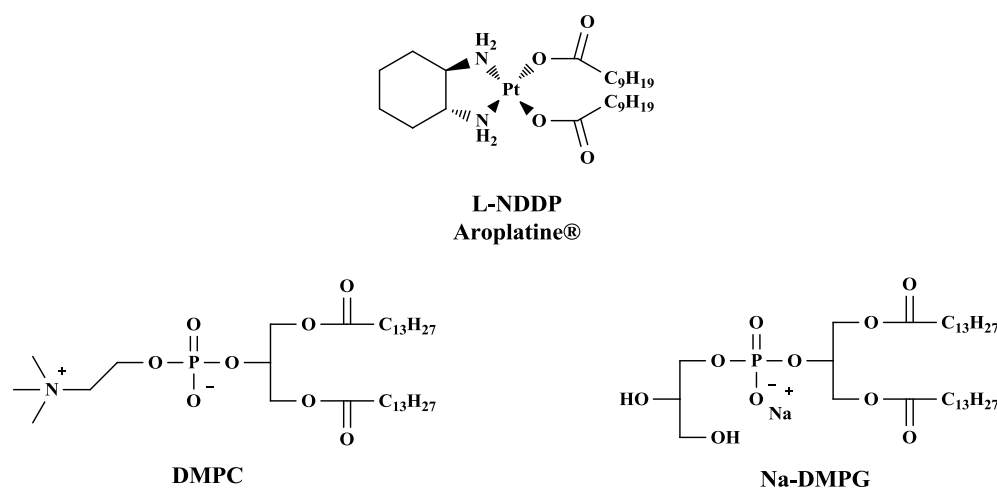
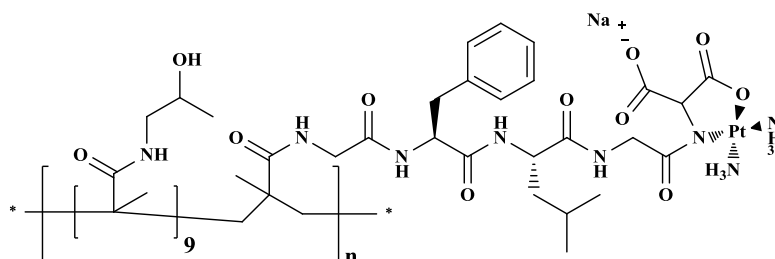


Figure 80

Une étude clinique de phase II a été menée chez des patients atteints d'un carcinome colorectal, réfractaires aux traitements établis comme la 5-FU en association avec l'acide folinique, la Capécitabine ou encore l'Irinotécan. La formulation liposomale de l'Aroplatine® possède une activité antitumorale comparable à celle de l'Oxaliplatine libre. Elle est bien tolérée malgré certains effets indésirables.²⁹⁰ D'autres études cliniques de phases I et II sont actuellement menées sur des patients porteurs de différentes tumeurs solides. La formulation liposomale de l'Aroplatine est testée soit en monothérapie ou en association avec la Capécitabine ou la Gemcitabine.^{291,292}

Une seconde stratégie consiste à fixer un dérivé du platine à un co-polymère biocompatible et hydrosoluble, comme l'hydroxypropylméthacrylamide (HPMA), dans le but d'exploiter l'effet EPR (Enhances Permeability and Retention) des macromolécules dans les tumeurs. L'AP5280, un aminomalonate de platine lié à un polymère de HPMA, a pu être administré sans danger à des

patients porteurs de tumeurs solides. Cependant, son efficacité n'a pas été démontrée dans des études cliniques de phase II (**Figure 81**).²⁹³



AP5280

Figure 221

Le Prolindac (AP4346), un dérivé de l'Oxaliplatine contenant également un ligand diaminocyclohexane, a montré en préclinique une activité antitumorale supérieure à l'Oxaliplatine chez des souris porteuses d'un mélanome murin B16F10 ou des carcinomes de l'ovaire humains M5076 et 2008. Il a également été démontré qu'à doses équitoxiques, le Prolindac délivrait environ 15 fois plus de platine à la tumeur et à l'ADN tumoral que l'Oxaliplatine.²⁹⁴ Des tests cliniques de phase I menés sur des patients porteurs de différentes tumeurs solides, comme le cancer du sein, de l'ovaire ou de la prostate ont montré que ce traitement en association avec un antiémétique était bien toléré par les patients. De plus les études pharmacocinétiques ont mis en évidence un temps de demi-vie prolongé ainsi qu'une activité antitumorale significative.²⁹⁵ Les études cliniques de phase II chez des patients atteints de cancers du cou ou de la tête métastatiques sont actuellement menées en comparaison avec l'Oxaliplatine (**Figure 82**).

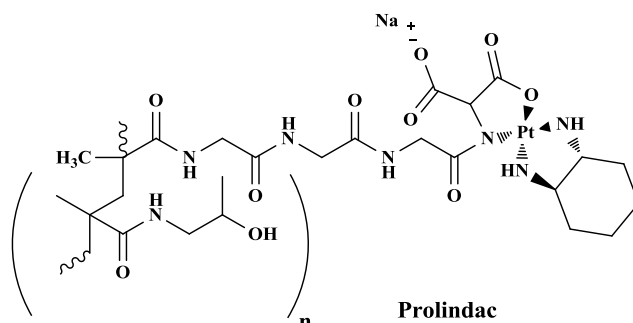


Figure 82

De nouveaux analogues du Satraplatine, modulés sur les ligands axiaux ont été décrits. Par exemple, l'acylation de complexes *trans*-dihydroxocisplatine (IV) par des anhydrides cycliques, comme l'anhydride succinique, glutarique, maléique ou phtalique a été proposée comme un moyen de fonctionnaliser ces complexes par des dérivés lipophiles ou des composés permettant un ciblage spécifique (**Schéma 68**).

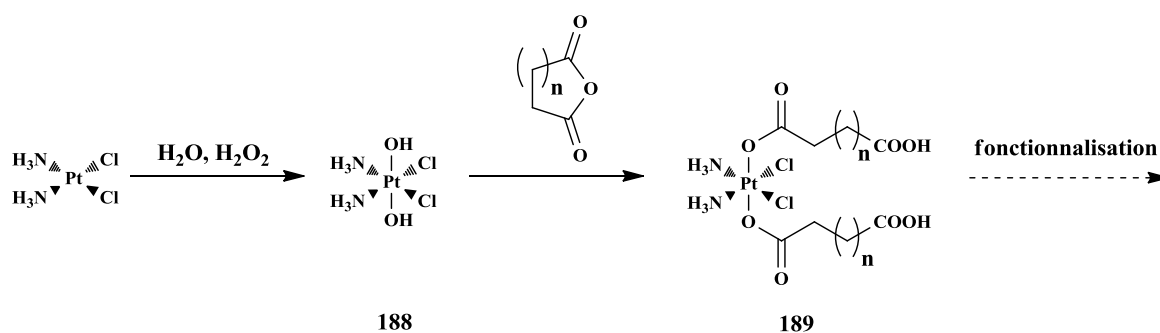


Schéma 68

Le groupe de Lippard a été le premier à utiliser cette méthode et a décrit en 2004 la synthèse de plusieurs complexes du dihydroxoplatine (IV) liés à des molécules d'œstrogène.²⁹⁶ Ils avaient montré auparavant que les cellules traitées par des œstrogènes étaient sensibilisées au Cisplatine, en induisant une surexpression de la protéine HMGB1.²⁹⁷ L'administration simultanée d'un complexe du platine et d'un oestrogène devait par conséquent améliorer l'activité antitumorale.

Le *cis*-diamminedichlorodisuccinatoplatine (IV) **189** a été synthétisé dans un premier temps par condensation du dihydroxocisplatine **188** avec l'anhydride succinique avec un rendement de 69 %. Ce complexe **189** a ensuite été couplé à deux molécules d'œstradiol **190** via un bras espaceur en position β -17, avec des rendements allant de 7 à 43 % (**Schéma 69**).

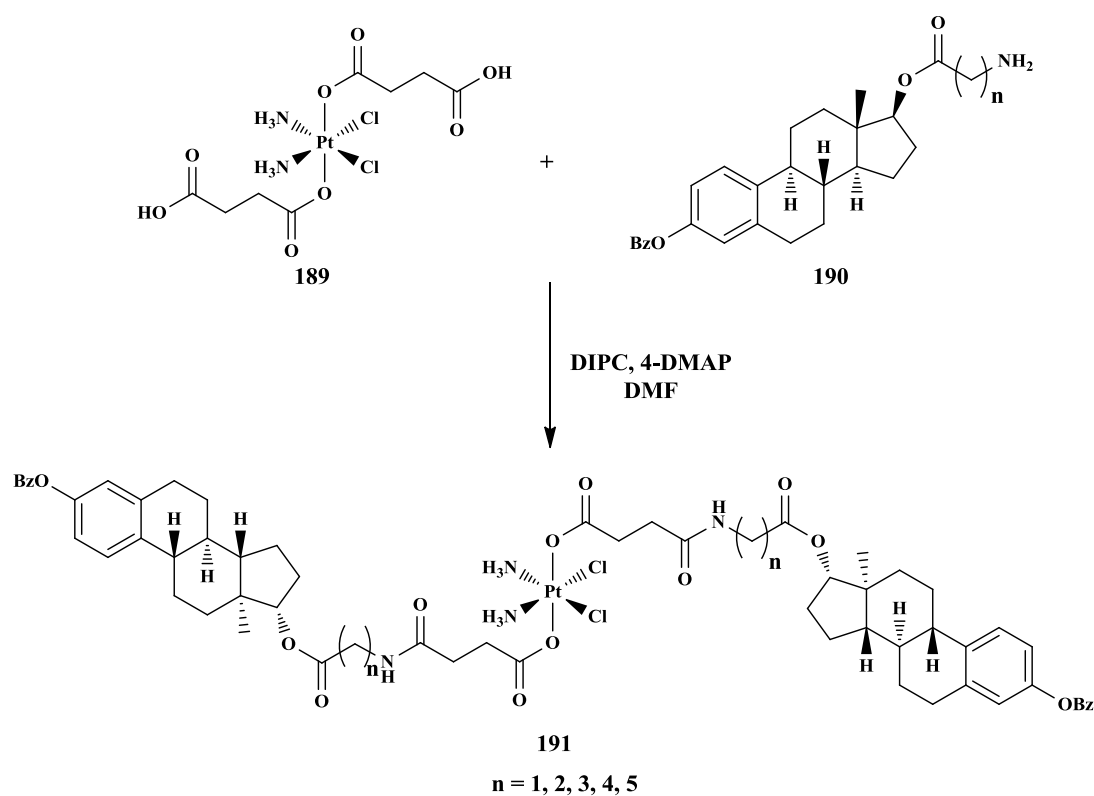


Schéma 69

Le complexe **191** comportant un bras espaceur avec 3 atomes de carbone s'est montré le plus actif sur la lignée MCF-7 qui est positive aux récepteurs d'œstrogène, avec une CI_{50} de 2,1 μ M. Cependant, l'activité anticancéreuse du Cisplatine sur ces cellules n'a pas été rapportée dans cet article, rendant impossible la comparaison.²⁹⁶

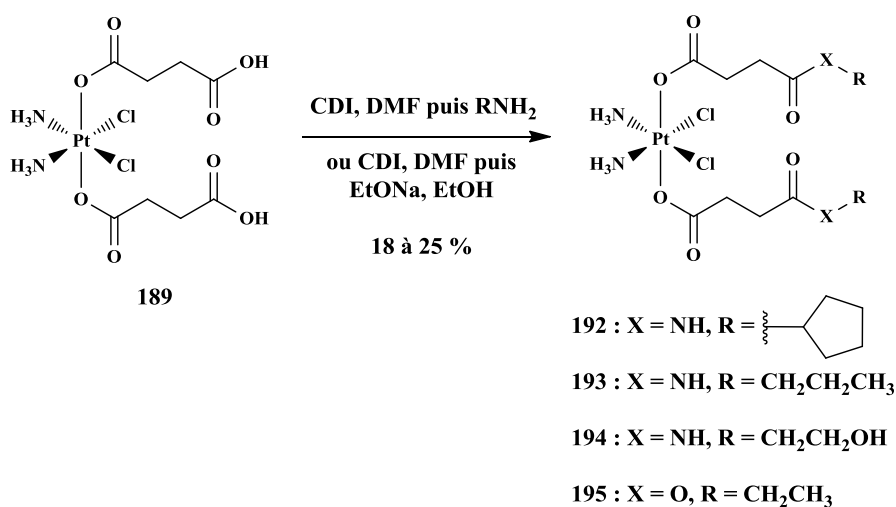


Schéma 70

Le groupe de Keppler a également utilisé cette méthode de synthèse pour préparer de nouveaux dérivés, différemment fonctionnalisés sur les ligands axiaux. Des amines primaires, la cyclopentylamine, la propylamine, la 2-hydroxyéthylamine ainsi que l'éthanol ont été couplés au disuccinatocisplatine **189**, activé par le carbonyldiimidazole avec des rendements modestes (Schéma 70).²⁹⁸

Les activités biologiques de ces différents composés ont été évaluées *in vitro* sur les lignées du carcinome ovarien CH1 et SKOV-3, la lignée du carcinome cervical HeLa ainsi que celle du carcinome du colon SW480. Tout d'abord, l'activité de ces nouveaux complexes a été comparée à celle du disuccinatocisplatine **189**. La formation d'une liaison ester ou amide permet d'améliorer l'activité anticancéreuse *in vitro*, sauf dans le cas du composé **194**. Ce gain d'activité peut sans doute être corrélé au caractère plus hydrophobe des dérivés **192**, **193** et **195**, assurant une meilleure pénétration intracellulaire par diffusion passive par rapport au composé **189** qui possède deux fonctions acides carboxyliques très polaires, ou par rapport au composé **194** comportant deux fonctions hydroxyles. Quelle que soit la lignée étudiée, la molécule la plus active reste le complexe **195** contenant deux fonctions esters. Dans la série amide, l'amidocyclopentyle **192** est le plus actif, devant les composés **193** et **194**. Même si l'activité du Cisplatine reste supérieure à celle de ces prodrogues, le diester **195** possède une activité anticancéreuse *in vitro* intéressante (Tableau 10).²⁹⁸

Complexe	CI ₅₀ (μM)			
	CH1	HeLa	SW480	SKOV-3
189	19	82	136	102
192	1,9	6,2	24	33
193	12	22	48	84
194	28	92	183	154
195	0,62	1,5	3,8	6,3
Cisplatine	0,16	0,37	3,5	1,9

Tableau 10. Activité anticancéreuse *in vitro* des différents dérivés du Cisplatine sur les lignée CH1, SKOV, SW480 et HeLa.

La monofonctionnalisation du dihydroxocisplatine par un seul ligand succinato est également possible. Lippard a décrit la synthèse du complexe du platine (IV) **196** portant des ligands axiaux hydroxo et éthoxo, permettant une monoacylation par l'anhydride succinique (Schéma 71).²⁹⁹

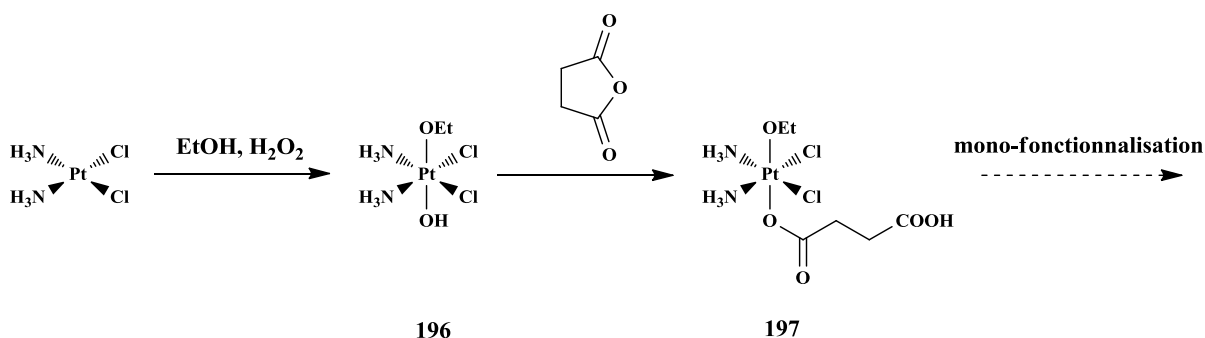


Schéma 71

Un nanotube de carbone fonctionnalisé, fixé par interactions hydrophobes à un phospholipide aminé comportant un bras espaceur PEG₄₅, a ensuite été couplé à **197**, dans le but de transporter ce dérivé du platine dans les cellules par endocytose clathrine-dépendante. Ce nanotube de carbone vecteur libère alors le Cisplatine, après internalisation, dans l'environnement réducteur des endosomes (Schéma 72).²⁹⁹

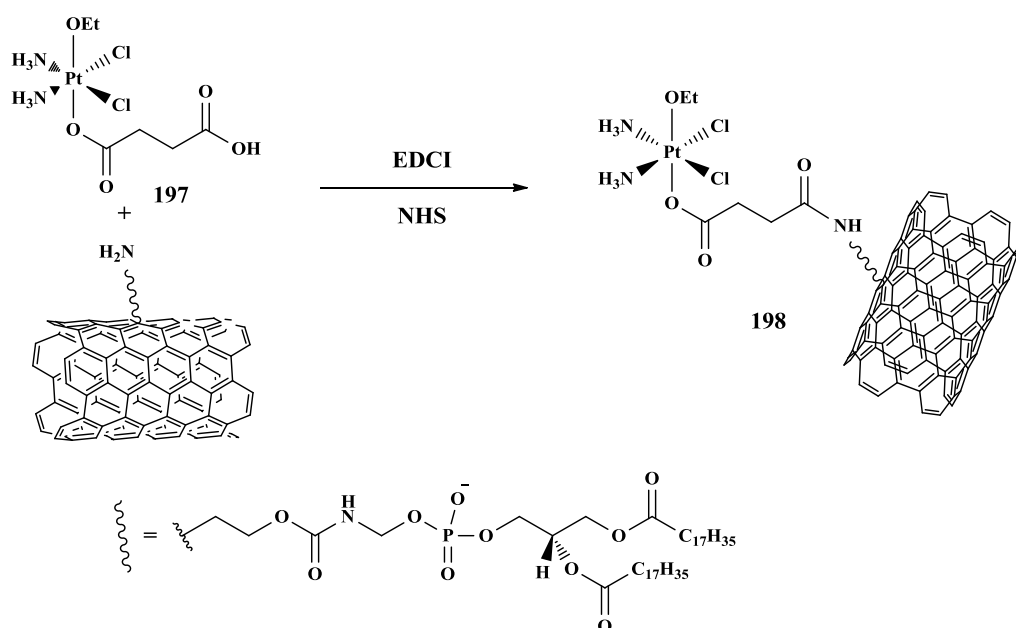


Schéma 72

Les activités anticancéreuses *in vitro* des dérivés **197** et **198** ainsi que celle du Cisplatine, ont été évaluées sur la lignée de carcinome du testicule humain Tera-2. Si le dérivé du platine (IV) non fonctionnalisé affiche une activité plus faible due à son caractère de prodrogue ($CI_{50} > 0,5 \mu M$), comparé à l'activité du Cisplatine ($CI_{50} = 0,05 \mu M$), le dérivé **198** vectorisé par le nanotube de carbone retrouve une bonne activité avec une CI_{50} de $0,02 \mu M$. Afin de rationaliser ces résultats, les auteurs ont étudié la localisation intracellulaire des différents composés, et dosé le platine dans les différents compartiments. Il s'avère que le platine est présent en quantité deux fois plus importante dans le cytosol et le noyau cellulaire, quand les nanotubes **198** sont incubés avec les cellules que lorsque l'on utilise le Cisplatine, et 6 à 8 fois plus qu'avec **197**. Ces résultats prouvent donc l'efficacité d'une telle stratégie, potentiellement applicable à d'autres antitumoraux, grâce à une pénétration cellulaire accrue par endocytose.

Le groupe de Lippard a mis à profit le ligand axial restant disponible sur le platine pour y fixer de l'acide folique, afin de cibler des cellules tumorales qui surexpriment les récepteurs folates. Le complexe **189** portant deux ligands succinato a été couplé dans un premier temps à l'acide folique **199**, via un bras espaceur amino-PEG₃ pour fournir le dérivé **200** avec un rendement de 51 %. **200** a ensuite été conjugué au nanotube de carbone comme précédemment (**Schéma 73**).³⁰⁰

Afin de prouver que ces nanotubes ciblent bien les cellules cancéreuses possédant des récepteurs folates à leur surface, ces nano-objets ont été testés sur différentes lignées cellulaires cancéreuse, exprimant ou non ces récepteurs. Un gain d'activité par rapport au Cisplatine a été observé quand les cellules possèdent ces récepteurs, alors qu'aucune amélioration de l'activité anticancéreuse *in vitro* n'est détectée pour les cellules ne les possédant pas.

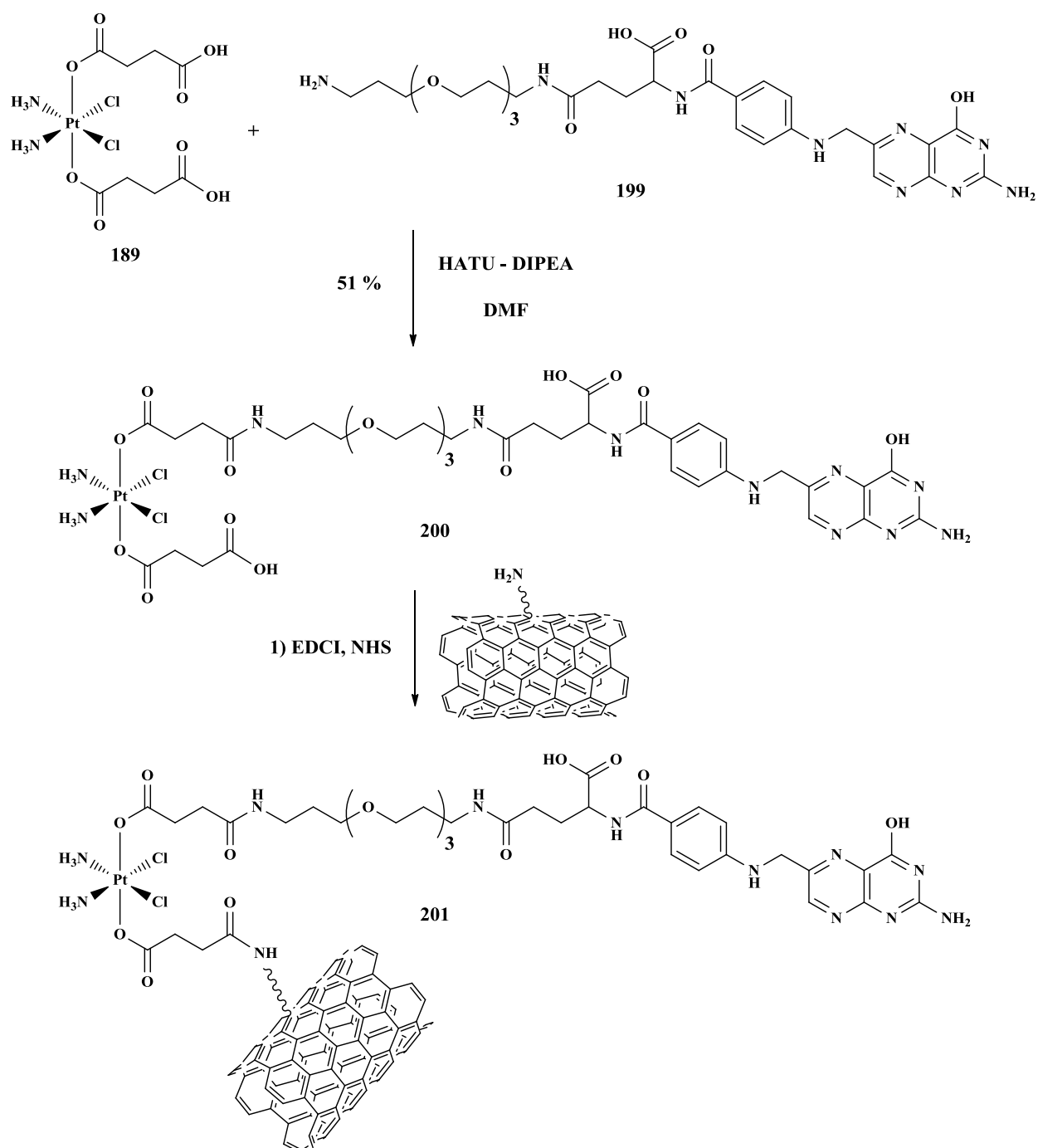


Schéma 73

Les nanoparticules d'or décorées en surface par des oligonucléotides possèdent des propriétés intéressantes pour l'administration de médicaments, comme une bonne pénétration cellulaire, une faible toxicité, et une protection des principes actifs de la dégradation. Des nanoparticules d'or recouvertes en surface d'un oligonucléotide 28-mère portant un groupement

aminé libre à son extrémité ont été condensées au complexe du platine (IV) **202** dont le ligand axial succinato est activé sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimidyle **203** (Schéma 74).³⁰¹

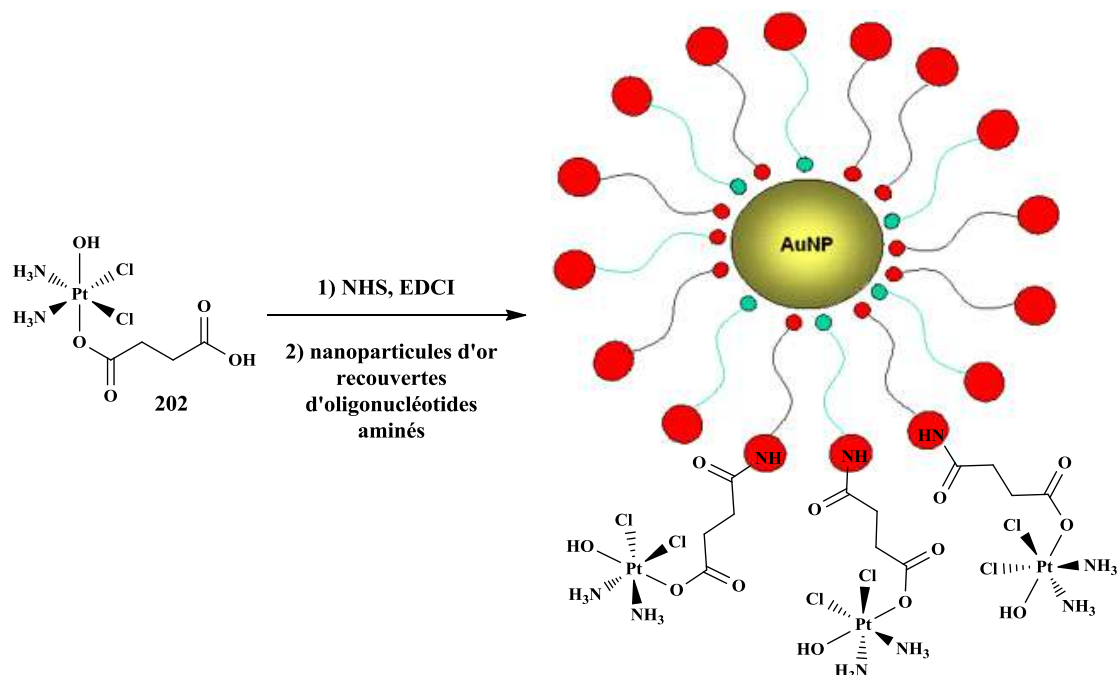


Schéma 74

L'activité de ces nanoparticules a été évaluée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires, U2OS (ostéosarcome humain), A549 (carcinome du poumon humain), HeLa (cancer des cervicales) et PC3 (cancer de la prostate humain). Si le dérivé **202** n'atteint jamais la CI_{50} à des concentrations inférieures à 20 μM , les nanoparticules d'or sont 2 à 10 fois plus actives que le Cisplatine sur toutes les lignées, sans doute grâce à une meilleure pénétration cellulaire et à une meilleure biodisponibilité (Tableau 11).³⁰¹

Composé	CI_{50} (μM)			
	U2OS	A549	HeLa	PC3
Nanoparticules d'or	3,4	0,9	6,0	2,5
202	>20	>20	>20	>20
Cisplatine	5,1	11	9,4	4,6

Tableau 11. Activités anticancéreuses *in vitro* des nanoparticules d'or conjuguées au Cisplatine, du complexe **202** et du Cisplatine sur différentes lignées cellulaires humaines.³⁰¹

Ces avancées dans le domaine des dérivés du platine et des nano-objets, ouvrent des perspectives quant au développement de nouvelles formes nanoparticulaires. Nous avons vu qu'il était possible de fonctionnaliser aisément le Cisplatine avec des ligands axiaux variés, afin de moduler la capacité des complexes de platine (IV) à être réduit plus ou moins rapidement, au niveau extra- et intracellulaire.

II.3.2. Objectif des travaux

Nous avons envisagé la synthèse de nouveaux complexes squalénisés du platine, en conservant les ligands équatoriaux du Cisplatine. Nous avons choisi de mettre à profit les complexes **189** et **197** synthétisés par Lippard, portant un ou deux ligands succinato axiaux pour accéder aux conjugués squalénisés **204** et **205 (Figure 83)**. De telles molécules devraient s'auto-assembler en nanoparticules dans l'eau, permettant un ciblage passif vers les tissus tumoraux par effet EPR, et une protection contre l'aquation et la réduction extracellulaire des complexes du platine (IV) en platine (II).

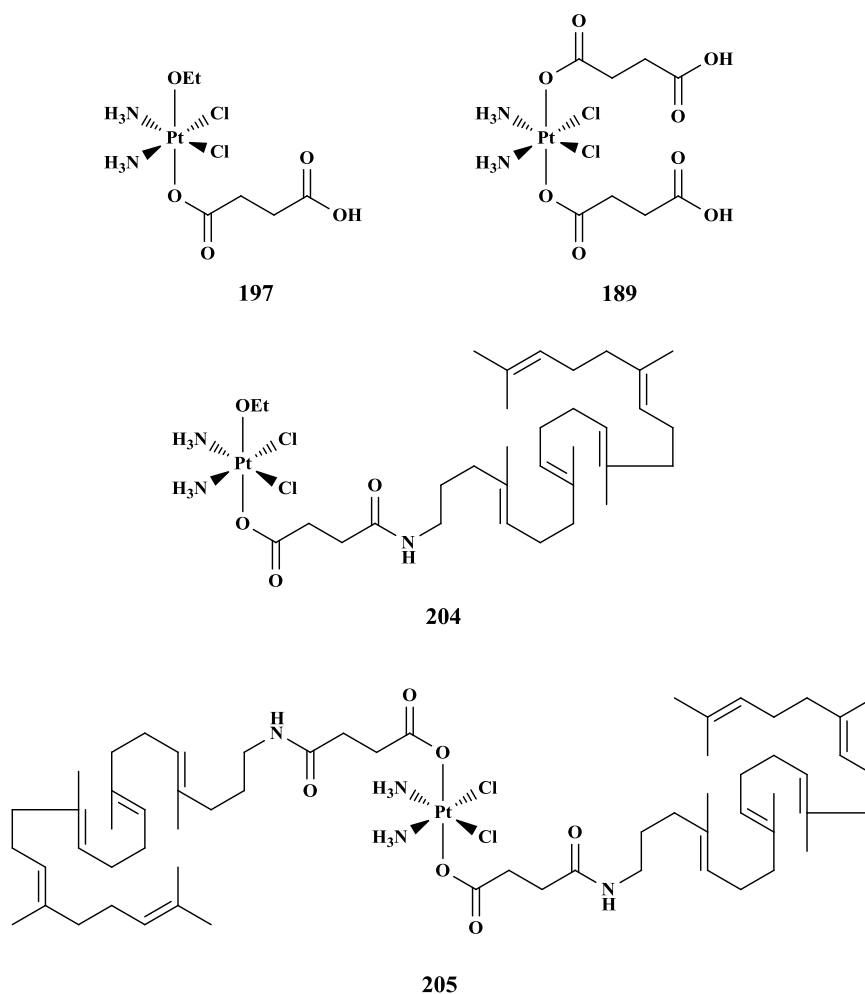


Figure 83

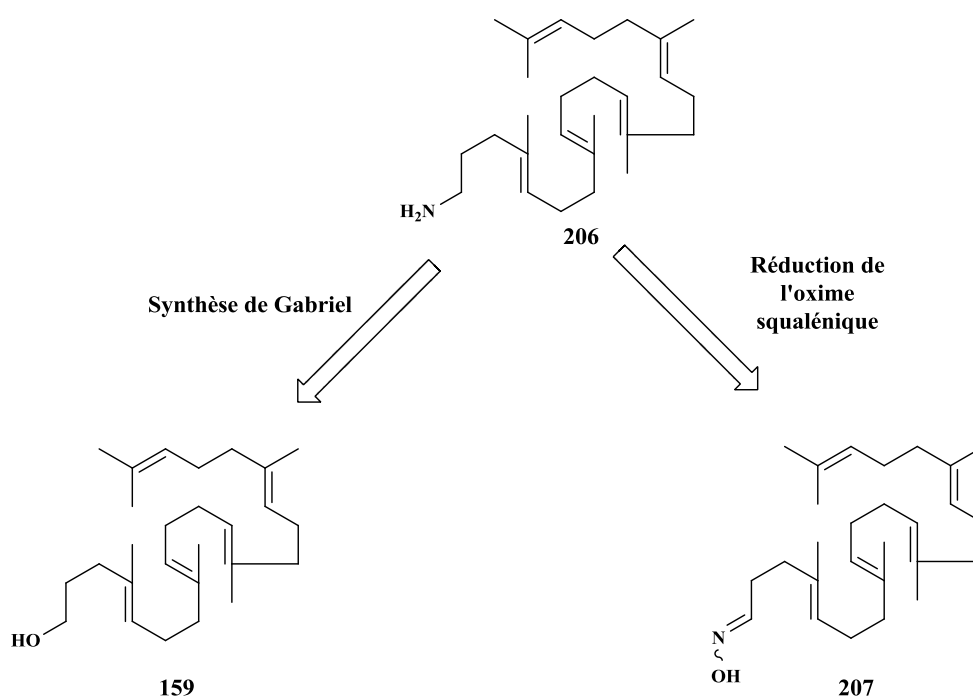
Ces composés seront soumis aux conditions de nanopréciipitation. Les nanoparticules formées seront caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et par les méthodes de microscopie électronique ainsi que des études de diffusion des rayons X aux petits angles.

Enfin, nous évaluerons l'activité biologique de ces différents composés, sous forme de nanoparticules, *in vitro* puis *in vivo*, en comparaison avec le Cisplatine. Cette étude devrait nous permettre de mieux cerner l'influence de la lipophilie et du potentiel d'oxydo-réduction sur l'activité biologique de ces prodrogues.

II.3.3. Exposés des travaux

II.3.3.1. Synthèse de la 1,1',2-trisnor-squalénamine **206**

Avant de réaliser la synthèse des complexes du platine (IV) squalénisés, il nous fallait développer une voie de synthèse efficace de la squalénamine **206**. Parmi les nombreuses voies de synthèses possibles donnant accès à des amines primaires, nous avons choisi une synthèse de Gabriel, à partir du squalénol **159**, et la réduction de l'oxime **207** issue de l'aldéhyde squalénique **59** (Schéma 75).



Le squalénol **159** a tout d'abord été préparé à partir de l'aldéhyde squalénique **59**, par réduction au borohydrure de sodium dans l'éthanol, avec un rendement de 88 %. La fonction alcool a été activée sous forme de mésylate et celui-ci déplacé par le sel de potassium du phtalimide avec un rendement de 85 %. Restait à libérer l'amine. Ceci a été effectué par hydrazinolyse dans le méthanol ce qui fournit la squalénamine **206**, avec un rendement de 86 %. Cette suite réactionnelle en 4 étapes a permis de préparer l'amine **206** avec un rendement de 64 % à partir de **59** (Schéma 76).

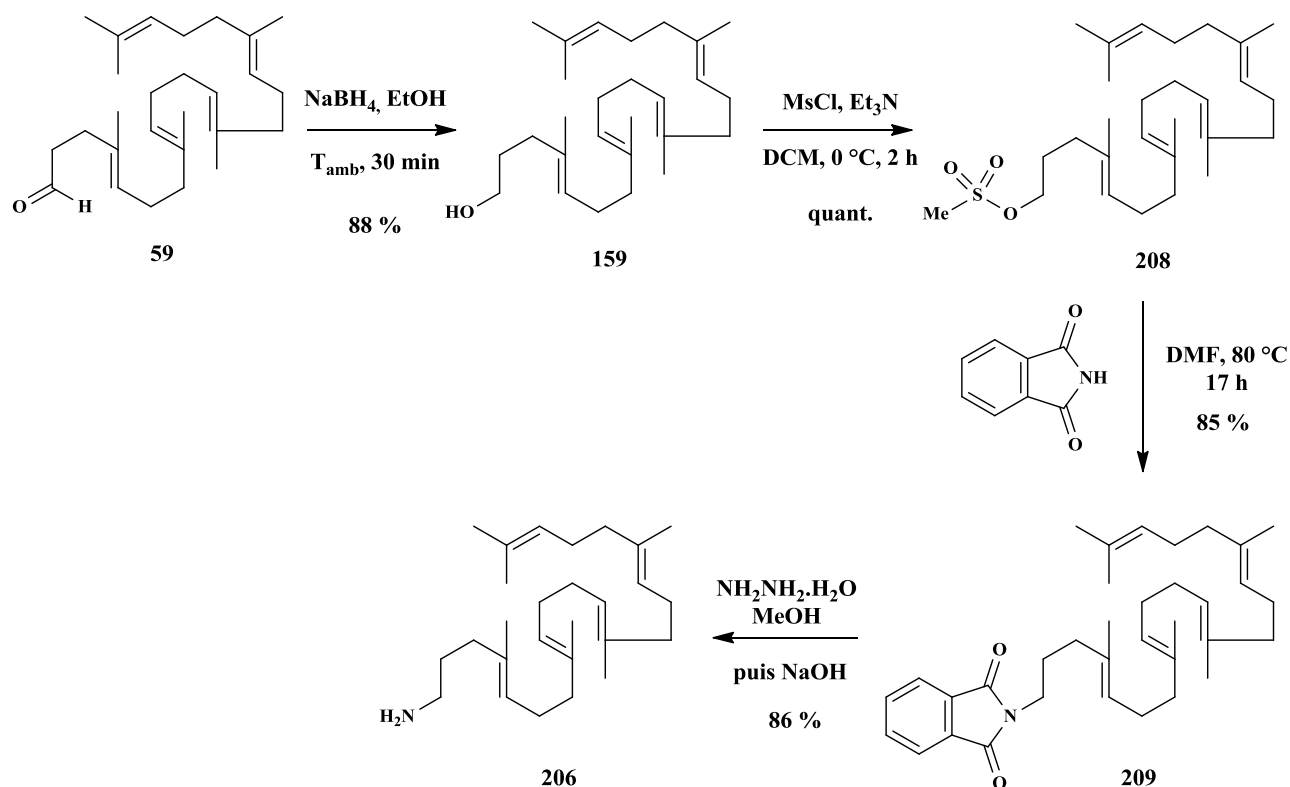


Schéma 76

L'oxime **207** a été préparée à partir de l'aldéhyde **59**, par traitement au chlorhydrate d'hydroxylamine, en présence d'acétate de sodium dans un mélange éthanol/eau, avec un rendement quantitatif. L'oxime est obtenue sous forme d'un mélange d'isomères 1:1 *cis* et *trans*. La réduction des oximes par l'hydrure double de lithium et d'aluminium a été décrite dès 1950 par Burger et Bennet,³⁰² Smith et coll.³⁰³ et Walter,³⁰⁴ généralement au reflux de l'éther diéthylique ou du THF. Dans le cas présent, l'oxime squalénique **207** a été réduite par LiAlH_4 au reflux du THF pendant 4 heures, pour donner l'amine désirée **206** avec un rendement de 73 % (Schéma 77).

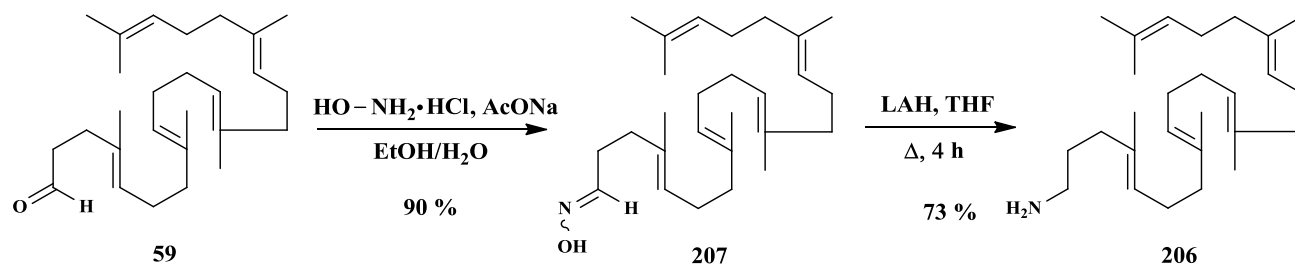


Schéma 77

Cette seconde voie de synthèse permet donc d'obtenir la squalénamine en moins d'étapes à partir de l'aldéhyde, avec cependant un rendement global quasiment identique à celui de la première voie de synthèse.

II.3.3.2. Synthèse du Cisplatine bis-squalène 205

Une fois la synthèse de la squalénamine mise au point, nous nous sommes tournés vers la synthèse du Cisplatine bis-squalénisé **205**. Ce composé peut être obtenu par condensation du disuccinatocisplatine **189** et de deux molécules de squalénamine **206** dans de simples conditions de couplage peptidique.

Le dihydroxocisplatine a été obtenu selon le protocole de Lippard, légèrement modifié par rapport à celui de Babaeva,³⁰⁵ à partir du Cisplatine, par traitement à l'eau oxygénée à 70 °C avec un rendement de 86 %.³⁰⁶ Le disuccinatocisplatine **189** a été préparé selon le protocole décrit dans la littérature par Keppler et coll., en traitant le dihydroxocisplatine **188** par un excès d'anhydride succinique dans le DMF à 70 °C avec un rendement de 84 %.³⁰⁶

Le couplage crucial entre la trisnor-squalénamine **206** et le complexe **189** a été tenté en utilisant un agent de couplage peptidique, l'hexafluorophosphate de 2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraéthyluronium (HATU) dans le DMF. Malheureusement, seulement 10 % du composé désiré **205** ont pu être isolés après chromatographie. La condensation de l'amine **206** avec le bisanhydride mixte formé par traitement au chloroformiate d'éthyle a permis d'améliorer le rendement jusqu'à 39 % (**Schéma 78**).

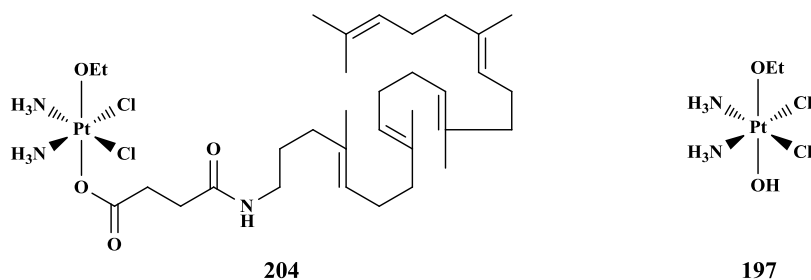


Figure 84

Nous avons tenté de reproduire la synthèse de l'hydroxoéthoxocisplatine **197**, selon le mode opératoire décrit par Lippard.²⁹⁹ Le Cisplatine a été traité dans l'éthanol à 70 °C par l'eau oxygénée à 50 % pendant 5 heures. Malheureusement, nous n'avons pas pu isoler le complexe désiré par précipitation dans l'éther. Il est probable que nous ayons obtenu un mélange du complexe **197** et du dihydroxo correspondant, difficile à séparer par cristallisation fractionnée. Une cause possible de cet échec pourrait être la concentration trop faible de l'eau oxygénée que nous avons employée.

Dans l'impossibilité de reproduire ce mode opératoire, nous nous sommes tournés vers la synthèse du complexe du platine monosqualénisé **210**, portant un ligand axial hydroxo au lieu du ligand éthoxo (**Figure 85**).

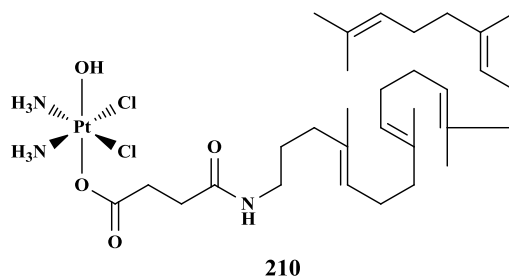


Figure 85

Ce complexe sera obtenu par condensation de la trisnor-squalénamine avec le complexe monosuccinato **202** dont la synthèse a été décrite par Lippard par monoacylation de **188** par l'anhydride succinique. Nous avons reproduit ce protocole sans modification. Ainsi, le traitement de **188** par 1 équivalent d'anhydride succinique dans le DMSO à 20 °C a fourni après purification par lavages successifs avec l'acétone et l'éther diéthylique, le complexe **202** avec un rendement de 54 %.³⁰¹ Le complexe a été activé sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide puis condensé avec la

squalénamine **206** dans le DMF pour fournir après purification par chromatographie le complexe monosqualénisé **210** avec un rendement de 22 % (**Schéma 79**).

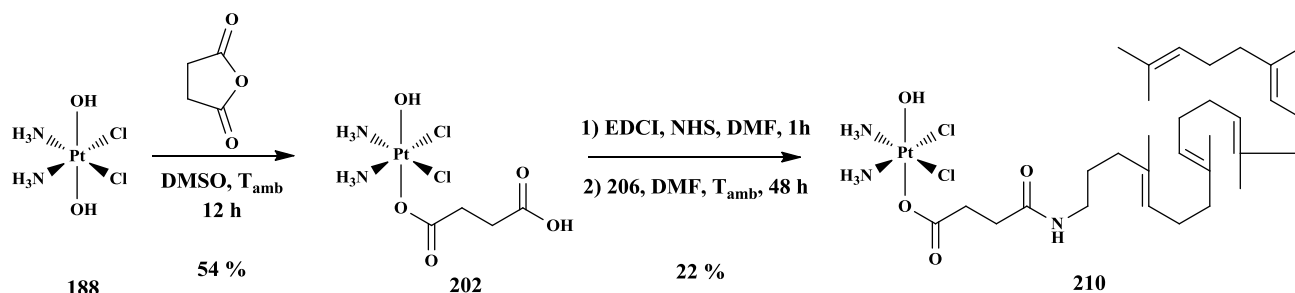


Schéma 79

Nous avons donc obtenu deux nouveaux complexes squalénisés du platine, **205** et **210**, portant une ou deux molécules de squalène. Les rendements obtenus restent très modestes, notamment à cause d'une purification laborieuse, mais ils sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés par Keppler.²⁹⁸ Ces complexes sont en effet très polaires et semblent se dégrader partiellement sur silice. Toutefois, nous avons pu synthétiser ces complexes en quantité suffisante pour effectuer des études de nanopréciptation ainsi que les évaluations biologiques.

II.3.3.4. Préparation et caractérisation des nanoparticules

Les deux complexes squalénisés ont été soumis aux conditions de nanopréciptation. Les nanoparticules du complexe **210** ont été préparées dans les conditions standard de nanopréciptation évaporation de solvant à différentes concentrations dans une solution aqueuse à 5 % de dextrose (2 et 5 mg/mL) à partir d'une solution éthanolique à 6,5 mg/mL. Le diamètre moyen des nanoparticules, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, est relativement indépendant de la concentration, puisqu'il est de 128,2 nm à 2 mg/mL et de 160,1 nm à 5 mg/mL. Le potentiel zêta obtenu est largement négatif, avec une valeur de -49,2 mV, ce qui est en accord avec la bonne stabilité de ces nanoparticules (**Tableau 12**).

En revanche, le complexe bis-squalénisé **205** s'est avéré être trop peu soluble dans l'éthanol. Les nanoparticules ont donc été préparées à partir d'une solution acétonique à 5 mg/mL. Le

diamètre moyen des nanoparticules de 150 nm est indépendant de la concentration finale. Le potentiel zêta obtenu est également constant à $-37,6$ mV (**Tableau 12**).

Composé	Concentration finale (mg/mL)	Diamètre moyen (nm)	PDI
210	2	$128,2 \pm 0,6$	$0,105 \pm 0,025$
210	5	$160,1 \pm 0,8$	$0,105 \pm 0,045$
205	1	$152,5 \pm 1,2$	$0,086 \pm 0,021$
205	3	$152,0 \pm 2,3$	$0,073 \pm 0,005$
205	5	$152,2 \pm 1,8$	$0,069 \pm 0,027$

Tableau 12. Diamètre moyen et PDI des nanoparticules des complexes du platine (IV), **210** et **205**, en fonction de la concentration finale dans l'eau.

Des expériences de cryomicroscopie électronique en transmission (CryoMET) ont ensuite été effectuées dans le but d'observer plus précisément la structure des nanoparticules des complexes squalénisés **210** et **205**. Ces expériences ont été effectuées avec un microscope électronique Jeol 2100 au service de « Microscopie Electronique de l'Institut de Biologie Intégrative » (IFR 83 CNRS Paris), selon le mode opératoire décrit précédemment. Les clichés obtenus ont permis de montrer que les nanoparticules du complexe **210** étaient organisées selon des structures lamellaires, en pelure d'oignon (**Figure 86**).

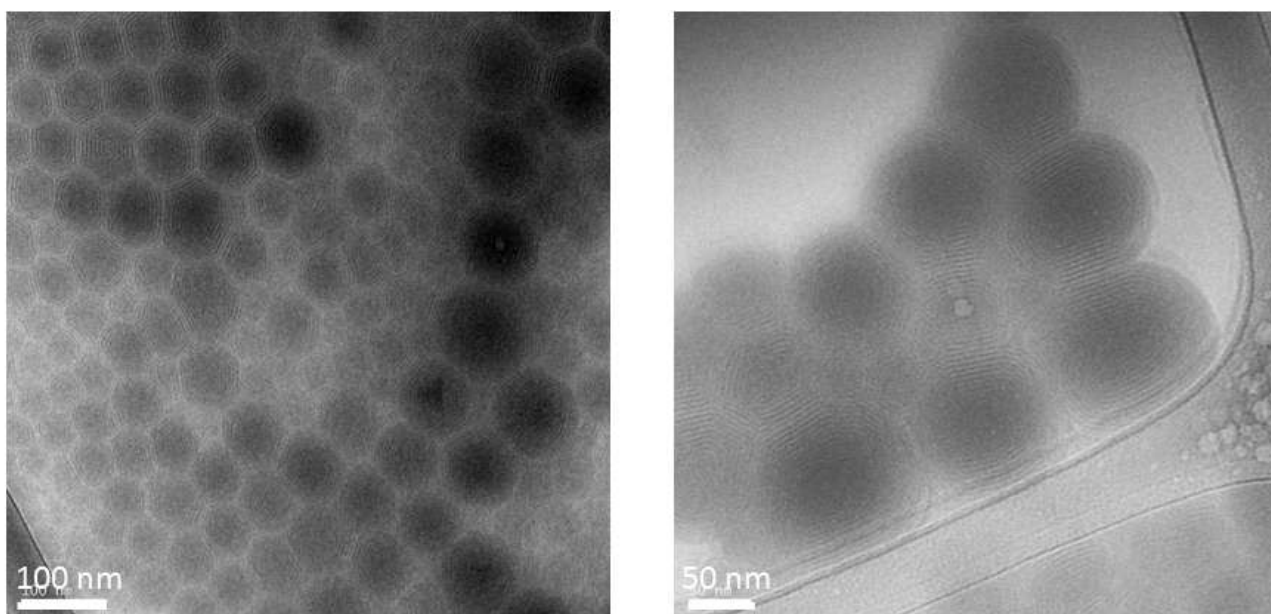


Figure 86. Sélection d'images de CryoMET des nanoparticules du complexe **210** à 2,5 mg/mL.

En ce qui concerne les nanoparticules du complexe **205**, les clichés de CryoTEM ne nous ont pas permis d'élucider leur structure. Seules des sphères opaques ont été observées, ce qui laisse penser qu'il ne s'agit pas de structure lamellaire dans ce cas (**Figure 86**).

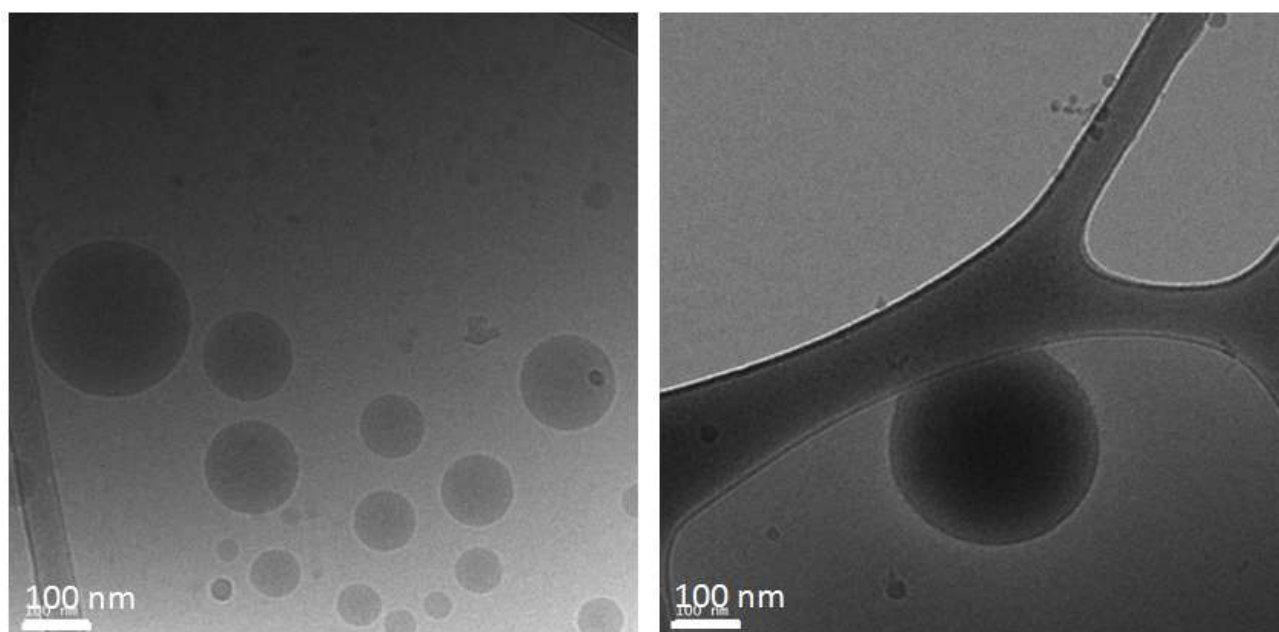


Figure 86. Sélection d'images de CryoMET des nanoparticules du complexe **205** à 2,5 mg/mL.

II.3.3.5. Evaluations biologiques *in vitro*

Les nanoparticules de ces deux nouveaux conjugués du Cisplatine ont été testées sur une large variété de lignées cancéreuses humaines et murines. Les lignées murines testées sont les lignées L-929 (fibrosarcome) et M109 (poumon). Les lignées humaines étudiées sont les lignées A549 (carcinome du poumon), MCF-7 MDR (adénocarcinome du sein), HepG2 (carcinome du foie), KB 3.1 (cancer épithélial), MiaPaCa-2 (carcinome du pancréas), BxPC-3 (adénocarcinome du pancréas) et Panc-1 (carcinome du pancréas). Le temps d'incubation des nanoparticules a été fixé à 3 jours.

Sur les lignées murines, les nanoparticules du complexe mono-squalénisé **210** se sont avérées les plus actives, avec des CI_{50} de 500 et 400 nM sur les lignées L-929 et M109 respectivement, alors que le Cisplatine affiche des CI_{50} de 2300 et 4800 nM. En revanche, les nanoparticules du complexe bis-squalénisé **205** sont moins actives, avec des CI_{50} respectives de 12100 et 4800 nM (**Tableau 13**).

Complexes	CI_{50} (nM)	
	L-929	M109
210	500	400
205	12100	4800
Cisplatine	2300	4800

Tableau 13. Activité biologique *in vitro* du Cisplatine et des nanoparticules des complexes **210** et **205** sur des lignées cellulaires cancéreuses murines.

En ce qui concerne les lignées humaines, dans tous les cas, le complexe mono-squalénisé **210** sous forme nanoparticulaire est le plus actif, avec des CI_{50} allant de 120 à 400 nM, sauf pour la lignée résistante MCF-7 MDR, où la CI_{50} est atteinte à 5000 nM. Même s'il est moins actif que son analogue mono-squalénisé, le complexe bis-squalénisé **205** montre des activités anticancéreuses intéressantes, notamment sur la lignée résistante MCF-7 MDR, avec une CI_{50} de 7000 nM, largement inférieure à celle du Cisplatine. Sur les autres lignées, le complexe bis-squalénisé **205**

possède une activité *in vitro* similaire à celle du Cisplatine. Quelques lignées semblent intéressantes pour développer un modèle d'évaluation *in vivo*. C'est le cas notamment de la lignée cellulaire du cancer du pancréas Panc-1, qui est une lignée résistante très agressive, pour laquelle le complexe **210** (CI₅₀ de 150 nM) est 4 fois plus actif que le Cisplatine. Le complexe **205** possède sur cette lignée une CI₅₀ largement supérieure. Les autres modèles du cancer du pancréas BxPC-3 et MiaPaCa-2 pourraient également être étudiés, puisque la squalénisation permet d'améliorer la CI₅₀ du Cisplatine d'un facteur de 8 à 20 (**Tableau 14**).

Complexes	CI ₅₀ (nM)						
	A549	HepG2	KB 3.1	MiaPaCa-2	BxPC-3	Panc-1	MCF-7 MDR
210	350	1300	120	350	400	150	5000
205	2100	1500	9100	4000	3500	8500	7000
Cisplatine	1300	2500	180	7500	2700	600	50000

Tableau 14. Activité biologique *in vitro* du Cisplatine et des nanoparticules des complexes **210** et **205** sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines.

II.3.3.6. Evaluations biologiques *in vivo*

Compte tenu des résultats précédents, les deux complexes du platine (IV) **205** et **210**, sous forme de nanoparticules, ont été évalués sur un modèle de cancer du pancréas Panc-1 développé par injection sous-cutanée chez la Souris. Auparavant, il fallait déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT) et le plan d'expérience pour chaque composé. Ces expériences ont été effectuées au Laboratoire par Andrey Maksimenko.

La DMT a été déterminée en administrant aux souris pour chaque composé 1, 3 ou 4 doses consécutives plus ou moins espacées dans le temps. La DMT est définie comme la dose la plus élevée ne provoquant aucun décès chez les animaux et n'engendrant pas d'effets secondaires notables se traduisant par une perte de poids de plus de 10 %.

Les résultats obtenus, consignés dans le **Tableau 15**, sont exprimés en Platine-équivalent (Pt-éq, 195 g/mol). Pour l'injection d'une dose unique, la DMT du Cisplatine est de 3 mg/kg Pt-éq. De manière étonnante, la DMT pour les nanoparticules du Cisplatine mono-squalène **210** est de 2 mg/kg Pt-éq tandis que celle des nanoparticules du Cisplatine bis-squalène **205** est supérieure à 8 mg/kg Pt-éq. Pour 3 doses, la même tendance se confirme, avec des DMT respectives pour le Cisplatine, **210** et **205** de 2,5 mg/kg, 0,3 mg/kg et supérieure à 8 mg/kg Pt-éq. Dans le cas d'un protocole impliquant 4 injections espacées de 8 jours, les DMT sont respectivement de 2 mg/kg, 1 mg/kg et 6 mg/kg Pt-éq (**Tableau 15**).

DMT (mg/kg Pt-éq)				
Complexe	Masse moléculaire (g/mol)	1 dose	3 doses (J0, J4, J7)	4 doses (J0, J8, J16, J25)
Cisplatine	300,05	3	2,5	2
Nanoparticules de Cisplatine squalène 210	801,79	2	0,3	1
Nanoparticules de Cisplatine bissqualène 205	1269,52	>8	>8	6

Tableau 15. DMT chez la Souris pour l'injection du Cisplatine, Cisplatine mono-squalène **210** et Cisplatine bis-squalène **205** en fonction du nombre de doses administrées.

Le Cisplatine mono-squalène **210** est donc plus toxique que le Cisplatine, alors que nous avons affaire à une prodrogue. En revanche, le Cisplatine bis-squalène **205** est très peu toxique, que ce soit à dose unique ou à doses multiples. En effectuant l'évaluation de l'activité biologique *in vivo*, nous espérons observer un effet prolongé des traitements à base de nanoparticules de Cisplatine mono-squalène et de Cisplatine bis-squalène. Pour cela, le plan d'expérience le plus pertinent semblait être l'administration de 4 doses aux jours J0, J8, J16 et J25.

L'expérience a été effectuée au laboratoire par Andrey Maksimenko sur 5 groupes de 6 Souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée expérimentale Panc-1. Les résultats se sont révélés très prometteurs. En effet, le Cisplatine est complètement inactif à long terme sur ce modèle alors que les nanoparticules de Cisplatine mono-squalène **210** induisent une inhibition quasi-totale de la croissance tumorale, puisque 70 jours après la première injection, le volume tumoral moyen est toujours d'environ 100 mm³. Le résultat le plus étonnant est obtenu avec les nanoparticules de Cisplatine bis-squalène **205**. Dans ce cas, durant les 40 premiers jours, aucune inhibition de la croissance tumorale n'est observée, puis cette tumeur régresse de manière impressionnante pour revenir après 70 jours, à un volume tumoral d'environ 80 mm³. Nous observons donc un effet retard remarquable (**Figure 87**).

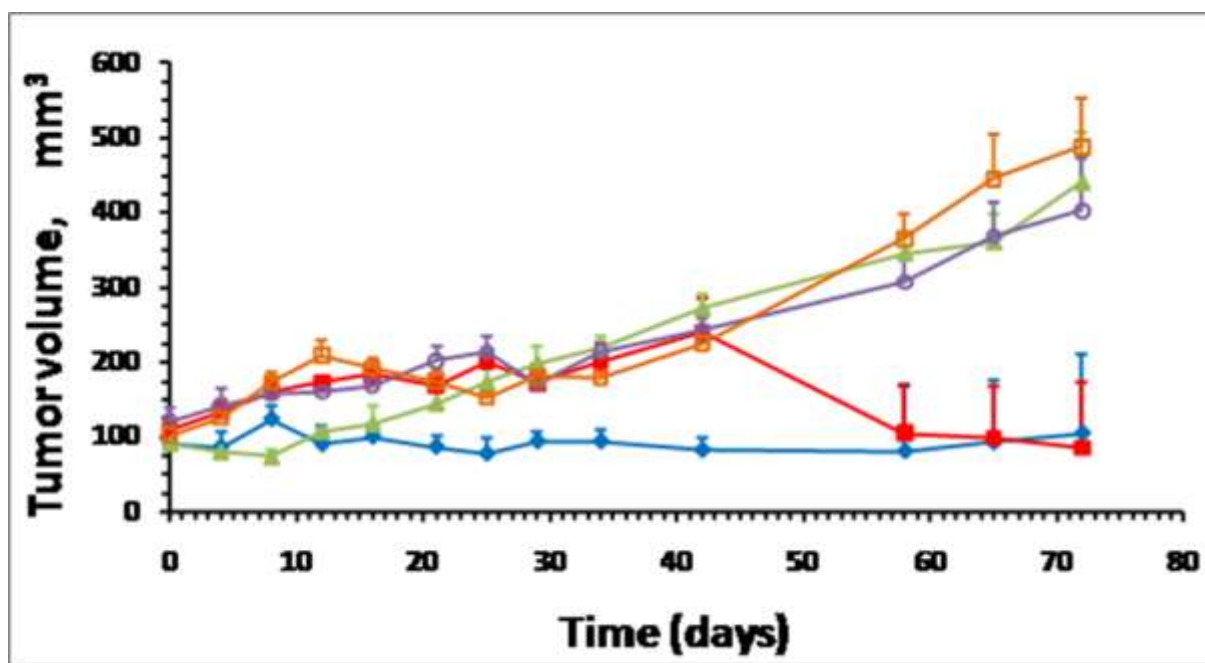


Figure 87. Evolution du volume tumoral en fonction du traitement administré aux Souris. Nanoparticules de Cisplatine mono-squalène **210** (◆) ; Nanoparticules de Cisplatine bis-squalène **205** (■) ; Cisplatine (▲) ; Acide squalénique (○) ; Solution saline 5 % (□).

II.3.4. Conclusion et Perspectives

Deux nouveaux complexes squalénisés du Platine (IV), comportant une ou deux chaînes squalène fixées au platine par des bras espaceurs succinyles ont été synthétisés en 3 étapes à partir

du Cisplatine. Ces composés, sont capables de s'auto-assembler dans l'eau en nanoparticules d'un diamètre moyen d'environ 150 nm. Le Cisplatine mono-squalène **210** semble s'organiser en structures lamellaires, comme l'indiquent les clichés obtenus par CryoMET, alors que nous observons des nanoparticules sphériques sans structure apparente pour le Cisplatine bis-squalène **205**.

Ces deux composés possèdent des activités biologiques très prometteuses. Les nanoparticules de Cisplatine mono-squalène affichent des activités *in vitro* supérieures à celle du Cisplatine sur un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines, ainsi qu'une activité *in vivo* impressionnante, avec une inhibition quasi-totale de la croissance tumorale au-delà de 70 jours après le début de l'expérience, sur un modèle expérimental de cancer du pancréas Panc-1 développé chez la Souris. Les nanoparticules de Cisplatine bis-squalène **205** sont bien moins actives *in vitro* que le Cisplatine mono-squalène **210** sur la plupart des lignées testées. Cependant, le Cisplatine bis-squalène **205** induit une forte inhibition de la croissance tumorale *in vivo* sur le modèle tumoral Panc-1, apparaissant plus de 40 jours après le début du traitement. L'inefficacité totale du Cisplatine sur ce modèle rend ces résultats encore plus intéressants.

Bien qu'aucune étude mécanistique n'ait encore été réalisée, le gain considérable d'activité des nanoparticules de Cisplatine bis- et mono-squalène peut s'expliquer de différentes manières. Les nanoparticules des dérivés squalénisés possèdent des propriétés pharmacocinétiques différentes de celles du Cisplatine, bénéficiant d'une meilleure pénétration intracellulaire. L'administration d'un complexe du Platine (IV) squalénisé permet également de ralentir la dégradation par les espèces soufrées contenues dans les milieux physiologiques, et par le phénomène d'aquation. De plus, la libération progressive du principe actif, par réduction du complexe du platine (IV) en platine (II) permet de prolonger l'effet biologique. Enfin, la formulation nanoparticulaire permet généralement d'effectuer un ciblage passif par effet EPR, augmentant les concentrations en principe actif au niveau du tissu tumoral. Tous ces phénomènes se traduisent par une biodisponibilité et une pharmacocinétique améliorée, rendant ces nouvelles formulations très actives.

La différence de profil pharmacocinétique des deux prodrogues squalénisées peut s'expliquer de différentes manières. Les nanoparticules de ces deux complexes du Platine (IV) s'organisent selon des structures supramoléculaires différentes, ce qui doit influencer sur leur stabilité et sur la vitesse de libération des prodrogues. De plus, pour être actif, ces complexes du Platine (IV) doivent être réduits en platine (II). Le fait de comporter deux ligands axiaux succinato ou un ligand succinato et un autre hydroxo influence sans aucun doute la cinétique de réduction du complexe.

Ces différents phénomènes pourraient expliquer l'effet retard observé pour le Cisplatine bis-squalène **205** lors de l'étude *in vivo*, ainsi que la modeste activité *in vitro* de ce complexe.

Toutes ces hypothèses devront être vérifiées. En particulier, nous envisageons d'effectuer des études de voltamétrie cyclique, en collaboration avec le Laboratoire d'Electrochimie et de Synthèse Organique dirigée par le Professeur Thierry Martens, qui permettront de déterminer les potentiels de réduction des deux complexes squalénisés du Cisplatine. Des études de stabilité des nanoparticules dans les milieux de culture complémentés ainsi que dans différents sérums sont envisagées. Enfin, il sera intéressant d'observer l'internalisation des nanoparticules sur la lignée cellulaire Panc-1. Le dosage du platine intracellulaire et celui du platine fixé à l'ADN sera effectué avec le Dr. Gérard Bastian de la Pitié-Salpêtrière. Nous espérons que les résultats obtenus permettront d'expliquer la différence d'activité *in vivo* et *in vitro* des deux complexes squalénisés.

II.4. Squalénisation de l’Ifosfamide

II.4.1. Introduction

Les oxazaphosphorines sont des agents alkylants dont les principaux représentants sont le Cyclophosphamide (**211**), l’Ifosfamide (IFO, Isophosphamide, **25**) et le Trofosfamide (**212**).³⁰⁷ Ce sont des agents thérapeutiques puissants possédant des activités antitumorales et immunosuppressives. L’Ifosfamide et le Cyclophosphamide sont des isomères structuraux ne différant que par la position d’un des deux groupements chloroéthyle, indiqués dans le traitement des sarcomes et des tumeurs cérébrales. Le Trofosfamide quant à lui, possède un groupement alkylant identique supplémentaire et est actuellement en phase III pour le traitement des sarcomes des tissus mous (**Figure 88**).

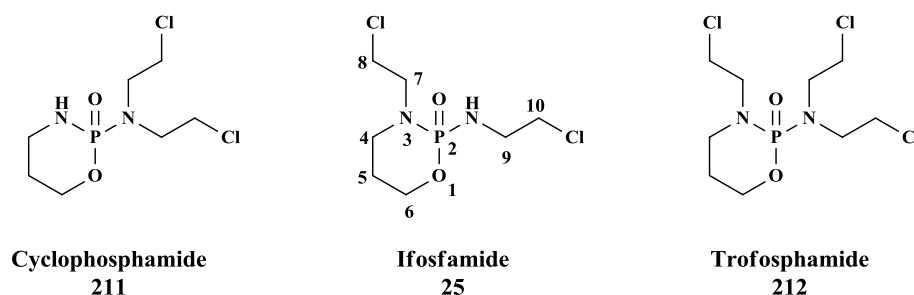


Figure 88. Structures moléculaires des oxazaphosphorines

L’Ifosfamide (**25**) est une prodrogue qui doit être métabolisée pour permettre la libération de l’isophosphoramide **215**, la moutarde à l’azote responsable de l’activité alkylante.³⁰⁸ La première étape de cette activation, effectuée par les cytochromes P450, est une hydroxylation du cycle oxazaphosphorine menant au 4-hydroxy-ifosfamide **213**. Le composé **213** est en équilibre avec sa forme tautomère, l’aldo-ifosfamide **214**, qui via une réaction de type rétro-Michael mène à l’isophosphoramide **215**, la substance active, et à un sous-produit toxique : l’acroléine (**216**).³⁰⁹ L’aldo-ifosfamide **214** peut également être oxydé par l’aldéhyde deshydrogénase en métabolite inactif, le carboxy-ifosfamide **217** (**Schéma 80**).

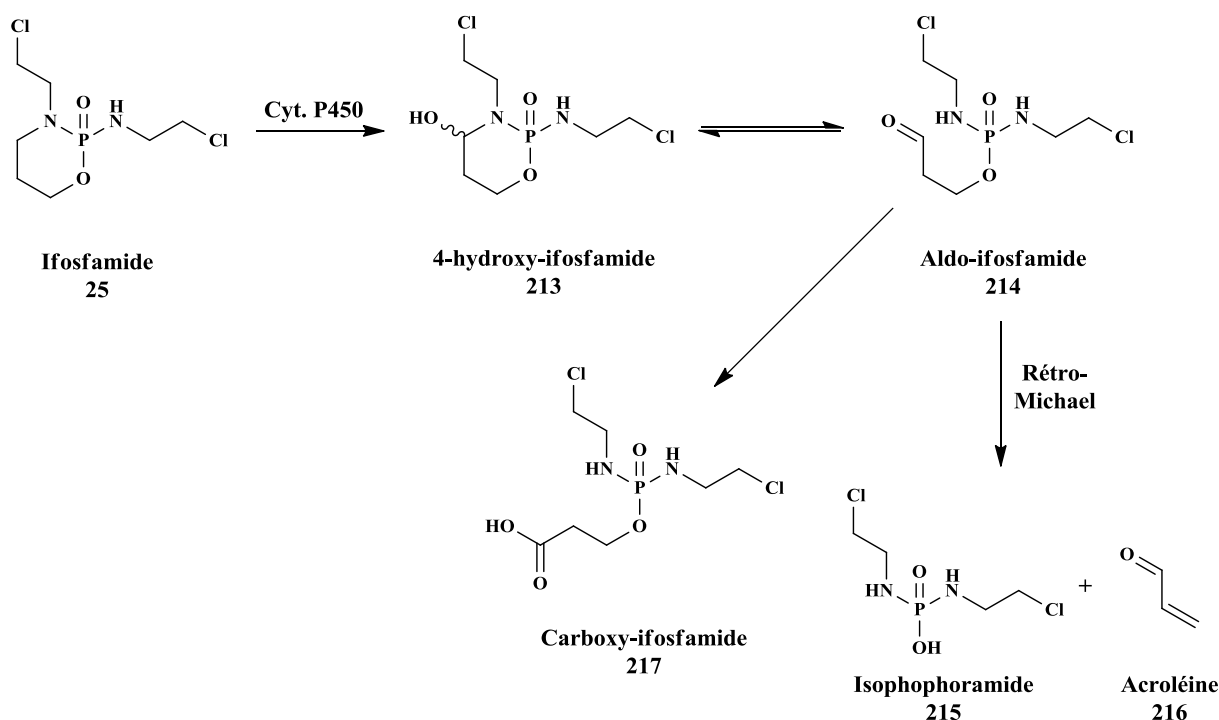


Schéma 80. Voie de métabolisation intracyclique de l'Ifosfamide.³⁰⁹

L'isophosphoramide **215** formé au cours de ce processus est en équilibre avec sa forme aziridinium dans le milieu physiologique. C'est cet intermédiaire aziridinium électrophile qui réagit avec les acides nucléiques comme la guanidine pour former des adduits ADN/acide nucléique, rendant la chaîne d'ADN non fonctionnelle. Ce mécanisme d'action s'applique également aux autres moutardes à l'azote et aux oxazaphosphorines. Ces aziridines peuvent être désactivées par addition nucléophile de molécules soufrées comme le glutathion.³¹⁰ Enfin les adduits isophosphoramide/ADN peuvent être réparés par des enzymes spécifiques (**Schéma 81**).

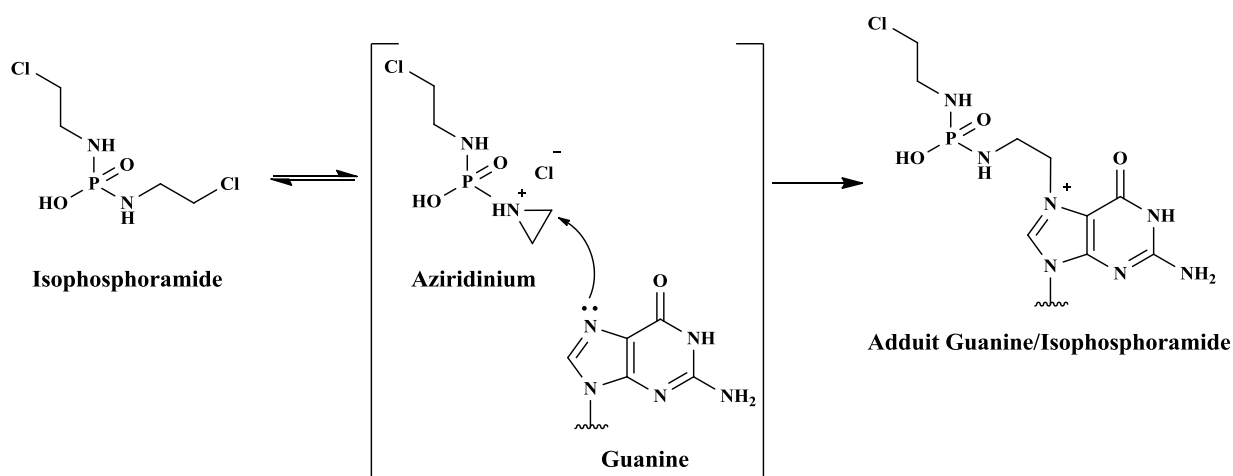


Schéma 81. Mécanisme d'action de l'isophosphoramide **215**.

La métabolisation par les cytochromes P450 n'est toutefois pas régiosélective et peut également conduire à une oxydation des chaînes latérales en carbinolamines qui par rétroaldolisation conduisent à des métabolites inactifs **218a**, **218b** et **218c**, ainsi qu'au chloroacétaldéhyde **219**, responsable de la néphrotoxicité et de la neurotoxicité des traitements à base d'Ifosfamide. La surexpression de ces cytochromes cataboliques responsables de l'inactivation de l'Ifosfamide constitue un mécanisme de résistance fréquent (**Schéma 82**).^{311,312}

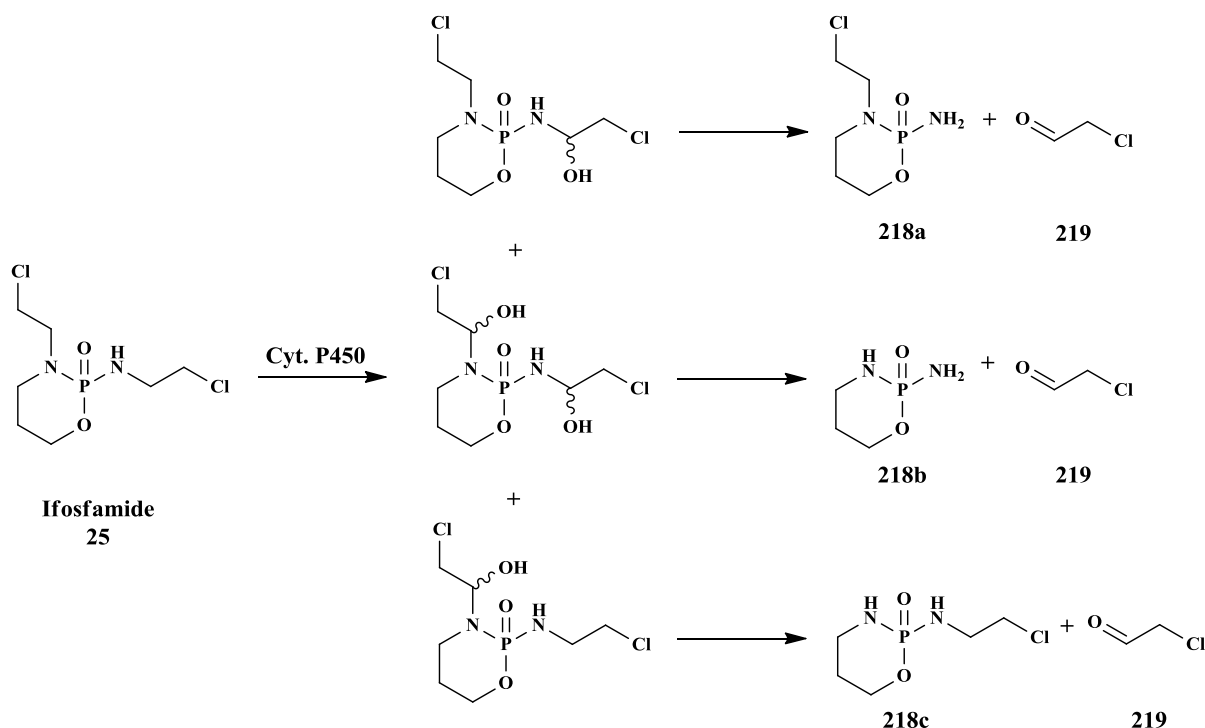


Schéma 82. Voie de métabolisation extracyclique de l'Ifosfamide.³⁰⁹

La toxicité de l'Ifosfamide est donc principalement due à la formation de deux puissants électrophiles, le chloroacétaldéhyde (**219**) et l'acroléine (**216**).

Le Mesna (mercaptoéthanesulfonate de sodium, Uromitexan®, Mesnex®, Baxter) a été développé afin de prévenir l'urotoxicité provoquée par l'acroléine lors de l'administration prolongée de l'Ifosfamide.³¹³ Cette molécule soufrée permet de détoxifier l'acroléine par une addition 1,4. Küpfer et coll. ont tenté de remédier aux problèmes de neurotoxicité, en administrant du bleu de méthylène, qui permet de restaurer l'activité mitochondriale (**Figure 89**).³¹⁴ Il s'est avéré ultérieurement que l'administration de ce composé n'était efficace que temporairement.

Afin de prévenir la toxicité du chloroacétaldéhyde (**219**), de nombreuses stratégies ont été développées, comme l'administration de composés détoxifiants, ou encore l'administration d'inhibiteurs spécifiques des cytochromes P450 responsables du métabolisme des chaînes latérales de l'Ifosfamide, réduisant la formation du chloroacétaldéhyde (**219**).³¹⁵ Cependant, cette stratégie s'est avérée inadaptée à des patients traités par des composés anticancéreux eux-mêmes métabolisés dans le foie par les cytochromes P450.

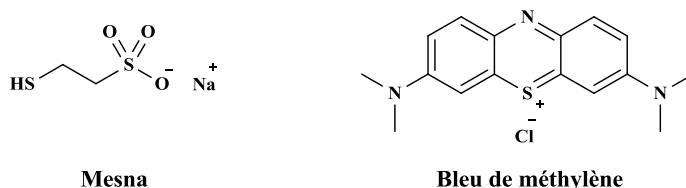


Figure 89

Une autre possibilité est la modification structurale de l'Ifosfamide, soit sur ses chaînes latérales, soit sur le cycle oxazaphosphorine, empêchant ou ralentissant la métabolisation extracyclique de l'Ifosfamide. Par exemple, la méthode développée par Paci et coll.³¹⁶ consiste à réduire l'oxydation des chaînes latérales, en synthétisant des dérivés méthylés de l'Ifosfamide en positions 7 et 9. La métabolisation de tels composés sur les chaînes latérales par les cytochromes P450 cataboliques est fortement ralentie et ne conduit plus au chloroacétaldéhyde (**219**) mais à la 3-chloroacétone (**225**) beaucoup moins toxique. Le métabolisme hépatique de l'isomère le plus actif, qui est le (7*S*,9*S*)-diméthyl-ifosfamide (**220**), a été étudié *in vitro* sur des microsomes de rat.³⁰⁹ Comme dans le cas de l'Ifosfamide, la première voie métabolique mène au composé **221** hydroxylé sur le cycle oxazaphosphorine puis au diméthyl-isophosphoramide **222** et à l'acroléine **216**. La seconde voie métabolique implique l'hydroxylation des chaînes latérales et conduit à la formation des dérivés deschloropropylés inactifs **223** et **224**, et à la chloroacétone **225** (**Schéma 83**).³⁰⁹

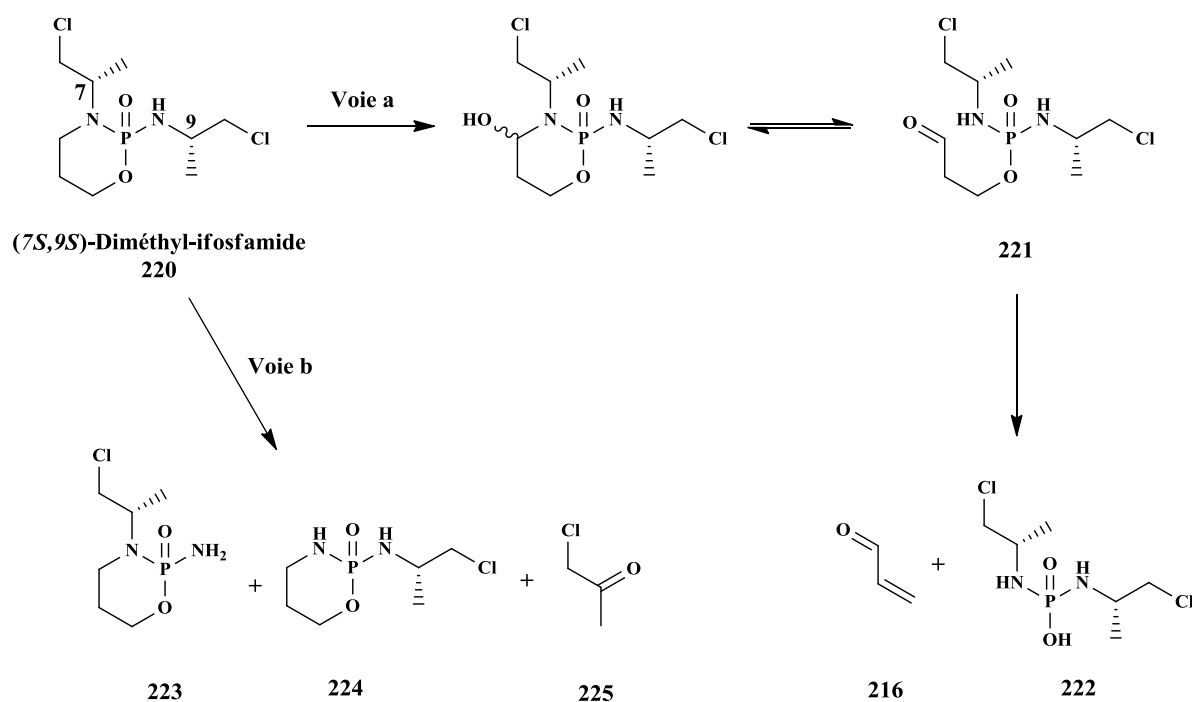


Schéma 83³¹⁷

Toutefois, même si ces dérivés diméthylés sont de meilleurs agents alkylants et possèdent une activité cytotoxique accrue par rapport au composé parent, les études précliniques sont freinées par la complexité de la synthèse.

Une dernière stratégie consiste en la synthèse de dérivés de l’Ifosfamide, oxydés en position 4 du cycle oxazaphosphorine. De tels composés sont actifs sans métabolisation par les cytochromes P450, par formation d’un immonium suivie de l’addition d’une molécule d’eau (**Schéma 84**).

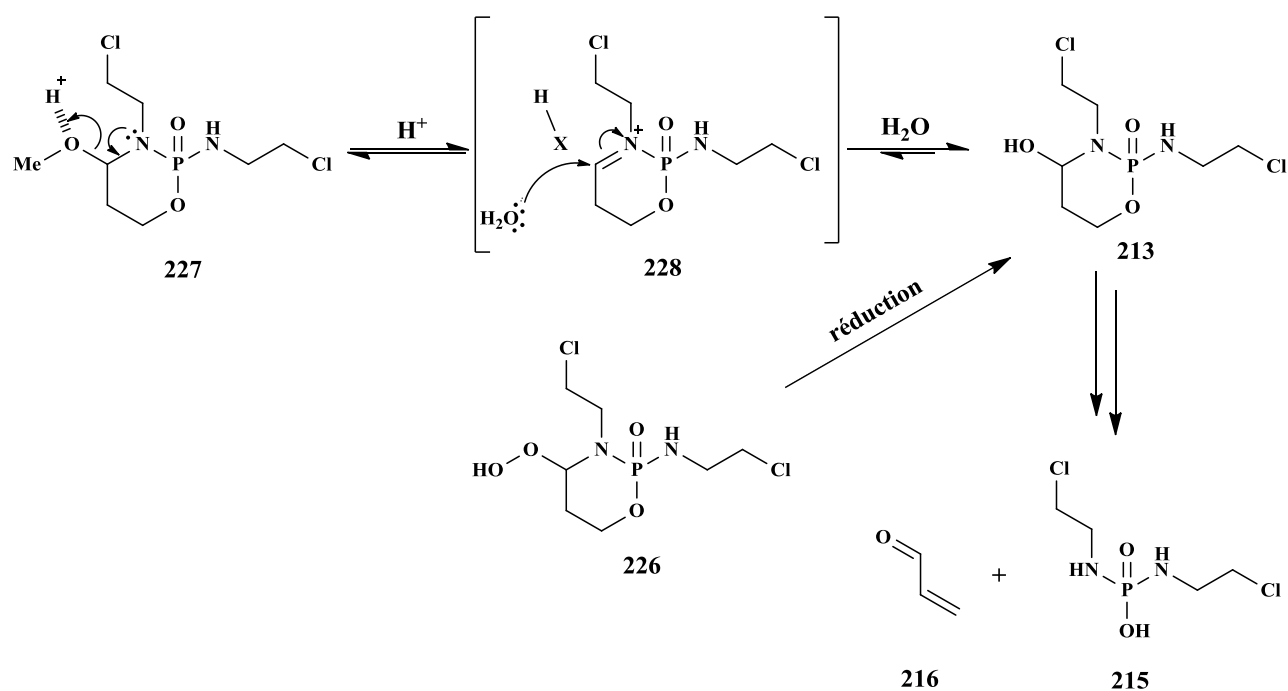


Schéma 84. Mécanisme de formation de l'isophosphoramide **215** à partir des dérivés pré-activés **226** et **227** de l'Ifosfamide.

Les activités anticancéreuses *in vivo* du 4-hydroxy-ifosfamide (**213**) et du 4-hydroperoxy-ifosfamide (**226**) ont été évaluées par Struck et coll.³¹⁸ et Makino et coll.³¹⁹ chez la Souris sur des modèles de leucémie murine L1210. Si le 4-hydroxy-ifosfamide (**213**) est le métabolite naturel de l'Ifosfamide (**25**), il est trop instable pour être utile en thérapeutique. En revanche, l'administration du 4-hydroperoxyifosfamide (**226**) semblait à priori être une stratégie efficace, ce composé étant plus stable et menant spontanément au métabolite **213** dans les conditions physiologiques. Les tests *in vivo* ont montré d'une part que le 4-hydroperoxy-ifosfamide (**226**) était plus actif que le dérivé hydroxylé **213**, et que ce même hydroperoxyde **226** était également plus efficace que l'Ifosfamide à des doses 4 fois moindres. D'autre part, Makino et coll. ont mis en évidence que la stéréochimie du phosphore n'avait aucune influence sur l'activité biologique de l'hydroperoxy-ifosfamide (**226**), puisque le diastéréoisomère *S* (**226a**) possède la même activité biologique que le *R* (**226b**). Toutefois, même si ces hydroperoxydes sont plus stables que leurs homologues hydroxylés, ceux-ci demeurent toujours trop instables pour un développement en clinique (**Figure 90**).

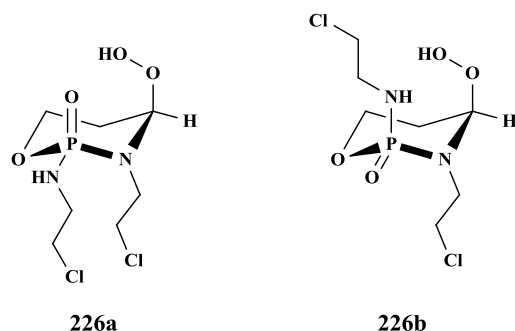


Figure 90

Les dérivés méthoxylés de l’Ifosfamide **213a** et **213b** (dans les proportions 60/40 ; détermination de la stéréochimie par Infrarouge $\nu_{\text{P=O}} = 1257$ ou 1237 cm^{-1}) en position 4’ ont été préparés par Paci et coll.,³²⁰ par oxydation anodique de l’Ifosfamide dans le méthanol. L’évaluation de l’activité biologique *in vitro* a montré que ces deux composés étaient plus actifs que l’Ifosfamide sur la lignée du carcinome humain KB. Toutefois ces composés n’ont toujours pas été testés chez l’animal (**Figure 91**).

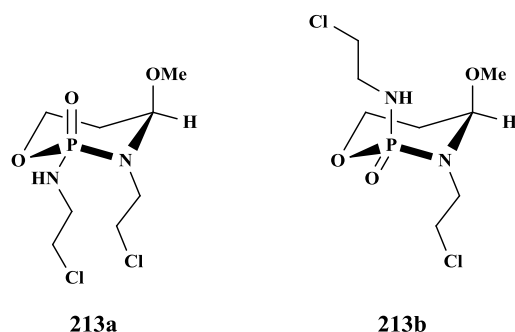


Figure 91

II.4.2. Objectif des travaux

Pour notre part, nous avons décidé de développer une forme nanoparticulaire de l’Ifosfamide présentant en outre l’avantage de ne pas avoir besoin d’une activation par les cytochromes P450. Nous appuyant sur les travaux de Paci et coll. concernant les dérivés oxydés en position 4 du cycle oxazaphosphorine, nous nous sommes orientés vers la synthèse de dérivés squalénisés de l’Ifosfamide sur cette même position. Nous avons choisi de relier la chaîne squalène soit par une

fonction O,N-acétal (**229**), soit par un groupe aminométhylsulfanyle (**230**) à priori plus résistant à l'hydrolyse. Deux dérivés **229** et **230** seront synthétisés, l'un à partir du trisnor-squalénol **159**, le second à partir du *N*-(mercaptoéthyl)-trisnor-squalénamide **231** (**Figure 92**).

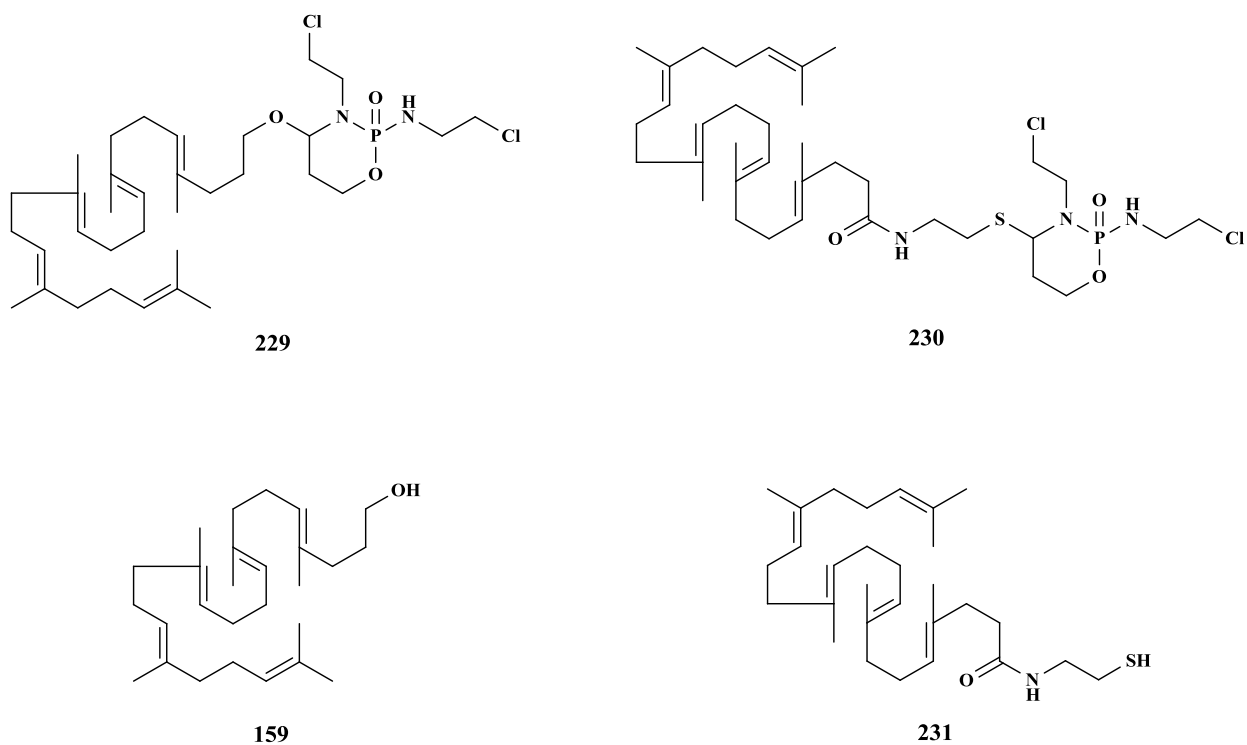


Figure 92

Les propriétés d'auto-assemblage seront évaluées puis les nanoparticules obtenues seront caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et Microscopie Electronique. Enfin, les activités anticancéreuses *in vitro* seront étudiées sur les différentes lignées disponibles à Châtenay-Malabry, ainsi qu'à l'IGR dans l'équipe d'Angelo Paci, sur des lignées humaines de gliome et de sarcome d'Ewing. En fonction des résultats, un modèle d'évaluation de l'activité anticancéreuse *in vivo* sera établi.

II.4.3. Exposé des travaux

*II.4.3.1. Synthèse des dérivés squalénisés **229** et **230** de l'Ifosfamide*

Il nous fallait dans un premier temps développer une voie de synthèse efficace des deux dérivés **229** et **230**. Une première stratégie consistait à effectuer l'oxydation anodique de l'Ifosfamide en présence d'un large excès de trisnor-squalénol **159** ou de *N*-squalénoyl-cysteamide **231**.

L'oxydation anodique de l'Ifosfamide conduit à un ion immonium intermédiaire **228** sur lequel peut s'additionner un nucléophile externe comme le méthanol ou un alcool plus lourd. Par exemple, cette oxydation effectuée dans le méthanol en présence de tosylate de tétraéthylammonium avec un courant de 2,2 F/mol a permis d'isoler le 4-méthoxy-ifosfamide **227** avec un rendement de 84 % sous forme d'un mélange de 2 diastéréoisomères dans les proportions 60/40.³²⁰

De manière analogue, l'oxydation anodique en présence d'alcool amylique conduit à l'adduit **232**, dont la stéréochimie n'a pas été attribuée, mais avec un rendement beaucoup plus faible à cause du fait qu'il n'est pas possible d'effectuer l'électrolyse avec un solvant aussi lipophile. Il faut donc opérer dans l'acétonitrile en présence d'une quantité limitée d'alcool. Le meilleur rendement est obtenu en présence de 30 équivalents d'alcool amylique (**Schéma 85**).³²¹

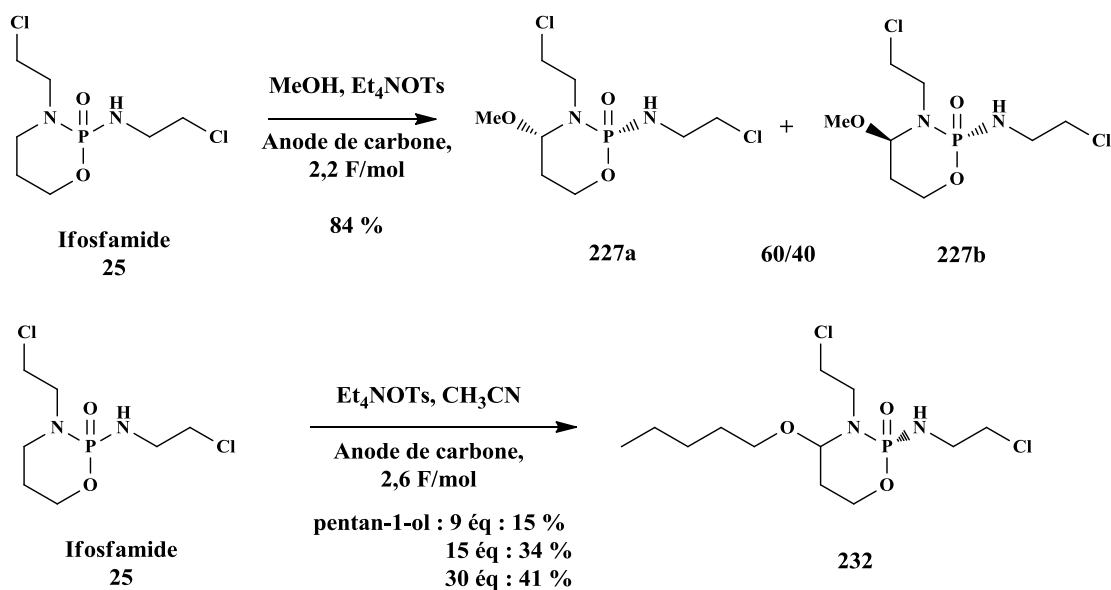


Schéma 85. Synthèse du 4-méthoxy-ifosfamide **227** et du 4-pentoxy-ifosfamide **232** par oxydation anodique de l'Ifosfamide.

En ce qui concerne la squalénisation de l'Ifosfamide, cette stratégie d'oxydation anodique directe semble très difficilement réalisable. Les dérivés squalénisés fonctionnalisés nécessitent plusieurs étapes de synthèse pour leur préparation et ne peuvent donc pas être utilisés en très large excès comme l'alcool amylique. Il est en plus à craindre que même en utilisant un large excès de trisnor-squalénol **159**, le rendement soit encore plus faible qu'avec le pentanol, du fait d'un encombrement stérique plus important. Enfin, étant donné que les thiols se dimérisent en milieux oxydants, cette stratégie ne serait pas applicable pour la préparation du squalène-cystéamide-ifosfamide **230**.

Nous nous sommes tournés vers une seconde stratégie qui consiste en la méthylation anodique de l'Ifosfamide, suivie de la formation de l'ion immonium **228** en présence d'un acide de Lewis, puis de l'addition d'un alcool ou d'un thiol sur cet immonium. Thomas Storme a étudié cette stratégie pour la synthèse du 4-pentoxy-ifosfamide **232**.³²¹ Il a testé l'addition du pentanol sur le 4-méthoxy-ifosfamide **227** en présence de divers acides de Lewis, comme le triflate de triméthylsilyle, l'éthanolate de titane (IV) ou le trifluorure de bore. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le trifluorure de bore, utilisé en quantité catalytique (10 %) ou semi-catalytique (50 %) suivi de l'ajout d'un équivalent de pentan-1-ol. Le 4-pentoxy-ifosfamide **232** a pu être isolé avec des rendements respectifs de 59 et 48 % (**Schéma 86**).³²¹

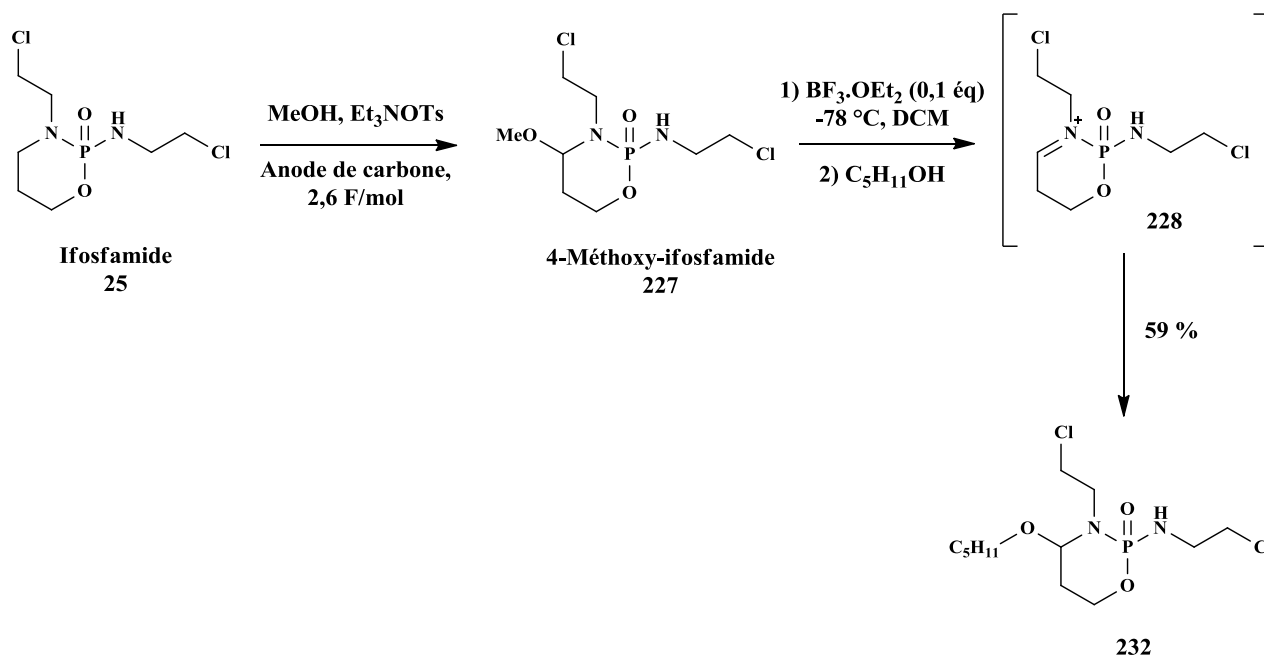


Schéma 86

Nous avons envisagé la synthèse du 4-squalénoxy-ifosfamide **229** selon cette méthode. Le 4-méthoxy-ifosfamide **227** a donc été traité par 1 équivalent de $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ à -78°C , puis par 2 équivalents de trisnor-squalénol **159**, pour fournir après traitement en milieu basique et purification par chromatographie le 4-squalénoxy-ifosfamide **229** avec un rendement de 53%, sous forme d'un mélange de 2 diastéréoisomères dans les proportions 75/25 (détermination du ratio par RMN du phosphore) (**Schéma 87**). Compte tenu de la très grande complexité des spectres RMN, il n'a pas encore été possible d'attribuer la stéréochimie de ces isomères.

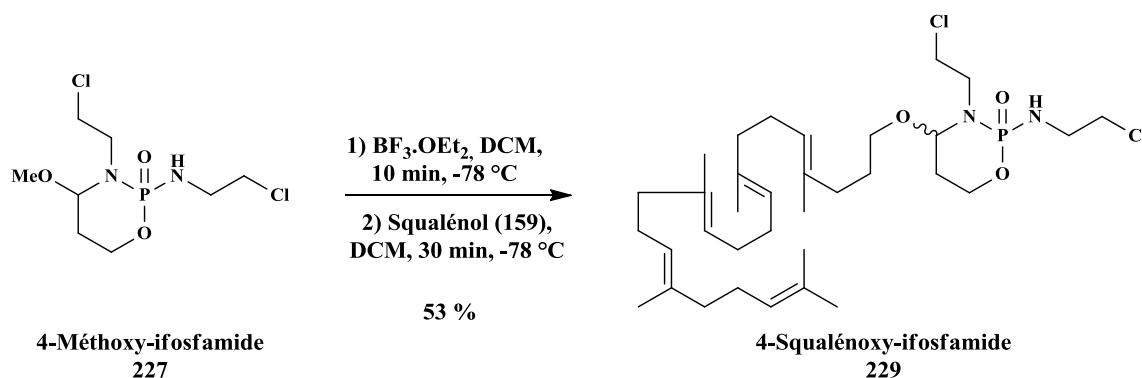


Schéma 87

Nous nous sommes ensuite tournés vers la synthèse de l'analogue soufré **230**. Pour cela nous avons tout d'abord synthétisé le *N*-(mercaptoéthyl)-trisor-squalénamide **231**. Celui-ci a été préparé par addition nucléophile de la cystéamine sur l'ester de *N*-hydroxysuccinimide de l'acide squalénique **233**. L'amido-thiol **231** a été isolé avec un rendement de 72 % (**Schéma 88**).

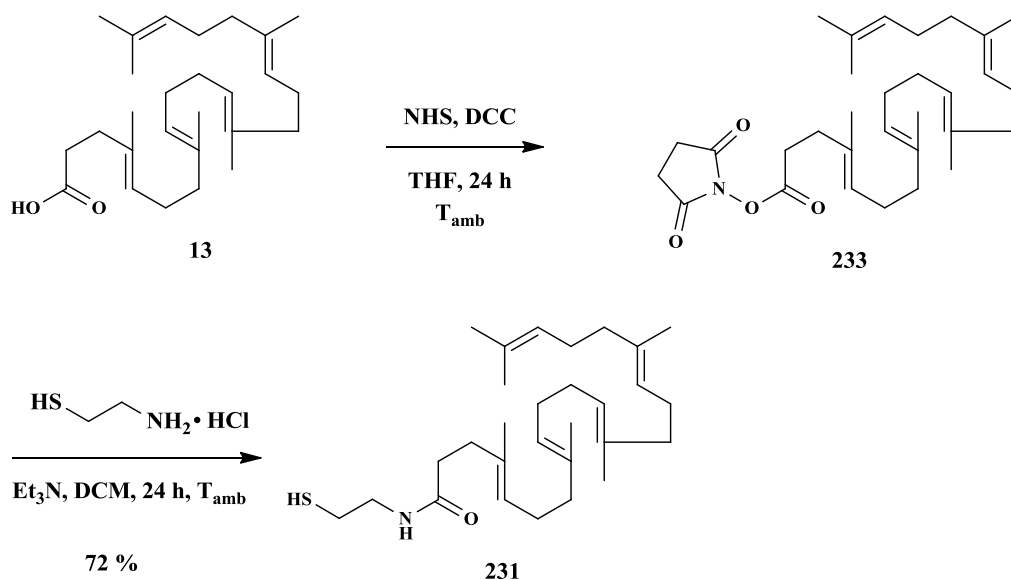


Schéma 88

Ce dérivé a ensuite été couplé à l'Ifosfamide dans les mêmes conditions que le trisor-squalénol **159**, pour fournir le conjugué **230** avec un rendement de 48 % sous forme d'un mélange de diastéréoisomères dans les proportions 80/20 (détermination du ratio par RMN du proton) inséparables par chromatographie sur colonne de gel de silice (**Schéma 89**).

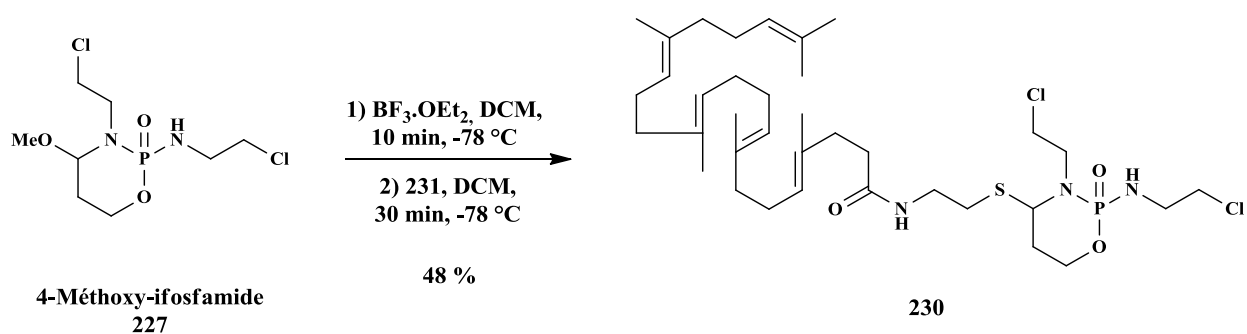


Schéma 89

II.4.3.2. Préparation et caractérisation des nanoparticules

Avec des quantités suffisantes de ces deux dérivés squalénisés de l'ifosfamide, nous nous sommes intéressés à la préparation des nanoparticules selon la méthode de nanoprécipitation-évaporation de solvant. Ces conditions ont été mises au point sur le 4-squalénoxy-ifosfamide, en faisant varier la concentration dans le solvant organique ainsi que la nature de ce solvant, en conservant une concentration constante dans l'eau à 1 mg/mL. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 16**. L'addition d'une solution de **229** à 5 mg/mL dans l'acétone permet d'obtenir des nanoparticules de diamètre moyen de 163 nm avec un indice de polydispersité correct de 0,16. Dans l'éthanol les particules obtenues sont plus polydisperses. Une forte concentration dans le solvant organique est cruciale pour obtenir des nanoparticules de taille convenable.

Solvant organique	Concentration (mg/mL)	Diamètre moyen (nm)	PDI
éthanol	1	157,7	0,21
	5	131,5	0,27
acétone	1	220,6	0,23
	5	163,3	0,16

Tableau 16. Diamètre moyen et PDI des nanoparticules du 4-squalénoxy-ifosfamide **228** en fonction de la nature du solvant organique et de la concentration de la solution organique.

Dans ces conditions optimales, des nanoparticules du 4-(*N*-éthylmercaptosqualénamide)-ifosfamide **230** de 159 nm de diamètre moyen ont été obtenues avec un indice de polydispersité de 0,052. Le fort potentiel Zêta observé (−52,3 mV) est en accord avec la stabilité de ces nanoparticules. Les nanoparticules du 4-squalénoxy-ifosfamide **229** ont été observées par Microscopie Electronique en Transmission après congélation dans l'éthane liquide. Les clichés obtenus ne donnent pas d'information quant à une organisation supramoléculaire spécifique. Seules des nanoparticules sphériques de diamètre moyen compris entre 50 et 200 nm sont observées (**Figure 93**).

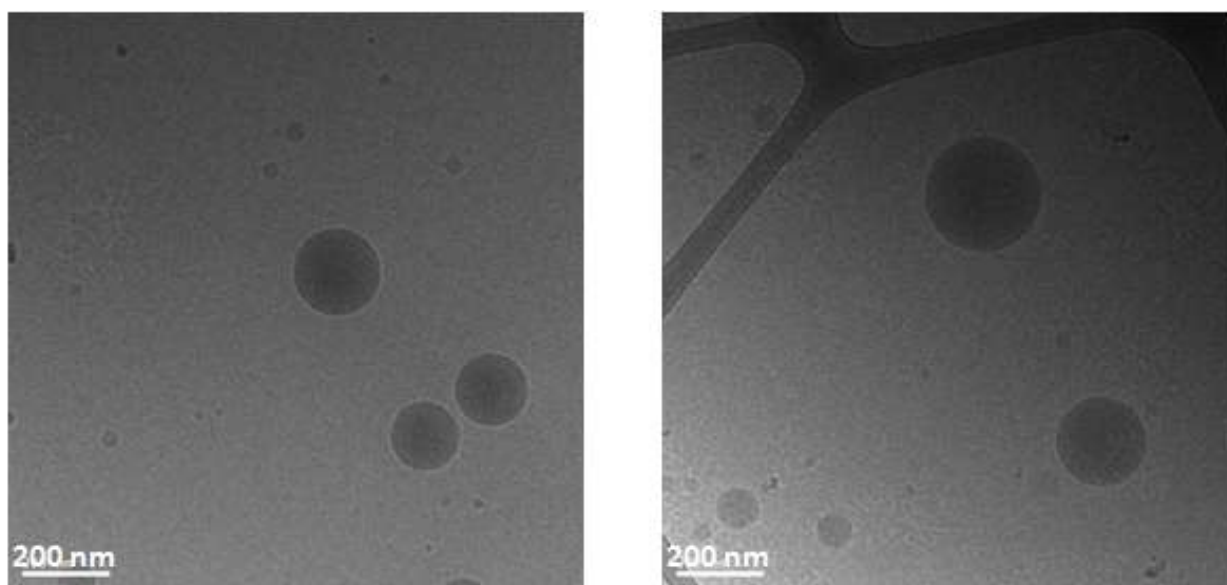


Figure 93. Sélection d'image de CryoTEM des nanoparticules de 4-squalenoxy-ifosfamide **229** à 2 mg/mL dans l'eau.

II.4.3.3. Evaluation biologique in vitro

Les activités anticancéreuses *in vitro* des nanoparticules du 4-(*N*-éthylmercaptosqualénamide)-ifosfamide **230** et du 4-squalénoxy-ifosfamide **229** ont été évaluées au Laboratoire ainsi qu'à L'institut Gustave Roussy, sur des lignées humaines et murines.

Nous avons testé au Laboratoire ces nanoparticules sur les lignées A549 (adénocarcinome pulmonaire humain), MCF-7 et MCF-7 MDR (adénocarcinome du sein humain, lignées cellulaires sauvage et « multi-drug résistant »), KB 3.1 (carcinome de l'épiderme humain), MiaPaCa-2 (carcinome du pancréas humain), B16F10 (mélanome de la peau murin) et M109 (carcinome pulmonaire murin). Après 3 jours d'incubation à 37 °C, les nanoparticules du dérivé **230** se sont avérées bien plus actives que l'Ifosfamide, avec des CI_{50} allant de 3 à 17 μ M, hormis sur la lignée MCF-7 MDR (CI_{50} = 80 μ M), alors que la CI_{50} n'est jamais atteinte avec l'Ifosfamide qui doit être oxydé en C-4 par les cytochromes P450 et est par conséquent dénué d'activité (CI_{50} > 100 μ M) sur ces modèles. Les nanoparticules du dérivé **229** sont globalement moins efficaces que celles du dérivé **230**, avec des CI_{50} allant de 32 à 79 μ M, sauf pour la lignée M109 pour laquelle la CI_{50} n'est pas atteinte à moins de 100 μ M (**Tableau 17**).

CI ₅₀ (μM)							
Composé	A549	MCF-7	MCF-7 MDR	KB 3.1	Mia PaCa-2	B16F10	M109
229	32,5	43,6	78,8	50	32,5	73	>100
230	5,3	10,9	80	3,0	4,4	16,9	9,2
Ifosfamide	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Tableau 17. Activité anticancéreuse *in vitro* des nanoparticules des dérivés **229** et **230** et de l’Ifosfamide sur différentes lignées cellulaires humaines et murines.

Les dérivés méthoxylés **227a** et **227b** ont quant à eux été testés sur la lignée KB et affichent des CI₅₀ d’environ 20 μM. Ces valeurs sont en accord avec les activités anticancéreuses *in vitro* obtenues pour les dérivés squalénisés **229** et **230** sur la lignée KB 3.1.

Ces nanoparticules ont également été testées à l’IGR sur les lignées SK-N-MC (Sarcome d’Ewing), UW 479 (Gliome humain) et IGR-OV1 (Adénocarcinome de l’ovaire humain). La même tendance se confirme sur ces lignées, puisque les nanoparticules du dérivé soufré **230** sont plus actives que l’Ifosfamide et que les nanoparticules de l’éther **229**, avec des CI₅₀ allant de 19 à 81 μM. La CI₅₀ n’est jamais atteinte à des concentrations inférieures à 100 μM pour l’Ifosfamide et le 4-squalénoxy-ifosfamide **229** (Tableau 18).

CI ₅₀ (μM)			
Composé	SK-N-MC	UW 479	IGR-OV1
229	>100	>100	>100
230	19	65	81
Ifosfamide	>100	>100	>100

Tableau 18. Activité anticancéreuse *in vitro* des nanoparticules des dérivés **229** et **230** et de l’Ifosfamide sur différentes lignées cellulaires humaines.

Ces résultats s'expliquent par le fait que les deux dérivés squalénisés **229** et **230** sont des dérivés préactivés de l'Ifosfamide, ne nécessitant pas une métabolisation par les microsomes hépatiques. Ainsi, la métabolisation en isophosphoramide **215** se fait plus rapidement, tout en évitant la seconde voie métabolique qui fournit des composés inactifs. Le dérivé soufré **230** s'est montré plus actif que le dérivé **229** sur toutes les lignées cellulaires testées, hormis la lignée MCF-7 MDR. Ceci pourrait s'expliquer par une meilleure stabilité permettant un passage membranaire accru.

II.4.4. Conclusion et Perspectives

Deux nouveaux dérivés préactivés squalénisés de l'Ifosfamide ont été synthétisés à partir du 4-méthoxy-ifosfamide, du squalénol et de *N*-(mercaptoéthyl)-squalénamide, par activation avec un acide de Lewis. Ces dérivés, obtenus avec des rendements de 48 et 53 % ont ensuite été soumis à différentes conditions de nanopréciipitation qui ont permis de préparer des nanoparticules sphériques de diamètre moyen allant de 130 à 220 nm.

Ces nanoparticules ont été évaluées sur le plan biologique, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines. Les résultats ont montré que les nanoparticules de 4-(*N*-éthylmercaptosqualénamide)-ifosfamide **230** étaient légèrement plus actives que celles du 4-squalénoxy-ifosfamide **229** et bien plus actives que l'Ifosfamide, du fait de leur nature de prodrogues préactivées.

Au vu des ces résultats très prometteurs, nous avons planifiés de tester ces nanoparticules *in vivo* sur un modèle de cancer développé chez la Souris, comme le sarcome d'Ewing pour lequel l'Ifosfamide est le traitement de référence. En cas de succès cette stratégie pourrait alors être appliquée aux autres oxazaphosphorines, le Cyclophosphamide et le Trofosfamide.¹⁰⁸

II.5. Synthèse de bola-médicaments

II.5.1. Introduction

La Gemcitabine-squalène et les prodrogues du Paclitaxel décrits dans le chapitre précédent sont des composés prometteurs, toutefois les taux de charge en principe actif, respectivement de 41 % et d'environ 60 %, sont encore faibles. Afin, d'augmenter ce taux de charge ou de combiner l'effet de deux drogues dans une même molécule, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux dérivés squalénisés ayant la forme d'une bola.

Le mot « bola » fait référence au nom des armes de jet, comprenant plusieurs masses sphériques (le plus souvent 2 ou 3) réunies par un ou plusieurs liens, qui sont utilisées par les gauchos d'Amérique du Sud pour capturer le bétail ou le gibier (**Figure 94**).

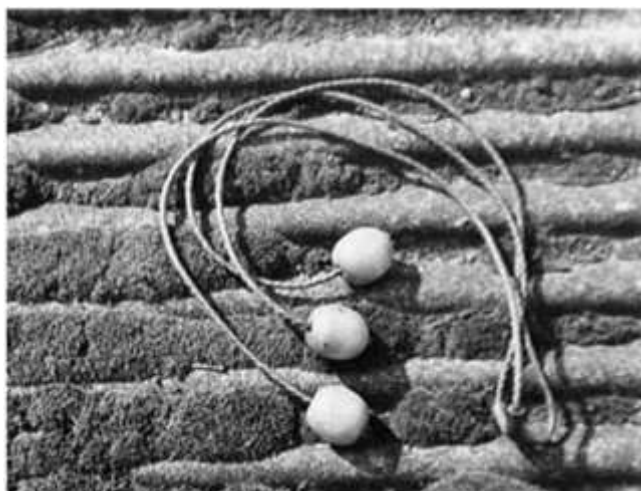


Figure 94. Photo de bola constitué de trois boules.

Les molécules ayant une forme de bola contiennent le plus souvent un squelette hydrophobe, constitué d'une ou plusieurs chaînes alkyles ou d'un stéroïde, et deux groupes hydrophiles à chaque extrémité du squelette hydrophobe. De telles molécules peuvent être qualifiées de « bola-amphiphiles ».³²²

Ces structures sont notamment retrouvées dans les membranes monocouches des archéobactéries (ou archées).^{323,324} Ces bactéries, capables de survivre dans des conditions extrêmes, comme les milieux volcaniques (dans l'acide sulfurique chaud) possèdent des membranes constituées de molécules amphiphiles comportant des fonctions éthers stables, remplaçant les fonctions esters retrouvées dans les lipides qui forment les membranes d'organismes plus communs. Le squelette hydrophobe contient des groupements méthines avec des substituants méthyles, qui aident à renforcer la membrane, en induisant des boucles et la formation de structures hélicoïdales. Ces groupements peuvent être remplacés par des unités cyclopentanes flexibles, permettant de fluidifier les membranes lipidiques (**Figure 95**).³²³

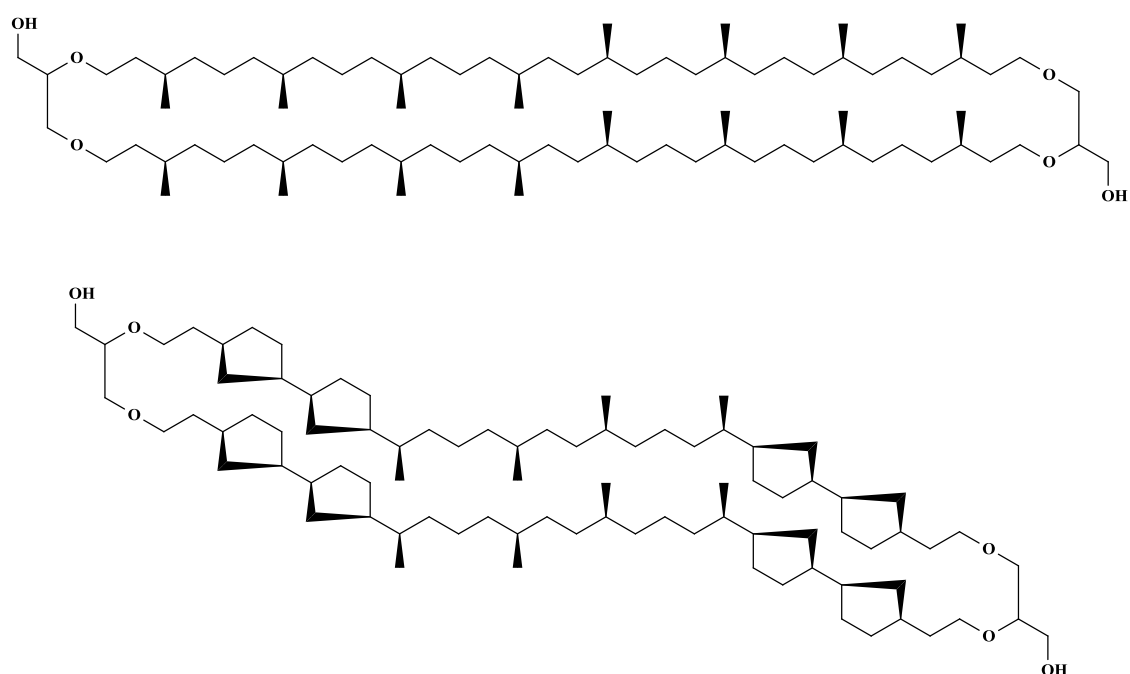


Figure 95. Molécules typiques retrouvées dans les membranes des archéobactéries. La première ne contient que des groupements méthines avec des substituants méthyles.

Ce type de molécule s'arrange de manière à former des membranes monocouches, avec deux faces hydrophiles et un cœur hydrophobe (**Figure 96**).³²³

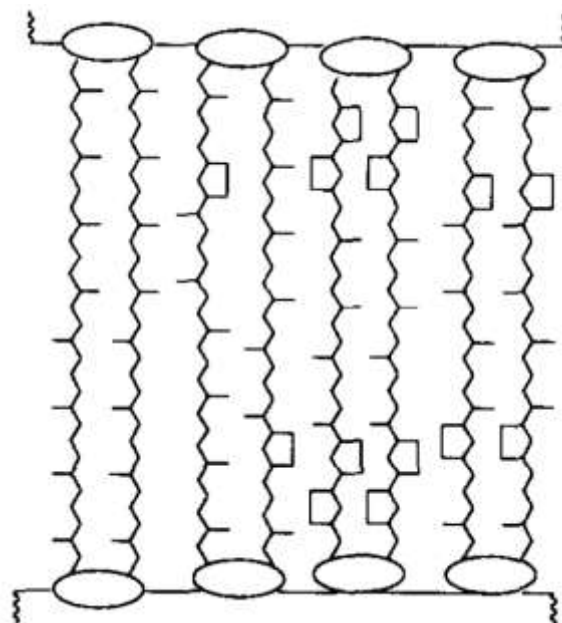


Figure 96. Modèle de membrane constituée de « bola-amphiphiles » chez les Archéobactéries.³²³

La préparation de bola-amphiphiles a suscité un fort intérêt à partir des années 1980, notamment pour leur capacité à s'organiser en structures intéressantes, comme les nanopuits, les nanotubes ou les membranes monocouches des archéobactéries. Ce type de molécule a également été utilisé comme vecteur lipidique permettant de délivrer des principes actifs encapsulés.³²⁵⁻³²⁷

Weissig et Torchilin ont par exemple, exploité les propriétés du chlorure de Déqualinium, une bola-amphiphile cationique, pour former des nanoparticules, permettant le transport d'oligonucléotides et leur adressage spécifique vers les mitochondries, dans le cadre de la thérapie génique. Il a été montré que le chlorure de Déqualinium formait des agrégats de 70 à 700 nm de diamètre par sonication. De plus, le remplacement des groupements méthyles du Déqualinium par des groupements aliphatiques hydrophobes, conférait à de telles molécules la capacité de former des vésicules d'environ 170 nm, très stables. La capacité de ces nanoparticules à se lier à l'ADN est 50 fois plus importante que celle des nanoparticules du chlorure de Déqualinium (**Figure 97**).³²⁶

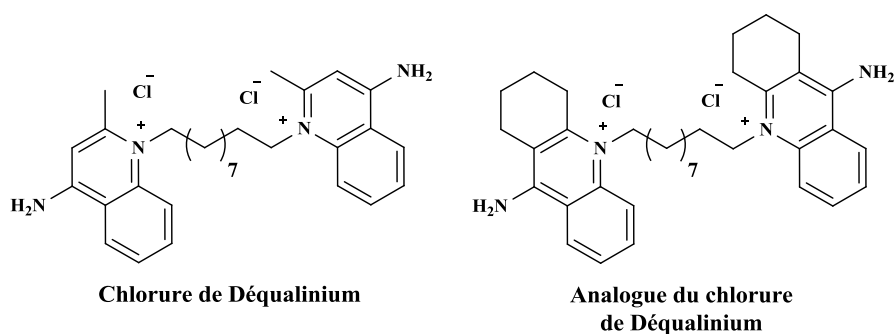


Figure 97

Muzzalupo et coll. ont développé des surfactants **234** et **235** ayant une forme de bola, composés d'une chaîne aliphatique de 16 carbones portant des éthers couronnes à chaque extrémité, reliés par des fonctions amides ou amines. Des vésicules d'une taille moyenne allant de 80 à 350 nm ont été préparées, en présence ou non de cholestérol pour transporter des principes actifs. L'efficacité de l'encapsulation a été évaluée avec le bleu de méthylène, utilisé comme modèle de molécule hydrophile. Il a été montré que les capacités d'encapsulation étaient maximales (de l'ordre de 15 à 40 %) lorsque les nanoparticules avaient une taille d'environ 100 à 180 nm de diamètre. Ces vésicules semblent donc être appropriées à une utilisation comme transporteurs de substances biologiquement actives (**Figure 98**).³²⁵

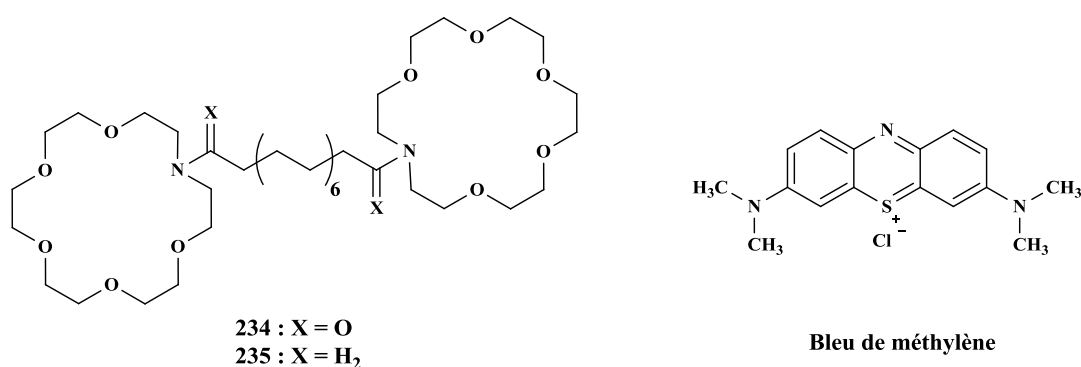


Figure 98

Des conjugués bola-amphiphiles dérivés de sucres ont également été développés par différents groupes de recherche, afin d'améliorer par exemple leur affinité pour certaines cellules cibles.

Rico-Lattes et coll.³²⁸ ont synthétisé des diamides bola-amphiphiles dérivés de la D-(+)-1,5-gluconolactone, par une double réaction d'amidification avec la bis-(6-amino)hexylamine. Si le composé **236** forme des nanoparticules sphériques dans l'eau, ce phénomène nécessite une ultrasonication, fournissant l'énergie nécessaire à leur formation. Afin de former ces nano-objets, sans apport d'énergie mécanique, le diamide **236** a été associé à des acides alcanedioïques, de longueur variable, pour fournir des espèces catanioniques **237a**, **237b** et **237c**. Les acides octanedioïque, dodécanedioïque et tétradécanedioïque ont été utilisés pour étudier l'influence de cette chaîne hydrophobe dans le processus de formation des nano-objets (**Schéma 90**).³²⁸

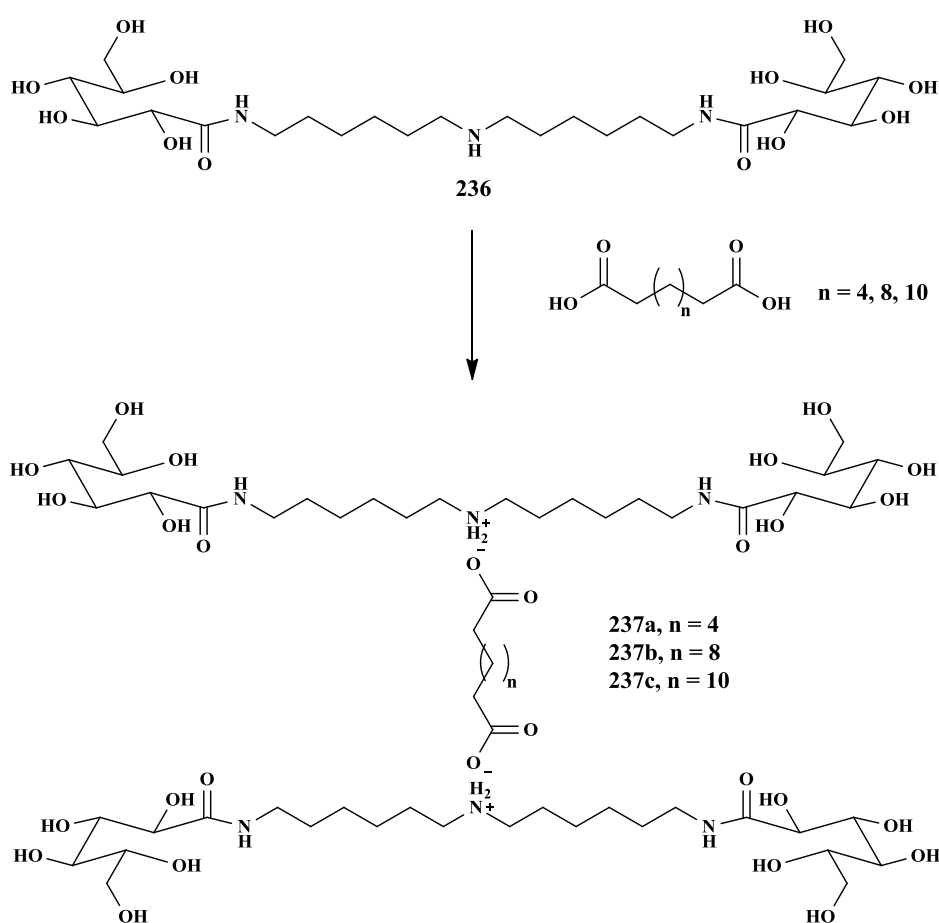


Schéma 90³²⁸

Il a été démontré que la longueur de cette chaîne alkyle jouait un rôle primordial dans la formation de nanoparticules. En effet, les mélanges catanioniques **237a** et **237b** ne forment pas spontanément des nanoparticules lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, tandis que le mélange **237c**, comportant la chaîne alkyle la plus longue (14 carbones), forme des nanoparticules monodisperses

d'une taille d'environ 100 nm de diamètre. La formation de nanoparticules uniquement dans le cas de l'acide alcanedioïque le plus long a été rationalisée par des études de modélisation moléculaire dans l'eau. Si les mélanges catanioniques **237a** et **237b** s'organisent dans l'eau en forme de balle, à cause de la faible longueur des acides alcanedioïques, dans le cas de l'espèce catanionique **237c**, deux conformations préférentielles sont obtenues. L'une, avec la chaîne alcanedioïque recourbée, qui induit un arrangement en forme de balle, l'autre où cette chaîne est complètement étendue, et où c'est la chaîne diamide qui est recourbée. Ce type d'assemblage devrait permettre de former des vésicules avec d'autres bola-amphiphiles, sans apport d'énergie mécanique, pour encapsuler et transporter des principes actifs hydrophiles (**Figure 99**).

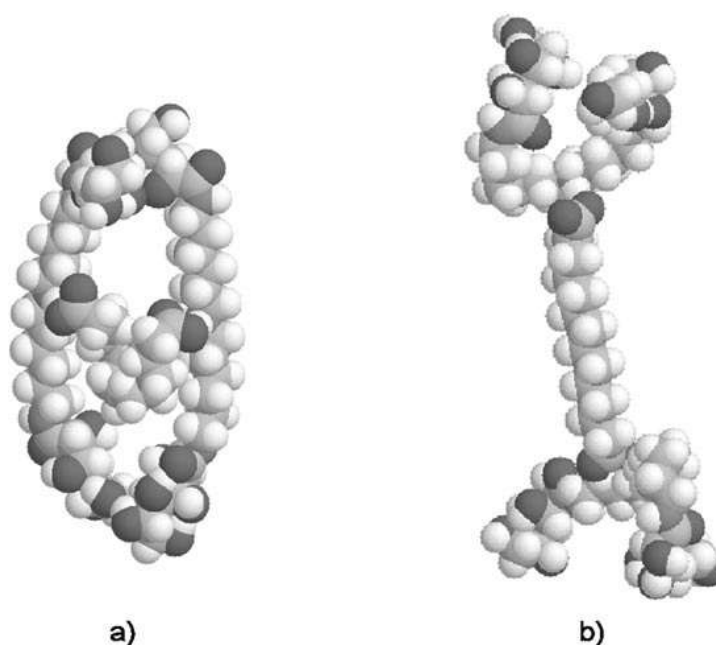


Figure 99. Modèles moléculaires du mélange catanionique **237c** : a) modèle avec l'espaceur recourbé ; b) modèle avec l'espaceur étendu.³²⁸

Plus récemment, quelques prodrogues bola-amphiphiles symétriques ou asymétriques ont été développées afin de former de nouvelles nanostructures originales et pour transporter efficacement un principe actif, ou encore combiner l'effet de deux composés antirétroviraux ou anticancéreux.

Afin d'étendre les propriétés réductrices de la Vitamine C (**238**) aux environnements hydrophobes, le conjugué bola-amphiphile **239** comportant une chaîne dodécanedioate et 2

molécules d'acide ascorbique, a été préparé par estérification du diacide **239** par la Vitamine C (**238**) (Schéma 91).³²⁹

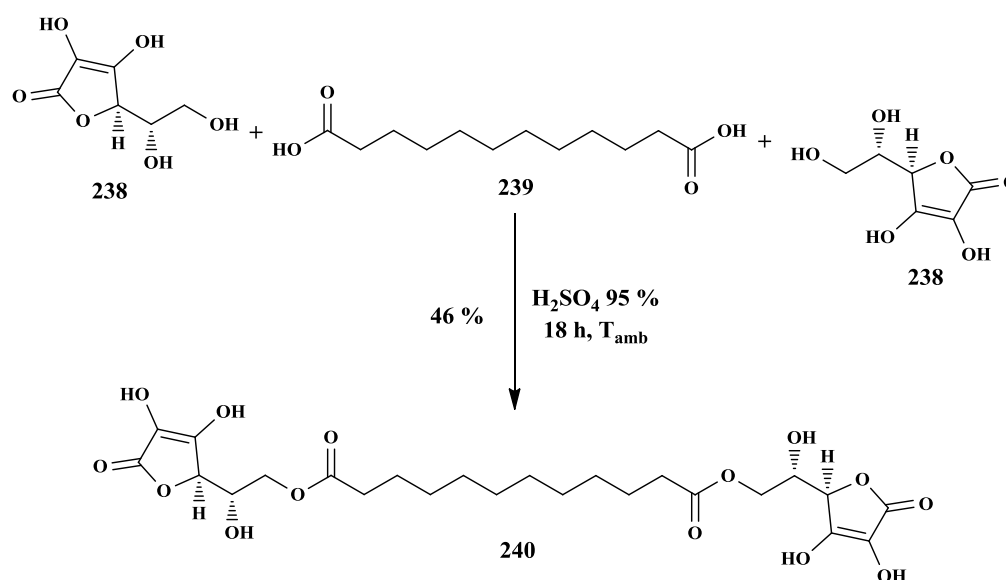


Schéma 91.

Des nanotubes organiques ont été obtenus, par chauffage et refroidissement successifs d'une suspension de bola-amphiphile **240** dans l'eau. Ces nanotubes, d'un diamètre d'environ 25 nm, ont été caractérisés par des expériences de CryoTEM et de diffusion des rayons X aux petits angles. L'activité réductrice de la Vitamine C est préservée dans ces nanotubes de Bola-Vitamine C. Par exemple, ils réduisent efficacement les ions Pd^{2+} à leur surface extérieure, permettant la production de nanomatériaux métalliques.³²⁹

Depuis 2008, Jin et coll. ont décrit divers systèmes associant différents principes actifs capables de s'auto-organiser. Ils se sont particulièrement intéressés aux nucléosides antirétroviraux comme la Didanosine (ddI) et la Zidovudine (AZT, **16**).³³⁰⁻³³⁴

Une molécule bola-amphiphile **242**, comportant une chaîne hydrophobe pentadécanedioate et 2 molécules de Zidovudine (**16**) à chaque extrémité, a notamment été synthétisée en 2 étapes (Schéma 92).³³¹ Si ce composé amphiphile forme spontanément des vésicules dans l'eau, celles-ci sont très instables, et s'agrègent en quelques heures seulement. L'utilisation de surfactants comme le Tween 20 et l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) permet de stabiliser ces nanoparticules d'une taille d'environ 150 nm, en prévenant l'aggrégation. L'évaluation biologique sur un modèle de

cellules MT4 a montré une activité anti-VIH équivalente à celle de l’AZT (**16**). Des études *in vivo* sont envisagées pour démontrer l’efficacité de ce système nanoparticulaire.³³¹

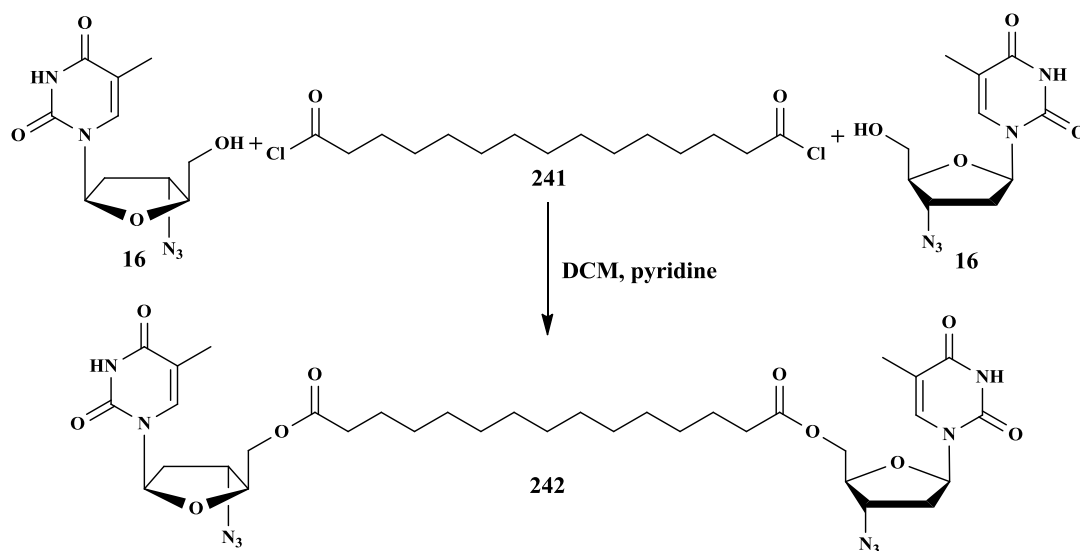


Schéma 92

Plus récemment, Jin et coll. ont décrit une prodrogue bola-amphiphile asymétrique **243**, composée d’une entité déoxycholyte portant à une extrémité une molécule de monophosphate de Zidovudine et à l’autre une molécule de Didanosine, permettant l’administration simultanée des deux principes actifs (**Figure 100**).³³³ Des vésicules très stables d’un diamètre moyen de 174 nm ont été obtenues par la méthode de nanoprécipitation/évaporation à partir d’une solution dans le THF. Le potentiel zêta d’une valeur de $-31,3$ mV atteste d’une meilleure stabilité que les nanoparticules du bola-conjugué **242**. Les nanoparticules de bola-AZT-ddI **243** ont montré une activité *in vitro* ($EC_{50} = 5$ nM) du même ordre que celle de l’AZT sur des cellules MT4 infectées par le VIH-1. Toutefois, la concentration toxique à 50 % étant de 42 μ M pour la bola **243**, et de 283 μ M pour l’AZT, l’indice de sélectivité est moins bon que pour l’AZT. Cette nouvelle prodrogue, administrée sous forme de nanoparticules constitue cependant une tentative intéressante de combiner 2 principes actifs. Cette stratégie pourra notamment être étendue à d’autres médicaments, y compris dans le domaine des composés anticancéreux.³³³

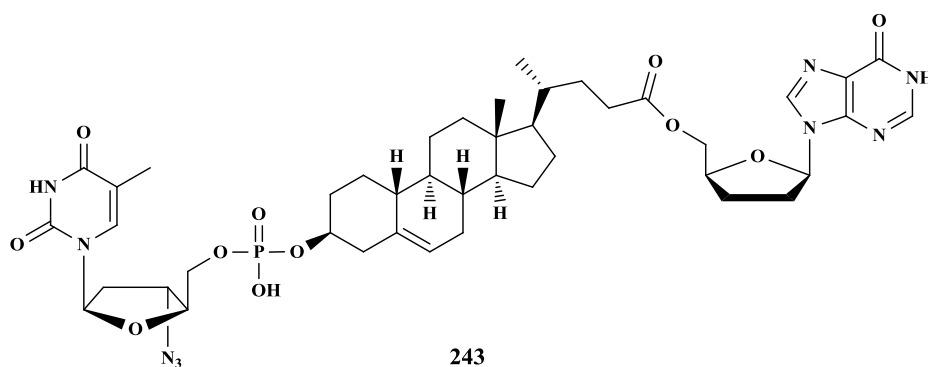


Figure 100

II.5.2. Objectif des travaux

Afin d'augmenter le taux de charge des prodrogues squalénisées existantes, comme le Paclitaxel-squalène **23** et la Gemcitabine-squalène **14**, nous avons envisagés de préparer des prodrogues bola squalénisées symétriques contenant 2 molécules de Paclitaxel (**244**) ou 2 molécules de Gemcitabine (**245**) séparées par une chaîne lipophile squalène. Nous avons également planifié la synthèse d'une prodrogue bola asymétrique **246**, combinant ces 2 principes actifs. Pour cela, il faudra utiliser comme intermédiaire de synthèse un dérivé squalénisé fonctionnalisé à chaque extrémité par une fonction acide carboxylique (**Figure 101**).

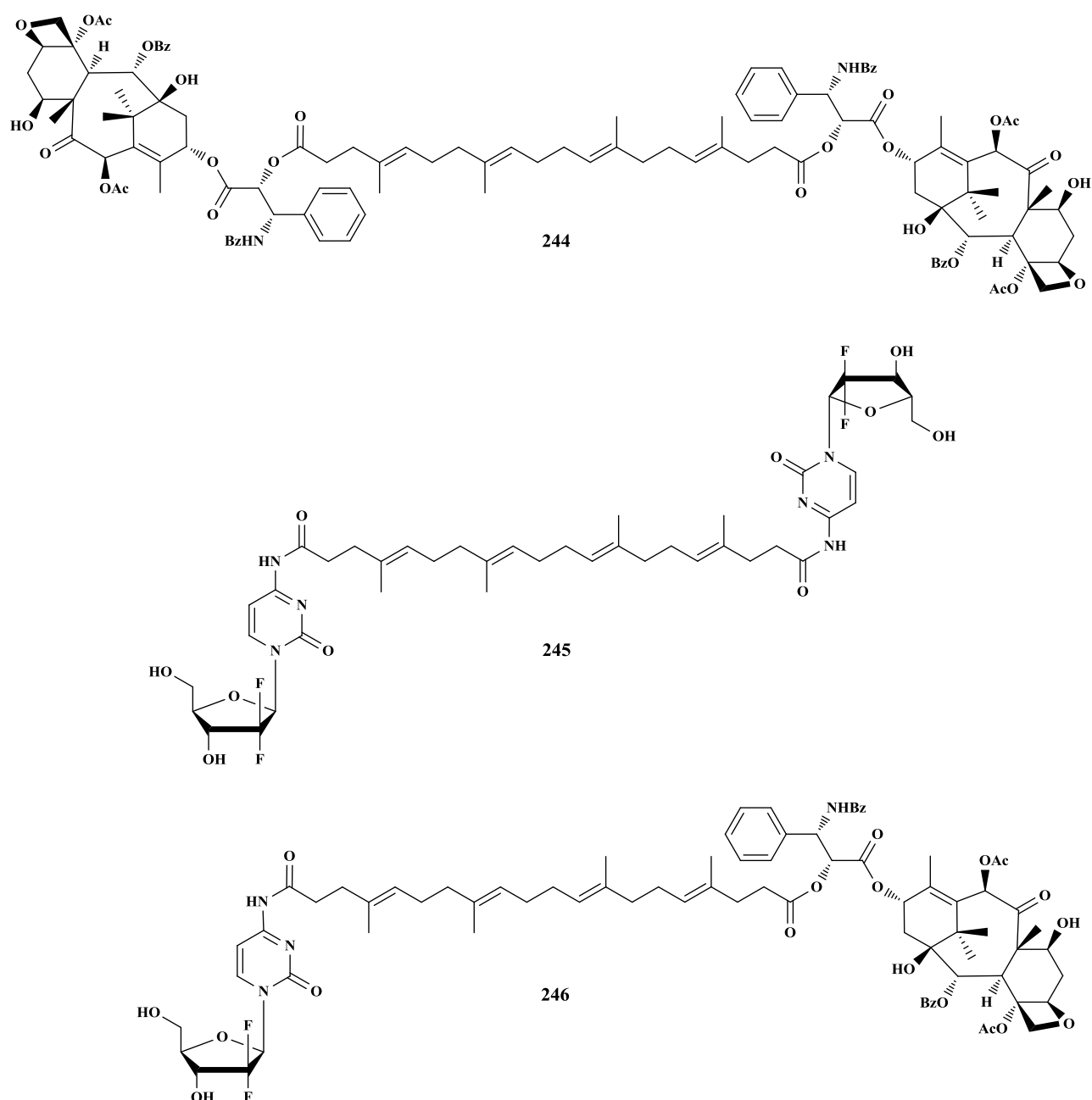


Figure 101

Les propriétés d'auto-assemblage de ces différents composés seront évaluées, en utilisant la méthode de nanopréciipitation/évaporation de solvant. Les structures nanoparticulaires seront caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et par les méthodes de microscopie. Enfin, les nanoparticules seront testées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, en comparaison avec les principes actifs libres et les prodrogues squalénisées correspondantes.

II.5.3. Exposé des travaux

II.5.3.1. Synthèse du diacide squalénique 247

Il nous fallait envisager dans un premier temps la synthèse du diacide squalénique à partir du squalène. La synthèse du dialdéhyde squalénique **250** a déjà été rapportée par Miyoshi et coll., à partir de la dibromhydrine du squalène **248**.³³⁵ Le composé **248** est en fait un sous-produit observé lors de la monofonctionalisation du squalène par NBS/H₂O dans les conditions de van Tamelen.⁵⁶ En augmentant la quantité de NBS il est possible de l'obtenir majoritairement. La synthèse est complétée comme dans le cas du trisnor-squalénaldéhyde **59**, par cyclisation en milieu basique et clivage oxydant. Nous avons repris ce protocole sans changement majeur. La dibromhydrine **248** a été préparée en traitant le squalène dans un mélange THF/eau par 2 équivalents de NBS, avec un rendement de 24 %. La formation du diépoxyde **249** dans le méthanol par le carbonate de potassium, suivie d'un traitement à l'acide periodique dans l'éther diéthylique permettent d'accéder au dialdéhyde squalénique **250**. Enfin, cet aldéhyde a été traité par le réactif de Jones pour fournir le diacide squalénique **247** avec un rendement de 33 % (**Schéma 93**).

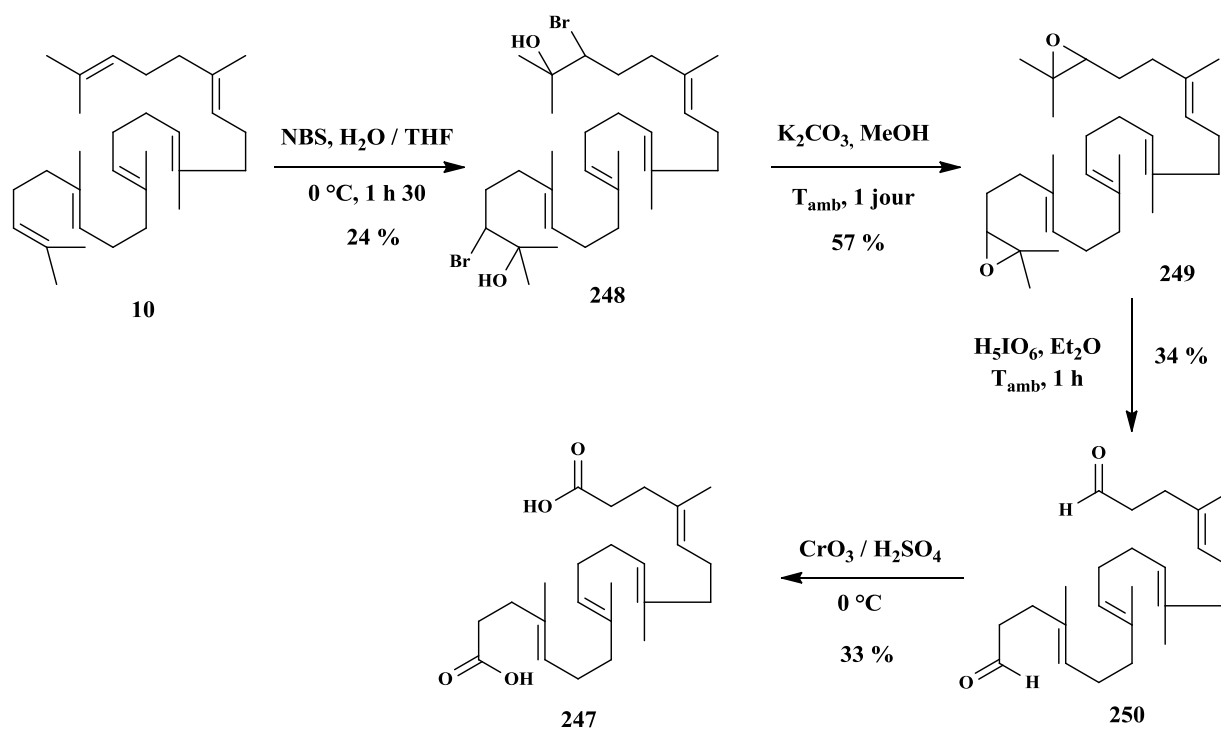


Schéma 93

II.5.3.2. Synthèse du bola-conjugué du Paclitaxel **244**

Le bola-conjugué du Paclitaxel **244** a été obtenu selon la même méthode que les prodrogues squalénisées du Paclitaxel, en mettant en réaction 1 équivalent de diacide squalénique **247** et 2 équivalents de Paclitaxel, en présence d'EDCI et de 4-DMAP dans le DCM. Le composé **244** a pu être isolé après purification par chromatographie avec un rendement de 88 % (**Schéma 94**).

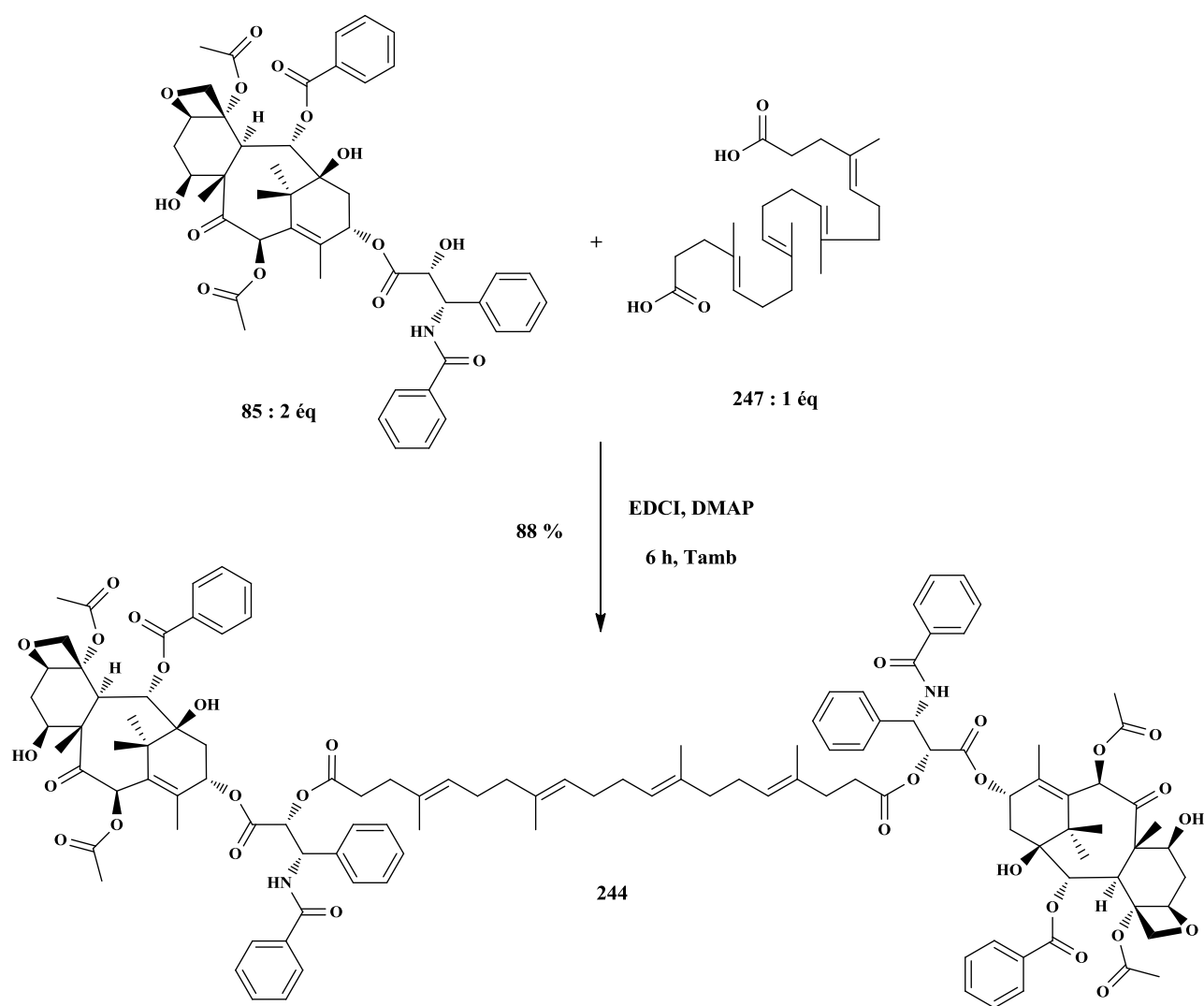


Schéma 94

II.5.3.3. Synthèse du bola-conjugué de la Gemcitabine 245

La synthèse du bola-conjugué de la Gemcitabine **245** nécessitait quant à elle des étapes de protection et de déprotection, au niveau des groupements hydroxyles en position 5' et 3'. En effet, si la préparation du bola-conjugué du Paclitaxel **244** ne nécessite par de protection du groupement hydroxyle en position 7, dans le cas de la Gemcitabine, l'azote du noyau cytosine est très peu réactif. La réaction du diacide squalénique **247** avec 2 équivalents de Gemcitabine sans protection préalable risquait d'engendrer un grand nombre d'isomères.

Le traitement de la Gemcitabine dans le DMF par 2 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence d'imidazole fournit la Gemcitabine protégée **251**, avec un rendement de 95 % (**Schéma 95**).

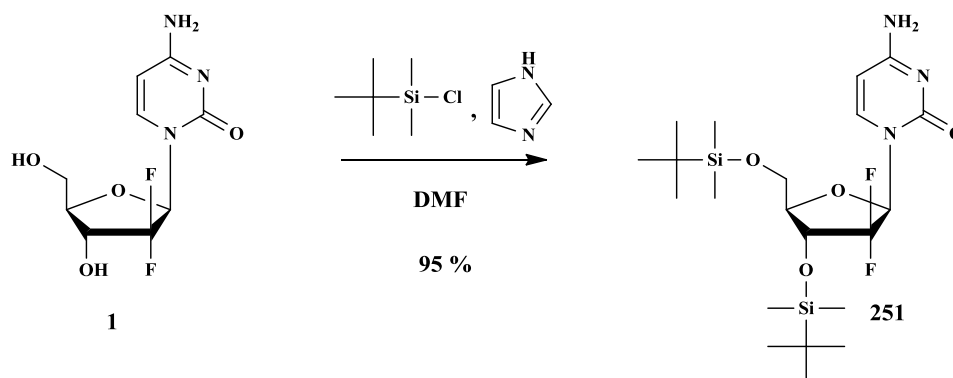


Schéma 95

Le diacide squalénique **247** a alors été condensé avec 2 équivalents de Gemcitabine protégée **251**, en présence de HATU et de base de Hünig, pour donner le bola-conjugué de la Gemcitabine silylé **252**, avec un rendement de 57 %. L'acide **253**, résultant du couplage avec une seule molécule de Gemcitabine silylée (**251**) a également été isolé avec un rendement de 10 %. Il restait alors à déprotéger le bola-conjugué silylé **252**. Ceci a été réalisé par traitement au TBAF avec un rendement de 52 %. Ce rendement moyen est dû au fait que le bola-conjugué de la Gemcitabine **245** est un composé très polaire, difficile à purifier par chromatographie (**Schéma 96**).

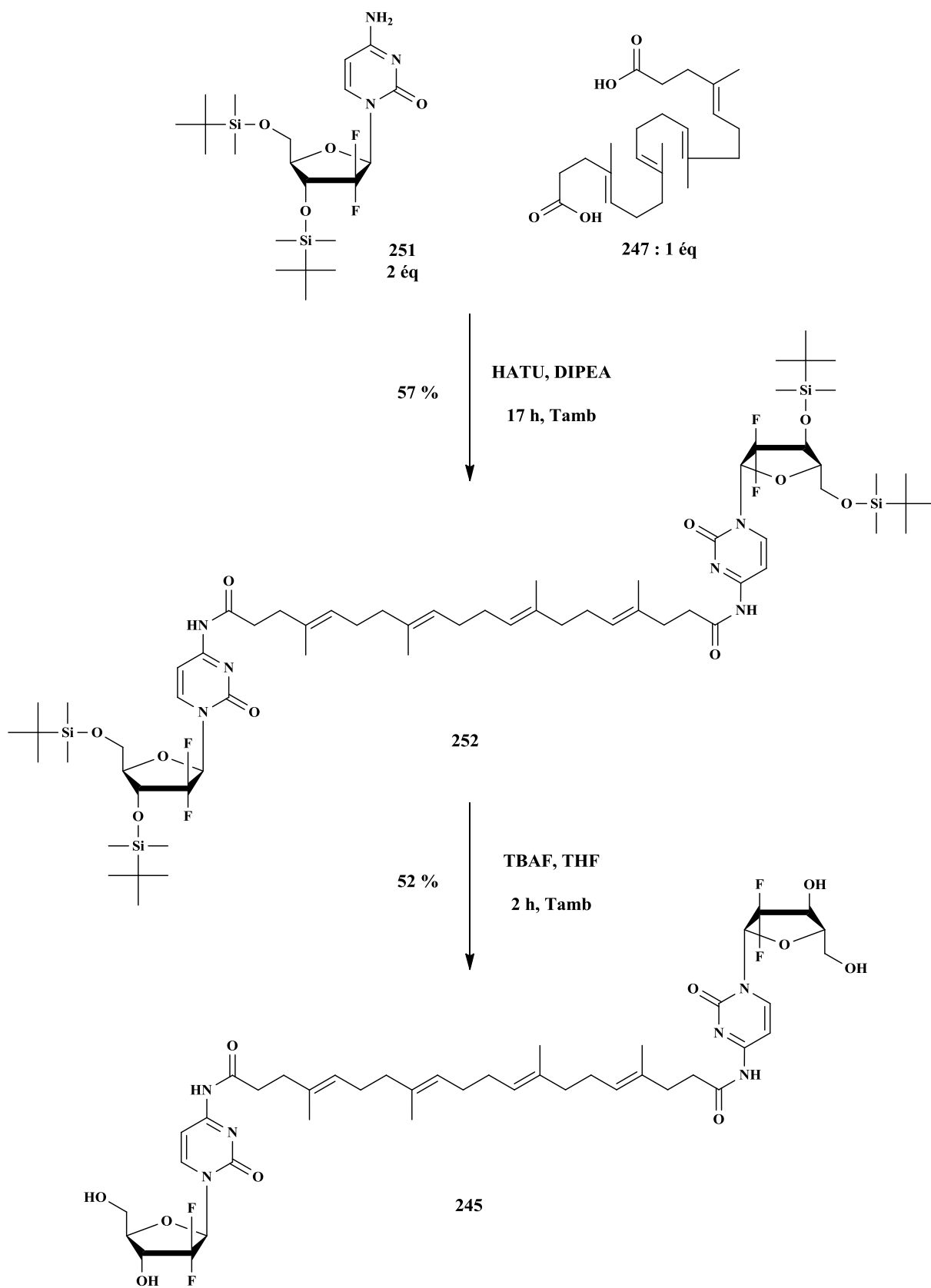


Schéma 96

II.5.3.4. Synthèse du bola-conjugué mixte Gemcitabine/Paclitaxel **246**

Pour obtenir la prodrogue mixte Gemcitabine/Paclitaxel **246**, nous avons décidé de synthétiser dans un premier temps le composé **253**, comportant une entité squalène et une molécule de Gemcitabine silylée **251**. Nous venons de voir que ce composé a été obtenu comme sous produit de la synthèse de **252**. Il s'agissait maintenant d'en optimiser la formation. Pour cela, le diacide squalénique **239** a été traité par un défaut de Gemcitabine silylée **251**, en présence de HATU et de base de Hünig dans un mélange THF/DMF. Dans ces conditions, l'acide **253** désiré a été obtenu avec un rendement de 35 %. Il fallait ensuite effectuer soit le couplage avec le Paclitaxel et la déprotection des groupements silylés soit opérer dans l'ordre inverse. Toutefois, le Paclitaxel étant sensible en milieu basique (épimérisation en position 7, hydrolyse de l'acétate en position 10)³³⁶ et les esters en position 2' étant très facilement hydrolysables, nous avons préféré désilyler **253** avant de le coupler au Paclitaxel. Le groupement hydroxyle en position 2' du Paclitaxel étant bien plus réactif que les hydroxyles de la Gemcitabine, le couplage devait se faire de manière chimiosélective. Le composé silylé **253** a donc été traité par le TBAF dans le THF pour fournir le composé déprotégé **254** avec un rendement de 79 %. Le couplage a ensuite été effectué avec 1 équivalent de Paclitaxel, en présence d'EDCI et de 4-DMAP, pour donner la prodrogue mixte **246** avec un rendement de 31 %, la réactivité de l'acide **253** étant très faible, sans doute à cause de la présence de la molécule de Gemcitabine à son autre extrémité (**Schéma 97**).

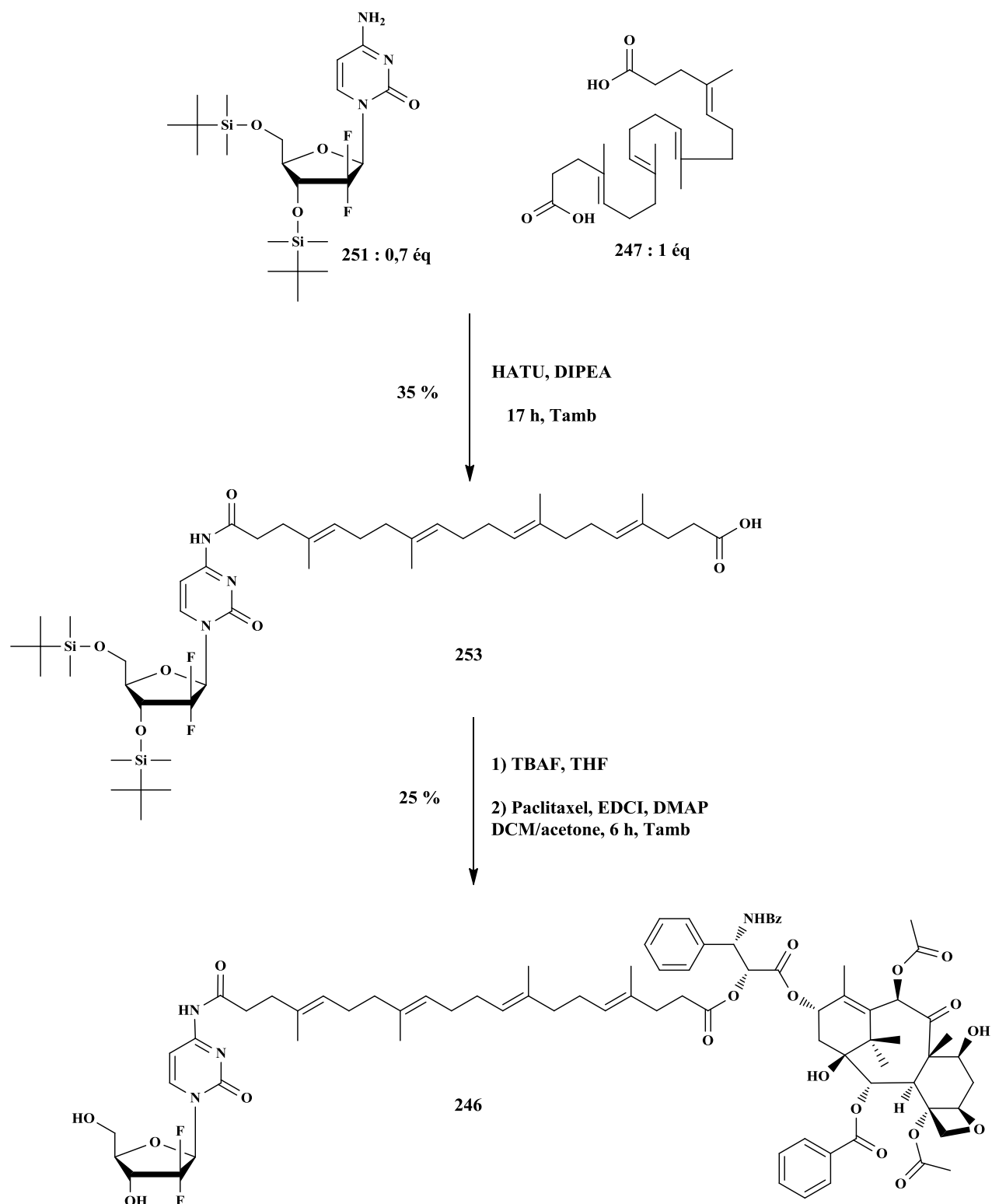


Schéma 97

Les 3 bola-conjugués **244**, **245** et **246** synthétisés, nous pouvions nous intéresser à la préparation et à la caractérisation des nano-objets formés par l'association de ces composés.

II.5.3.5. Préparation et caractérisation des nanoparticules

Bola-conjugué du Paclitaxel 244

Nous avons utilisé la méthode de nanoprécipitation/évaporation de solvants pour la préparation des nanoparticules. Le bola-conjugué du Paclitaxel **244** est composé d'une chaîne squalène et de deux molécules de Paclitaxel relativement hydrophobes à chaque extrémité de cette chaîne. Contrairement aux autres bolamédicaments décrits auparavant, le bola-paclitaxel ne peut pas être considéré comme un « bola-amphiphile ». Pourtant, de manière remarquable, lorsque ce composé est soumis aux conditions de nanoprécipitation, à partir d'une solution dans l'acétone à 10 mg/mL, nous obtenons des nanoparticules d'un diamètre moyen d'environ 120 nm avec un PDI de 0,084. Ces nanoparticules se sont avérées très stables, restant après 3 mois quasi-inchangées à température ambiante, le diamètre moyen passant seulement de 120 nm à environ 160 nm, avec un PDI de 0,094.

Des expériences de CryoMET ont été effectuées afin d'étudier la structure de ces nanoparticules (**Figure 102**). Toutefois aucune structure interne n'a pu être observée. Les images montrent des sphères homogènes dont la distribution de la taille des nanoparticules allant d'environ 50 nm à 250 nm de diamètre, se corrèle avec les résultats obtenus par diffusion dynamique de la lumière (**Figure 103**).

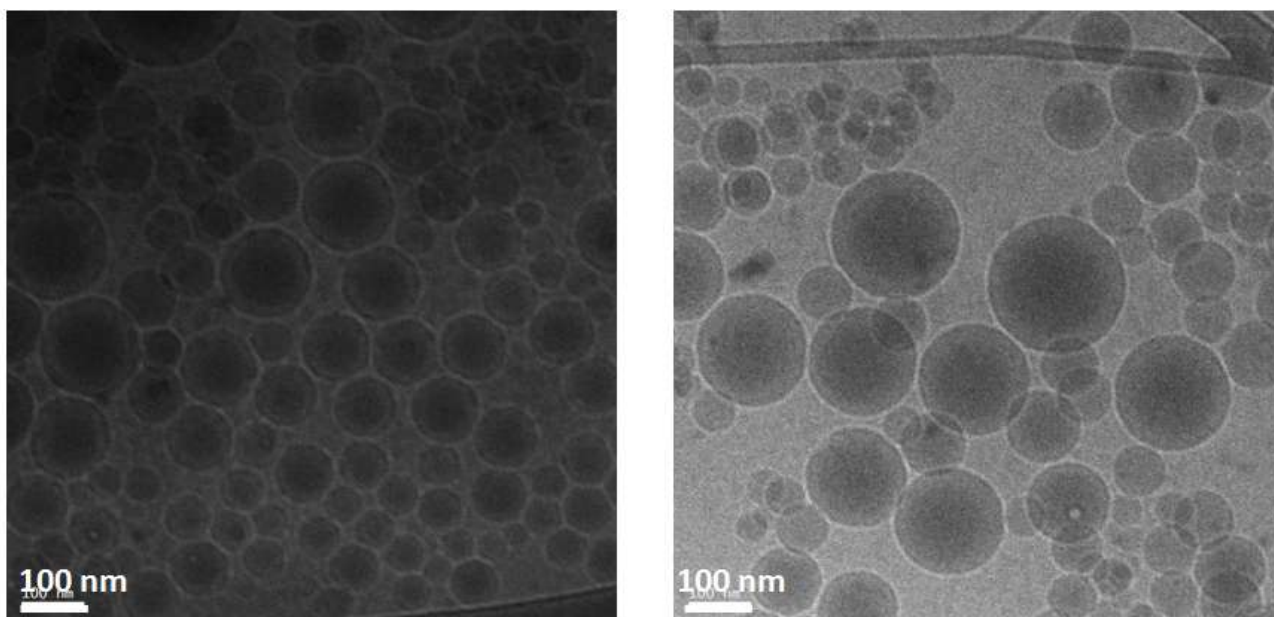


Figure 102. Sélection d'images de CryoMET des nanoparticules du bola-conjugué du Paclitaxel **244** à 2 mg/mL dans l'eau.

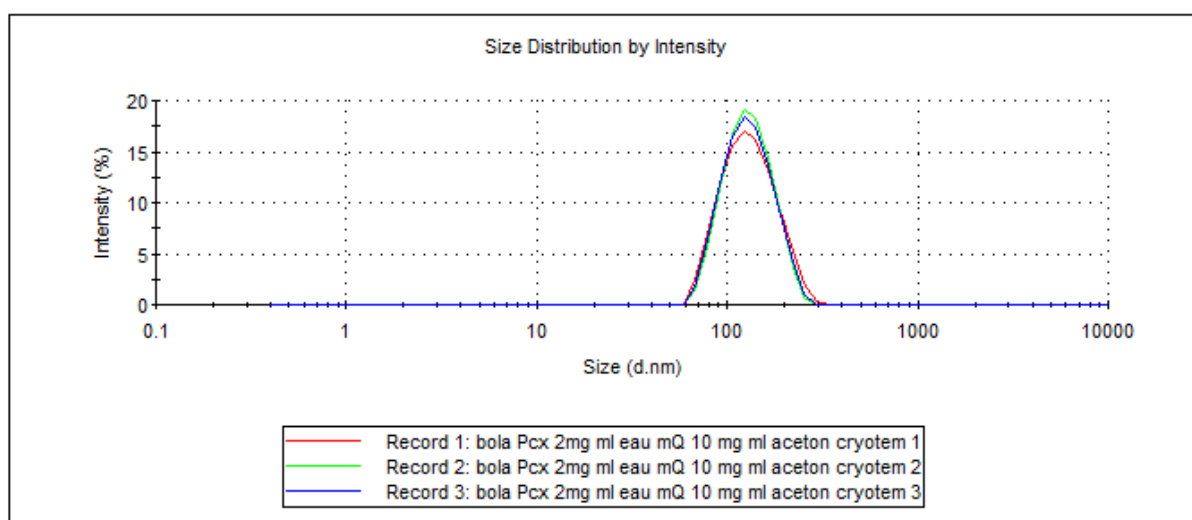


Figure 103. Distribution de la taille des nanoparticules du bola-conjugué du Paclitaxel **244** à 2 mg/mL par diffusion dynamique de la lumière.

*Bola-conjugué de la Gemcitabine **245***

Nous nous sommes ensuite intéressés à la préparation des nanoparticules de la prodrogue **245**, que l'on peut qualifier de conjugué « bola-amphiphile », puisqu'il comporte une chaîne

squalène hydrophobe portant 2 molécules de Gemcitabine hydrophiles à ses extrémités. Cependant, les conditions habituelles de nanoprécipitation, en utilisant une solution organique d'acétone ou d'éthanol à 5 mg/mL n'ont permis d'obtenir que des suspensions instables, s'agrégeant après quelques minutes et constituées de plusieurs populations nanoparticulaires. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé les conditions de Jin et coll.,³³¹ consistant à utiliser du THF, qui s'étaient montrées efficaces pour préparer les nanoparticules de bola-Zidovudine. La préparation de nanoparticules de **245** à partir d'une solution à 5 mg/mL dans le THF a en effet permis d'obtenir après évaporation une suspension de nanoparticules à 1 mg/ml de diamètre moyen de 117 nm avec un PDI de 0,103. Malheureusement, ces nanoparticules ne sont pas très stables. Après quelques heures, l'effet Tyndall disparaît pour laisser place à des agrégats. Cette instabilité se corrèle avec le faible potentiel Zêta observé (-22,5 mV). L'utilisation de stabilisants, comme dans le cas du Bola-Zidovudine, devrait permettre de stabiliser ces nanoparticules pour une future évaluation biologique.

Bola-conjugué mixte Gemcitabine/Paclitaxel 246

Enfin, soumis aux conditions de nanoprécipitation à partir de solutions à 1 mg/mL et à 10 mg/mL dans l'éthanol, pour une concentration aqueuse finale de 1 mg/mL, le bola-conjugué mixte **246** forme des nanoparticules de diamètres moyens respectifs de 108 nm et 70 nm, avec des PDI de 0,064 et 0,129. Malgré des potentiels zêta peu élevés (-24,3 et -23,0 mV), ces nanoparticules se sont avérées stables, puisque après 15 jours à température ambiante, la taille des nanoparticules n'a que très peu augmenté, avec des valeurs respectives de 113,8 et 71,5 nm de diamètre moyen.

II.5.3.6. Evaluation biologique in vitro

L'activité *in vitro* de la prodrogue **244** a été évaluée sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Sauf sur la lignée Mia PaCa-2, les nanoparticules du composé **244** se sont montrées plus actives que celles du Paclitaxel-squalène, même si l'on tient compte qu'il y a deux sous-unités Paclitaxel par molécule de bola-conjugué **244**. En l'absence de toute étude de stabilité des nanoparticules dans les milieux biologiques, il est trop tôt pour expliquer l'origine de ce phénomène. Une piste serait que le Paclitaxel est plus facilement relargué de ces nanoparticules que

dans le cas du Paclitaxel-squalène **23**. Notons toutefois que le Paclitaxel reste toujours le composé le plus actif *in vitro* (**Tableau 18**).

	CI ₅₀ (nM)						
composés	A549	HePG2	HT-29	MCF-7 MDR	MCF-7 wt	KB 3.1	Mia PaCa-2
Paclitaxelx	12	120	44	2200	22	4	47
Pcx SQ 23	2700	3000	720	-	1750	710	450
Bola-Pcx 244	320	590	330	-	470	165	680

Tableau 18. Activité *in vitro* des nanoparticules de Bola-Pcx **244**, de Pcx-SQ **23** et du Paclitaxel sur des lignées cancéreuses humaines.

II.5.4. Conclusion et Perspectives

La synthèse de ces nouvelles prodrogues squalénisées ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans le but d'augmenter le taux de charge en principe actif ou de combiner l'effet de plusieurs principes actifs anticancéreux ou antiviraux.

3 nouvelles prodrogues de type « Bola » ont été synthétisées en peu d'étapes, à partir d'une chaîne squalénisée bifonctionnelle, de la Gemcitabine et du Paclitaxel avec des rendements modestes qu'il nous reste à optimiser. Les bola-conjugués contenant une ou deux molécules de Paclitaxel forment des nanoparticules stables. En revanche, il semble que la chaîne hydrophobe à 24 carbones soit insuffisante pour compenser l'hydrophilie apportée par deux molécules de Gemcitabine, ce qui conduit à l'agrégation des nanoparticules. Une solution pourrait être d'allonger la chaîne squalène pour rétablir la balance hydrophilie/hydrophobie.

Dans tous les cas, il nous faudra étudier la structure de ces objets par MET et par SAXS, puis les tester *in vitro*. Enfin, si les résultats obtenus sont prometteurs, ces composés seront évalués *in vivo* sur des modèles de cancer humain développés chez la Souris.³³⁶

III. CONCLUSION GENERALE

La *squalénisation* est une méthode de vectorisation sous forme nanoparticulaire qui consiste à coupler de manière covalente un dérivé du squalène à des principes actifs hydrophiles tels que les analogues nucléosidiques. Les conjugués amphiphiles obtenus sont capables de s'auto-organiser spontanément dans l'eau en nanoparticules d'une centaine de nanomètres de diamètre et possèdent des activités anticancéreuses ou antivirales remarquables. Notre objectif était d'étendre cette stratégie à différentes classes d'antitumoraux comme les antimétabolites, les antimitotiques et les agents alkylants.

Les résultats encourageants obtenus par squalénisation des analogues nucléosidiques nous ont incités à appliquer cette méthode à leurs métabolites monophosphorylés et plus particulièrement à la Gemcitabine, pour laquelle l'administration directe du nucléotide pourrait être une solution à l'émergence des résistances dues à la sous-expression des déoxycytidine kinases. La Gemcitabine-squalène monophosphate a été synthétisée en 6 étapes à partir de la Gemcitabine-squalène selon une voie de synthèse dont l'étape clé est une phosphorylation par le bis-(fluorèneméthyle)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite. Ce composé forme spontanément dans l'eau des vésicules unilamellaires de diamètre moyen d'environ 100 nm. Ces vésicules sont plus actives que la Gemcitabine-squalène sur les lignées de leucémie murine L1210 sensibles et résistantes à la Gemcitabine, ce qui semble indiquer que cette prodrogue contourne partiellement la résistance due aux déoxycytidine kinases.

Dans un second temps nous nous sommes appliqués à préparer un dérivé squalénisé du Paclitaxel. Le point de départ a été la perte d'activité observée en greffant le squalène en position 2' de la chaîne latérale du Paclitaxel, alors qu'un conjugué de l'acide docosahexaénoïque décrit dans la Littérature montre une activité supérieure au Paclitaxel *in vivo*. Des polyènes hybrides comportant une chaîne squalène et une unité 1,4-*cis*-pentadiène ont été synthétisés via des réactions de Wittig, puis ont été couplés au Paclitaxel. Les bioconjugués forment des nanoparticules dans l'eau qui ont été testées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines. Dans l'ensemble, ces modulations permettent d'accroître le niveau d'activité. L'un des bioconjugués a été choisi pour une évaluation *in vivo* chez la Souris porteuse d'une tumeur sous-cutanée A549. Les résultats devraient permettre de conclure quant à l'efficacité de ces modulations sur la chaîne squalène.

Le Cisplatine est un composé anticancéreux très utilisé en clinique mais induisant de nombreux effets secondaires et l'apparition de résistances. La squalénisation semblait donc une voie prometteuse pour accroître l'index thérapeutique de cette molécule. Deux prodrogues squalénisées du Cisplatine ont été synthétisées en fixant une ou deux chaînes squalène sur les positions axiales du complexe de Platine (IV) obtenu par oxydation du Cisplatine. Ces deux complexes squalénisés forment spontanément des nanoparticules dans l'eau de taille moyenne d'environ 150 nm. Le composé mono-squalénisé est plus actif *in vitro* que le Cisplatine sur toutes les lignées testées, tandis que le complexe bis-squalénisé possède des activités moindres sur ces mêmes lignées. Toutefois ces deux complexes induisent une inhibition totale de la croissance tumorale sur un modèle de cancer du pancréas développé chez la Souris, alors que le Cisplatine est inactif sur ce même modèle. Il reste maintenant à élucider le mécanisme d'action de ces prodrogues, en étudiant la biodistribution du platine.

L'Ifosfamide est un agent alkylant déjà ancien mais toujours prescrit en clinique. Son activité requiert une métabolisation hépatique préalable par les cytochromes P450. Nous avons préparé deux nouvelles prodrogues de l'Ifosfamide en fixant la chaîne squalène en position 4 du cycle oxazaphosphorine soit par une liaison éther soit via un espaceur cystéamine. Ces prodrogues préactivées ont été synthétisées par oxydation anodique dans le méthanol en 4-méthoxy-ifosfamide, suivie de la substitution du groupement méthoxy par la chaîne squalène via l'immonium correspondant engendré sous l'action d'un acide de Lewis. Ces deux molécules possèdent comme les autres dérivés squalénisés des propriétés d'auto-assemblage dans l'eau, et affichent *in vitro* sur différentes lignées cellulaires de cancer humain des CI_{50} très inférieures à celle du composé parent. Ce résultat démontre que nous nous sommes affranchis de l'activation hépatique. Ces composés seront prochainement évalués *in vivo* sur un modèle de sarcome d'Ewing développé chez la Souris.

Enfin, des bioconjugués squalénisés de type « Bola » ont été synthétisés afin d'améliorer le taux de charge en principe actif mais aussi de coupler l'effet de deux composés anticancéreux appartenant à différentes familles. Ces bola-conjugués ont été synthétisés à partir du Paclitaxel, de la Gemcitabine et du diacide squalénique. Le bola-conjugué du Paclitaxel, celui de la Gemcitabine et le bola-conjugué mixte Paclitaxel/Gemcitabine forment des nanoparticules dans l'eau. Toutefois celles du bola-conjugué de la Gemcitabine sont instables et s'agrègent après quelques heures. A ce jour, seules les nanoparticules du bola-conjugué du Paclitaxel ont été testées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires de cancer humain et possèdent une activité accrue par rapport au Paclitaxel-squalène et aux bioconjugués hybrides du Paclitaxel. Il reste maintenant à optimiser la formation

des nanoparticules du bola conjugué de la Gemcitabine et à évaluer l'activité biologique de chaque composé *in vitro* puis *in vivo*.

En conclusion, nous avons montré que tous les bioconjugués squalénisés formaient spontanément des nanoparticules dans l'eau, et que l'organisation supramoléculaire de ces nanoparticules était étroitement liée à la nature du principe actif. Compte tenu de la diversité structurale des molécules étudiées, il semble que la squalénisation soit véritablement une méthode « universelle » permettant de doter un principe actif quelconque de propriétés d'auto-assemblage dans l'eau. Les activités *in vitro* et plus encore *in vivo* sont moins prévisibles puisque liées au devenir des nanoparticules dans le milieu biologique. Toutefois nous avons obtenu des résultats très prometteurs. Par exemple, les dérivés squalénisés du Cisplatine montrent des activités *in vitro* et *in vivo* supérieures à celle du Cisplatine. La Gemcitabine-squalène monophosphate est également plus active que la Gemcitabine-squalène sur les lignées L1210 sensible ou résistante à la Gemcitabine. La Squalénisation de l'Ifosfamide permet d'améliorer nettement l'efficacité de ce composé *in vitro*. Enfin nous avons synthétisé des bioconjugués du Paclitaxel, dont certains sont plus actifs *in vitro* que le Paclitaxel-squalène.

La *squalénisation* a donc été étendue à diverses familles de composés anticancéreux confirmant qu'il s'agit d'une méthode générale de vectorisation pourvue d'un fort potentiel non seulement dans le domaine du cancer mais très certainement dans d'autres grandes familles pharmaco-thérapeutiques.

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. Généralités et appareillages

Analyses :

-Les spectres d'absorption IR ont été obtenus à partir de solides ou de liquides purs sur un spectromètre Bruker-Vector 22 à transformée de Fourier. Seules les bandes d'absorption significatives sont listées.

-Les spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance 300 (300 MHz et 75 MHz, pour le proton et le carbone, respectivement) et Bruker Avance 400 (400 MHz et 100 MHz, pour le proton et le carbone, respectivement). Les spectres RMN du fluor ^{19}F et du phosphore ^{31}P ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 200 P 200 (188 MHz et 81 MHz, pour le fluor et le phosphore, respectivement) ou Bruker Avance 400 (376 MHz et 162 MHz, pour le fluor et le phosphore, respectivement). Les spectres RMN du phosphore ^{31}P ont été découplés ou non du proton. La reconnaissance des noyaux carbone méthyle, méthylène, méthyne et quaternaire en RMN ^{13}C repose sur la séquence spin-écho *J*-modulé. Les solvants deutérés utilisés sont indiqués entre parenthèses.

-Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin Elmer 341.

-Les spectres de masse basse résolution ont été enregistrés sur un spectromètre Esquire-LC Bruker : Source : ESI (Ionisation par ElectroSpray) ou APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique). Analyseur : Trappe ionique.

-Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre LCT Waters : Source : ESI (Ionisation par ElectroSpray). Analyseur : TOF (Temps de vol).

-Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service de microanalyse du Centre d'Etudes Pharmaceutiques à Châtenay-Malabry, avec un analyseur Perkin Elmer 2400.

Méthodes chromatographiques :

-Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques Merck® 60 F₂₅₄ de 0,25 mm d'épaisseur. La révélation des plaques se fait à la lumière ultraviolet à 254 nm et par un révélateur chimique (I₂, Kâgi-Misher, ou acide phosphomolybdique).

-Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice (Merck) de granulométrie 0,063 mm.

-Les profils chromatographiques haute performance ont été obtenus sur une chaîne analytique modulaire 1260 Infinity – Agilent Technologies munie de détecteurs UV-Visible. Les chromatogrammes ont été

obtenus avec une colonne Waters SUNFIRE C18, 150 x 4,6 mm. Le système éluant utilisé est un gradient de 85 à 100 % de méthanol (15 à 0 % d'acétonitrile) pendant 7 minutes puis 100 % de méthanol.

Utilisation des solvants de réaction : Tous les solvants anhydres utilisés sont séchés et fraîchement distillés avant leur utilisation ; le dichlorométhane (CH_2Cl_2) et le diméthylformamide (DMF) sur hydruure de calcium, l'éther et le THF sur Na/ benzophénone. Toutes les réactions sensibles à l'air ou à l'humidité sont effectuées sous atmosphère d'azote.

Caractérisation des Nanoparticules :

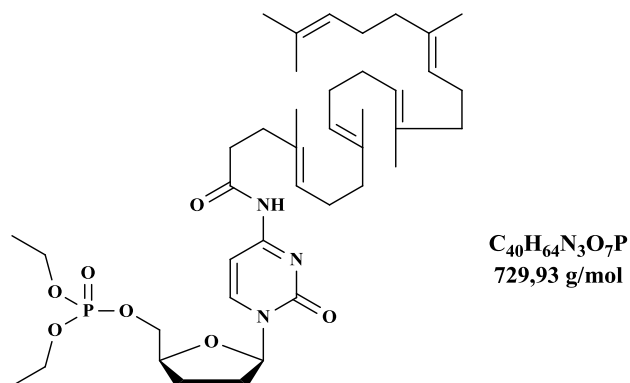
-Les tailles, les indices de polydispersité ainsi que les potentiels zêta des nanoparticules obtenues ont été mesurés avec un Zetasizer Nano ZS Malvern.

-Les expériences de Microscopie Electronique en Transmission (MET) ont été effectuées sur un Microscope Jeol 2000EX au « Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay » (UMR 8080 CNRS).

-Les expériences de Cryo-Microscopie Electronique en Transmission (CryoMET) ont été effectuées sur un Microscope Electronique Jeol 2100 au service de « Microscopie Electronique de l'Institut de Biologie Intégrative » (IFR 83 CNRS Paris).

IV.2. Gemcitabine-squalène monophosphate

❖ Diéthyl ((*(2S,5R)*-5-(2-oxo-4-((*4E,8E,12E,16E*)-4,8,13,17,21-pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaèn-amido)pyrimidin-1(*2H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyl) phosphate (**63**)



A une solution de ddC-SQ **19** (63 mg ; 0,11 mmol) dans du DCM anhydre (1 mL), sont ajoutés du *N*-méthylimidazole (9 mg ; 0,11 mmol), de la triéthylamine (22 mg ; 0,22 mmol) et du diéthylchlorophosphate (43 mg ; 0,24 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 5 heures puis est repris dans l'eau (5 mL). La phase aqueuse est extraite par l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (5 mL), séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite pour donner une huile jaune. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 1:1) pour donner le phosphotriester **63** (70 mg ; 90%) sous forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,33$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

$[\alpha]_D = +33,5$ ($c = 2,9$; EtOH).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 9,47$ (s, 1 H, NH) ; 8,22 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H, H-6) ; 7,40 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H, H-5) ; 6,03 (dd, $J = 6,4$ Hz, $J = 2,4$ Hz, 1 H, H-1') ; 5,16-5,04 (m, 5 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 4,40-4,29 (m, 3 H) ; 4,20-4,08 (m, 5 H) ; 3,65 (m, 2 H, H-2') ; 2,56 (m, 3 H) ; 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 2 H, NHCOCH₂CH₂) ; 2,16-1,91 (m, 17 H) ; 1,64 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,58 (s, 3 H, CH₃) ; 1,56 (s, 9 H, CH₃) ; 1,55 (s, 3 H, CH₃) ; 1,40-1,28 (m, POCH₂CH₃) ppm.

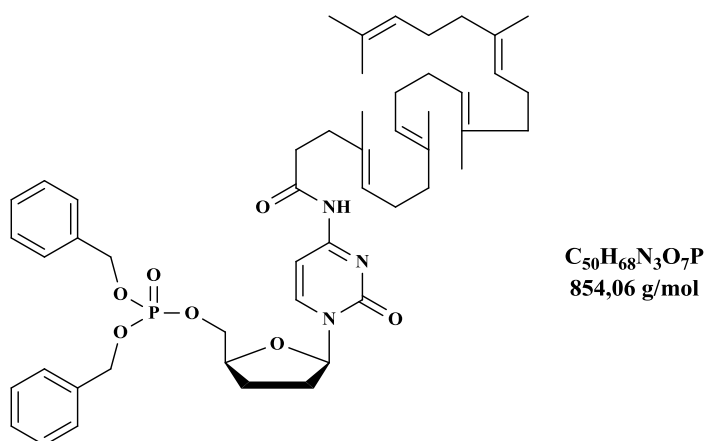
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 173,4$ (C, NHCO) ; 162,6 (C, C-4) ; 155,2 (C, C-2) ; 144,4 (CH, C-6) ; 134,2 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 134,9 (2 C, =C(CH₃)CH₂) ; 133,0 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 131,3 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 125,7 (CH, HC=C(CH₃)) ; 124,4 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 124,3 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 96,0 (CH, C-5) ; 88,1 (CH, C-1') ; 80,3 (d, $J_{CP} = 7,5$ Hz, CH, C-4') ; 67,2 (d, $J_{CP} = 4,5$ Hz, CH₂, C-5') ; 64,3 (d, $J_{CP} = 5,3$ Hz, 2 CH₂, CH₃CH₂OP) ; 39,8 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 39,6 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,5 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 34,6 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 33,3 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 28,3 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 26,8 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 26,7 (CH₂, C-2') ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 24,6 (CH₂, C-3') ; 17,8 (CH₃) ; 16,3-16,0 (6 CH₃) ppm.

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) : δ = 12,61 (s) ppm.

IR (film) : ν = 2984; 2962; 2930; 2845; 1715; 1665; 1612; 1560; 1493; 1434; 1395; 1386; 1317; 1266; 1189; 1165; 1138; 1098; 1078; 1027; 984; 791; 731; 691 cm⁻¹.

SM (+APCI) : m/z = 730,4 (100%) [M+H]⁺.

❖ Dibenzyl (((2*S*,5*R*)-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaèn-amido)pyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)méthyl) phosphate (**64**)



A une solution de ddC-SQ **19** (100 mg; 0,17 mmol) dans le chloroforme (1 mL), sont ajoutés du N-méthylimidazole (31 mg; 0,38 mmol), de la triéthylamine (30 mg; 0,29 mmol) et du dibenzylchlorophosphate (200 mg; 1,15 mmol). Le mélange réactionnel est alors agité à 60 °C pendant 2 heures puis repris dans l'eau (5 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite par de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (5 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite pour donner une huile jaune. Le brut est alors purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt) pour fournir le phosphotriester **64** (60 mg; 48 %) sous forme d'une huile incolore.

R_f = 0,33 (AcOEt).

[α]_D = +32,9 (c = 1,55 ; EtOH).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9,34 (s, 1 H, NH) ; 8,06 (d, J = 7,5 Hz, 1 H, H-6) ; 7,39-7,28 (m, 11 H, H-5, C₆H₅) ; 5,98 (dd, J = 6,5 Hz, J = 3,2 Hz, 1 H, H-1') ; 5,22-4,97 (m, 9 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂, OCH₂Ph) ; 4,29-4,04 (m, 3 H, H-4', 2 H-5') ; 2,61-2,32 (m, 5 H) ; 2,12-1,90 (m, 19 H) ; 1,67 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,62 (s, 3 H, CH₃) ; 1,59 (s, 9 H, CH₃) ; 1,58 (s, 3 H, CH₃) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,2 (C, NHCO) ; 162,5 (C, C-4) ; 155,1 (C, C-2) ; 144,4 (CH, C-6) ; 135,6 (C, CH=(CH)=CCH₂OP) ; 135,5 (C, CH=(CH)=CCH₂OP) ; 135,2 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 135,0 (2 C, =C(CH₃)CH₂) ; 133,0 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 131,3 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 128,8 (2 CH) ; 128,7 (4 CH) ; 128,2 (4

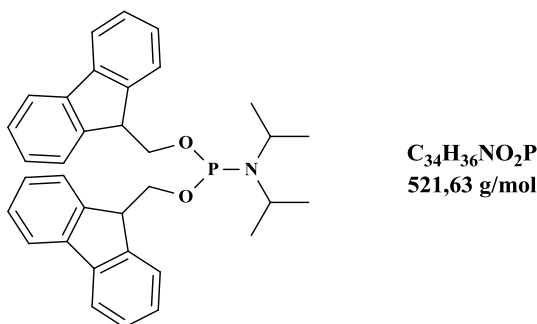
CH) ; 125,8 (CH, HC=C(CH₃)) ; 124,5 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 124,3 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 96,1 (CH, C-5) ; 88,1 (CH, C-1') ; 80,1 (d, J_{CP} = 8,3 Hz, CH, C-4') ; 67,6 (d, J_{CP} = 5,3 Hz, 2CH₂, PhCH₂OP) ; 67,6 (d, J_{CP} = 5,3 Hz, CH₂, C-5') ; 39,8 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 39,7 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,6 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 34,6 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 33,2 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 28,4 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 26,9 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 26,8 (CH₂, C-2') ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 24,7 (CH₂, C-3') ; 17,8 (CH₃) ; 16,2 (2 CH₃) ; 16,1 (CH₃) ; 16,0 (CH₃) ppm.

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) : δ = 10,83 (s) ppm.

IR (film) : ν = 2966 ; 2854 ; 1718 ; 1665 ; 1613 ; 1560 ; 1493 ; 1455 ; 1432 ; 1383 ; 1317 ; 1264 ; 1215 ; 1188 ; 1136 ; 1100 ; 1012 ; 995 ; 966 ; 909 ; 808 ; 791 ; 732 ; 697 cm⁻¹.

SM (+APCI) : m/z = 854,6 (100%) [M+H]⁺.

❖ Bis-(méthyl(9*H*-fluorén-9-yl))-diisopropylphosphoramidite (**68**)



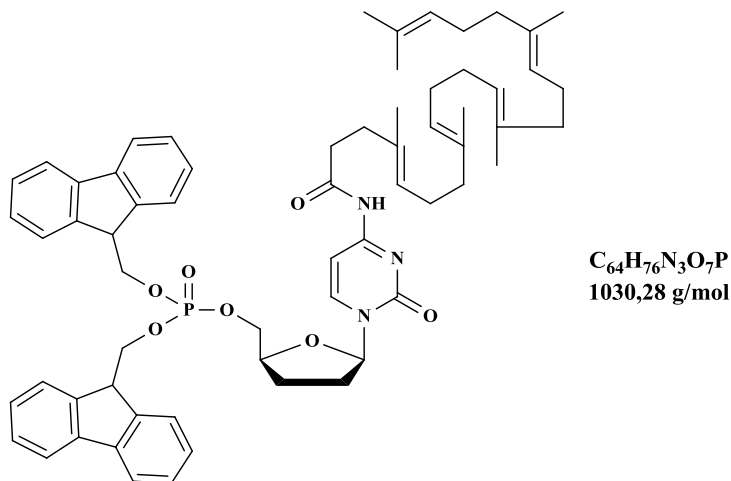
A une solution de PCl₃ (0,79 g ; 5,7 mmol) dans le THF anhydre (20 mL), sont ajoutés de la diisopropyléthylamine (1,48 g ; 11,5 mmol) puis de la diisopropylamine (1,08 g ; 10,7 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à 0 °C puis une autre portion de diisopropyléthylamine (1,48 g ; 11,5 mmol) est ajouté, suivie d'une solution de 9-fluorénylméthanol (2,24 g ; 11,4 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans un tampon phosphate pH 7 (20 mL) puis extrait avec de l'AcOEt (4×50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec un tampon phosphate pH 7 (20 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite pour donner un résidu huileux qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt/Et₃N, 20:1:0,2). Le phosphoramidite **68** (2,41 g ; 81%) est isolé sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,75 (dd, J = 7,4 Hz, J = 4,9 Hz, 4 H, H-Ar) ; 7,65 (t, J = 7,4 Hz, 4 H, H-Ar) ; 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, H-Ar) ; 7,37 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, H-Ar) ; 7,30 (dt, J = 7,4 Hz, J = 1,2 Hz, 2 H, H-Ar) ; 7,28 (dt, J = 7,4 Hz, J = 1,2 Hz, 2 H, H-Ar) ; 4,18 (dd, J = 7,2 Hz, J = 6,7 Hz, 2 H, CHCH₂OP) ; 4,01 (dt, J = 9,9 Hz, J = 6,7 Hz, 2 H, CHCH₂OP) ; 3,81 (td, J = 9,9 Hz, J = 7,2 Hz, 2 H, CHCH₂OP) ; 3,80–3,58 (m, 2 H, PN(CH(CH₃)₂)₂) ; 1,17 (d, J = 6,8 Hz, 12 H, P-N(CH(CH₃)₂)₂) ppm.

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) : δ = 147,4 (s) ppm.

IR (film) : ν = 2964 ; 2930 ; 1449 ; 1396 ; 1363 ; 1183 ; 1153 ; 1127 ; 1103 ; 1009 ; 975 ; 887 cm⁻¹.

❖ Bis-((9*H*-fluorén-9-yl)méthyl) (((2*S*,5*R*)-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaèn-amido)pyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyle) phosphate (**70**)



A une solution de ddC-SQ **19** (77 mg ; 0,12 mmol) dans le THF anhydre (1 mL) sont ajoutés une solution de 1*H*-tétrazole dans l'acétonitrile (0,45 M ; 1,4 mL ; 0,64 mmol) ainsi qu'une solution du phosphoramidite **68** (165 mg ; 0,3 mmol) dans le THF anhydre (2 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante puis est refroidi à 0 °C et 1 mL d'eau oxygénée à 30 % (9 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant 3 heures supplémentaires à 0 °C puis une solution aqueuse saturée en NaHSO₃ (10 mL) est ajoutée. Le mélange est extrait par du DCM (4×50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (20 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (MeOH/CH₂Cl₂ 5:95) pour fournir le phosphotriester **70** (65 mg ; 52%) sous forme d'une huile visqueuse incolore.

[α]_D = +27,4 (*c* = 4,05 ; CHCl₃).

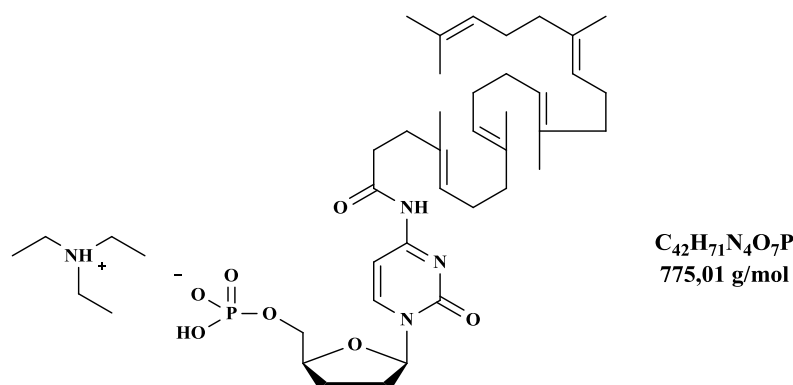
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8,01 (s large, 1 H, NH) ; 7,92 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H, H-6) ; 7,72 (t, *J* = 7,2 Hz, 4 H, 4 H-Ar) ; 7,69 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H, H-5) ; 7,52 (dd, *J*₁ = 7,4, *J*₂ = 3,3 Hz, 2 H, H-Ar) ; 7,44–7,19 (m, 10 H, H-Ar) ; 5,93 (dd, *J*₁ = 6,4, *J*₂ = 3,3 Hz, 1 H, H-1) ; 5,24–4,90 (m, 5 H, CH=C(CH₃)) ; 4,28–4,17 (m, 4 H, CHCH₂OP) ; 4,07–3,93 (m, 3 H, CH-CH₂OP, H-4) ; 3,95 (ddd, *J*₁ = 11,8, *J*₂ = 7,4, *J*₃ = 3,3 Hz, 1 H, H-5) ; 3,84 (ddd, *J*₁ = 11,8, *J*₂ = 6,7, *J*₃ = 2,7 Hz, 1 H, H-5) ; 2,53–2,30 (m, 5 H, H-2, NHCOCH₂CH₂) ; 2,16–1,92 (m, 19 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃), H-2, H-3) ; 1,69 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,63 (s, 3 H, CH₃) ; 1,61 (s, 9 H, CH₃) ; 1,60 (s, 3 H, CH₃) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 172,9 (C, NHCO) ; 162,3 (C, C-4) ; 155,0 (C, C-2) ; 143,7 (CH, C-6) ; 142,8 (4 C, Ar) ; 141,3 (2 C, Ar) ; 135,0 (2 C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,7 (2 C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 132,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 131 ; 1 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 127,8 (4 CH, Ar) ; 127,0 (4 CH, Ar) ; 125,5 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,8 (3 CH, Ar) ; 124,7 (CH, Ar) ; 124,3 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,1 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 119,9 (CH, Ar) ; 119,8 (3 CH, Ar) ; 96,0 (CH, C-5) ; 87,9 (CH, C-1) ; 79,6 (d, J_{CP} = 7,2 Hz, CH) ; 69,0 (d, J_{CP} = 5,8 Hz, 2 CH_2 , FmCH_2OP) ; 67,5 (d, J_{CP} = 5,7 Hz, CH_2 , C-5) ; 47,8 (d, J_{CP} = 7,8 Hz, CH) ; 47,7 (d, J_{CP} = 7,9 Hz, 2 CH, FmC-9) ; 39,6 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 39,4 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 36,3 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 34,4 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 32,8 (CH_2) ; 28,1 (2 CH_2) ; 26,6 (2 CH_2) ; 26,5 (CH_2) ; 25,6 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 24,5 (CH_2) ; 17,6 (CH_3) ; 16,0 (3 CH_3) ; 15,9 (CH_3) ; 15,8 (CH_3) ppm.

IR (film) : ν = 3150–2800 ; 1715 ; 1661 ; 1610 ; 1652 ; 1494 ; 1449 ; 1384 ; 1317 ; 1267 ; 1191 ; 1138 ; 1105 ; 1017 ; 989 ; 759 ; 740 cm^{-1} .

SM (+APCI) : m/z = 1030,3 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

❖ Triéthylammonium ((2*S*,5*R*)-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaèn-amido)pyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyle hydrogenophosphate (**71**)



A une solution du phosphotriester **70** (52 mg ; 0,05 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (9 mL) est ajoutée 2,5 mL de triéthylamine (18 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 17 heures à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est lavé avec de l'éther diéthylique (3×2 mL). Le résidu est dissous dans le méthanol (5 mL), la solution est filtrée puis concentrée sous pression réduite pour donner le sel de phosphate **71** (39 mg ; 98%) sous forme d'une solide blanc amorphe.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +18,1$ (c = 2,1 ; EtOH).

RMN ^1H (300 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : δ = 8,57 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, H-6) ; 7,49 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, H-6) ;

6,03 (dd, J = 6,6 Hz, J = 2,4 Hz, 1 H, H-1) ; 5,20–5,04 (m, 5 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 4,41–4,22 (m, 2 H, H-4', H-5') ; 4,00–4,16 (m, 1 H, H-5') ; 3,18 (q, J = 7,2 Hz, 6 H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$) ; 2,53 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, NHCOCH_2) ; 2,55 (m, 1 H, H-2') ; 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,15–1,90 (m, 19 H,

=CHCH₂CH₂C(CH₃), H-2', H-3') ; 1,66 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,64 (s, 3 H, CH₃) ; 1,59 (s, 12 H, CH₃) ; 1,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 9 H, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ppm.

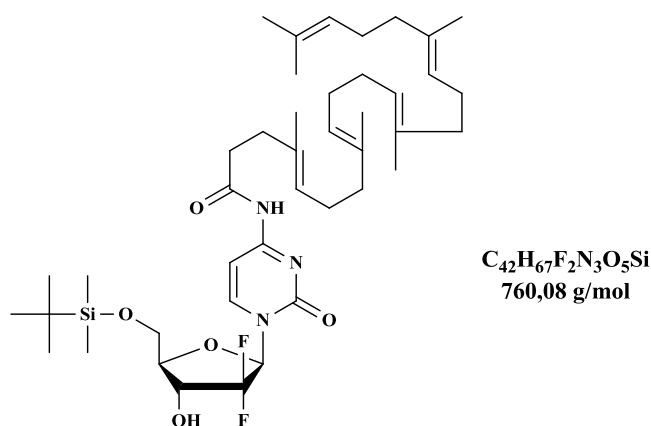
RMN ¹³C (75 MHz, [D₄]MeOH) : δ = 175,2 (C, NHCO) ; 164,1 (C, C-4) ; 157,9 (C, C-2) ; 146,7 (CH, C-6) ; 136,0 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 135,9 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 135,8 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 134,5 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 132,0 (C, =C(CH₃)₂) ; 126,4 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,7 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,6 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,5 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 97,9 (CH, C-5) ; 89,5 (CH, C-1') ; 82,8 (d, *J*_{C,P} = 8,6 Hz, CH, C-4') ; 66,4 (d, *J*_{C,P} = 4,5 Hz, CH₂, C-5') ; 47,6 (3 CH₂, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ; 40,9 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 40,7 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 37,2 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 35,8 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 34,4 (CH₂) ; 29,2 (2 CH₂) ; 27,8 (CH₂) ; 27,7 (CH₂) ; 27,6 (CH₂) ; 25,9 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 25,4 (CH₂) ; 17,8 (CH₃) ; 16,3 (2 CH₃) ; 16,2 (2 CH₃) ; 9,2 (3 CH₃, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ppm.

IR (film) : ν = 3300–2750 ; 1714 ; 1660 ; 1610 ; 1565 ; 1494 ; 1450 ; 1384 ; 1318 ; 1235 ; 1143 ; 1102 ; 1050 ; 991 ; 926 ; 792 cm⁻¹.

SM (+ESI) : *m/z* = 718,3 (100%) [M – HOCH₂CH₂NHMe₂ + 2Na]⁺ ; 696,4 (76%) [M – HOCH₂CH₂NHMe₂ + H + Na]⁺ ; 674,3 (37%) [M – HOCH₂CH₂NHMe₂ + 2H]⁺.

SM (-ESI) : *m/z* = 672 (100%) [M – HOCH₂CH₂NHMe]⁻.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-5-(((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)méthyl)-3,3-difluoro-4-hydroxytétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**75**)



A une solution de Gemcitabine-squalène **14** (410 mg ; 0,64 mmol) dans du DMF anhydre (4 mL), sont ajoutés à 0 °C 58 mg d'imidazole (0,85 mmol) et 120 mg de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (0,79 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium (10 mL) puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (3×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite.

pour donner une huile jaune. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 1:1) pour fournir le composé silylé **75** (428 mg ; 89%) sous forme d'un solide blanc amorphe.

R_f = 0,50 (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8,46 (s large, 1 H, NH) ; 8,10 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-6) ; 7,41 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-5) ; 6,41 (dd, J_{HF} = 9,5 Hz, J_{HF} = 4,9 Hz, 1 H, H-1') ; 5,21-5,06 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 4,37 (td, J_{HF} = 10,9 Hz, J = 7,9 Hz, 1 H, H-3') ; 4,08-4,00 (m, 2 H, H-5') ; 3,94-3,87 (m, 1 H, H-4') ; 2,55-2,50 (m, 2 H, NHCOCH_2) ; 2,35 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,12-1,93 (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 1,68 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 1,62 (s, 3 H, CH_3) ; 1,60 (s, 12 H, CH_3) ; 0,94 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; 0,13 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ppm.

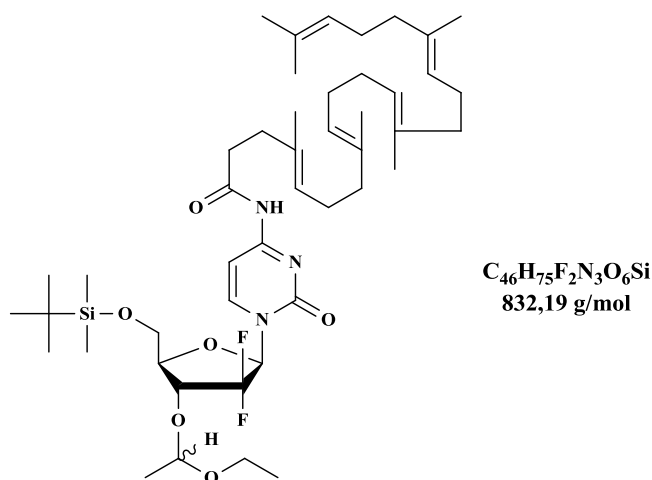
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 173,7 (C, NHCO) ; 163,2 (C, C-4) ; 155,2 (C, C-2) ; 144,3 (CH, C-6) ; 134,9 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,7 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 132,7 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 131,0 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 125,5 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,3 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,2 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,1 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 122,1 (t, J_{CF} = 260 Hz, CF_2 , C-2') ; 97,2 (CH, C-5) ; 84,4 (dd, J_{CF} = 37,8 Hz, J_{CF} = 26,3 Hz, CH, C-1') ; 81,1 (d, J_{CF} = 5,5 Hz, CH, C-4') ; 68,5 (t, J_{CF} = 22,0 Hz, CH, C-3') ; 60,4 (CH_2 , C-5') ; 39,6 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 39,4 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 36,2 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 34,3 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 28,1 (2 CH_2) ; 26,6 (2 CH_2) ; 26,5 (CH_2) ; 25,7 (3 CH_3 , $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; 25,5 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 18,2 (C, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; 17,5 (CH_3) ; 15,9 (3 CH_3) ; 15,7 (CH_3) ; -5,6 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; -5,7 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ppm.

RMN ^{19}F (188 MHz, CDCl_3) : δ = -118,8 (s, 1 F) ; -119,5 (s, 1 F) ppm.

IR (film) : ν = 2928 ; 2857 ; 1725 ; 1660 ; 1619 ; 1559 ; 1491 ; 1439 ; 1384 ; 1319 ; 1256 ; 1196 ; 1134 ; 1083 ; 951 ; 909 ; 833 ; 812 ; 783 ; 732 cm^{-1} .

SM (+APCI) : m/z = 760,7 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldiméthylsilyl)oxy)méthyl)-4-(1-éthoxyéthoxy)-3,3-difluorotétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**78**)



A une solution de Gemcitabine-squalène silylée **75** (200 mg ; 0,26 mmol) dans du DCM anhydre (1 mL), sont ajoutés de l'éther de vinyle et d'éthyle (207 mg ; 2,9 mmol) et une quantité catalytique de PPTS. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures puis traité avec une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium (5 mL). Le mélange est extrait par de l'AcOEt (3×5 mL) et les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (5 mL), séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite pour donner le composé **78** (214 mg ; 99%) sous forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,69$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : la présence de deux isomères induit le dédoublement de certains signaux. δ = 8,82 (s large, 1 H, NH) ; 8,09-8,04 (m, 1 H, H-6) ; 7,42 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-5) ; 6,39-6,31 (m, 1 H, H-1') ; 5,21-5,05 (m, 5 H, $CH_2CH=C(CH_3)CH_2$) ; 4,92-4,80 (m, 1 H, $CH(O)(CH_3)OCH_2CH_3$) ; 4,51-4,26 (m, 1 H, H-3') ; 4,08-3,98 (m, 2 H, H-5') ; 3,87-3,78 (m, 1 H) ; 3,76-3,67 (m, 1 H) ; 3,59-3,40 (m, 1 H) ; 2,60-2,50 (m, 2 H, $NHCOCH_2$) ; 2,34 (t, $J = 7,9$ Hz, 2 H, $NHCOCH_2CH_2$) ; 2,16-1,92 (m, 16 H, $=CHCH_2CH_2C(CH_3)$) ; 1,67 (s, 3 H, $(CH_3)_2C=$) ; 1,62 (s, 3 H, CH_3) ; 1,59 (s, 12 H, CH_3) ; 1,37-1,33 (m, 3 H, $CH(O)(CH_3)OCH_2CH_3$) ; 1,21-1,15 (m, 3 H, $CH(O)(CH_3)OCH_2CH_3$) ; 0,95 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$) ; 0,13 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 174,2 (C, NHCO) ; 164,5 (C, C-4) ; 155,1 (C, C-2) ; 143,7 (CH, C-6) ; 135,3 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 135,1 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 134,9 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 134,0 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 131,1 (C, $=C(CH_3)_2$) ; 125,4 (CH, $HC=C(CH_3)$) ; 125,0 (CH, $HC=C(CH_3)$) ; 124,9 (CH, $HC=C(CH_3)$) ; 124,8 (CH, $HC=C(CH_3)$) ; 124,7 (CH, $HC=C(CH_3)$) ; 123,3 (t, $J_{CF} = 261$ Hz, CF_2 , C-2') ; 100,5-100,2 (m, CH, $CH(O)(CH_3)OCH_2CH_3$) ; 97,6 (CH, C-5) ; 86,0-84,9 (m, CH, C-1') ; 80,2-80,1 (m, CH, C-4') ; 71,1-70,3 (m, CH, C-3') ; 62,1-61,6 (m, CH_2 , $CH(O)(CH_3)OCH_2CH_3$) ; 60,5-60,3 (m, CH_2 , C-5') ; 40,2 (2 CH_2 ,

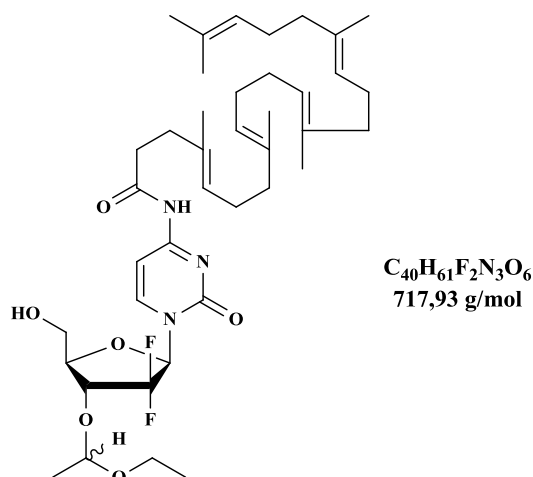
=C(CH₃)CH₂) ; 40,1 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,4 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 34,8 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 28,8 (2 CH₂) ; 27,3 (CH₂) ; 27,2 (CH₂) ; 27,1 (CH₂) ; 25,9 (4 CH₃, (CH₃)₃CSi, (CH₃)₂C=) ; 20,3-20,0 (m, CH₃, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 18,4 (C, (CH₃)₃CSi), 17,7 (CH₃) ; 16,2 (2 CH₃) ; 16,1 (2 CH₃) ; 15,3-15,2 (m, CH₃, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; -5,5 (m, 2CH₃, (CH₃)₂Si) ppm.

RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) : δ = -110,6-112,7 (m, 1 F) ; -113,4-115,4 (m, 1 F) ppm.

IR (film) : ν = 2956 ; 2926 ; 2859 ; 1723 ; 1681 ; 1628 ; 1558 ; 1492 ; 1441 ; 1391 ; 1322 ; 1271 ; 1257 ; 1196 ; 1129 ; 1082 ; 957 ; 871 ; 833 ; 812 ; 785 cm⁻¹.

SM (+APCI) : m/z = 832,9 (100%) [M+H]⁺.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-4-(1-Ethoxyéthoxy)-3,3-difluoro-5-(hydroxyméthyl)tétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**79**)



A une solution de l'éther silylé **78** (210 mg ; 0,25 mmol) dans du THF anhydre (0,5 mL) est ajoutée une solution de fluorure de tétrabutylammonium 1M dans le THF (0,5 mL ; 0,5 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures puis est repris dans de l'eau (2 mL). La phase aqueuse est alors extraite avec de l'AcOEt (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (5 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite pour fournir une huile incolore. Le produit brut est repris dans l'AcOEt puis filtré sur silice pour donner l'alcool **79** (154 mg ; 86%) sous forme d'une huile incolore.

R_f = 0,45 (AcOEt/cyclohexane, 2:1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8,44 (s large, 1 H, NH) ; 7,98-7,92 (m, 1 H, H-6) ; 7,45 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-5) ; 6,27-6,16 (m, 1 H, H-1') ; 5,22-5,06 (m, 5 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 4,95-4,87 (m, 1 H, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 4,62-4,45 (m, 1 H, H-3') ; 4,12-4,02 (m, 2 H, H-5') ; 3,92-3,81 (m, 1 H) ; 3,79-3,64 (m, 1 H) ; 3,61-3,46 (m, 1 H) ; 2,56-2,48 (m, 2 H, NHCOCH₂) ; 2,35 (t, J = 7,3 Hz, 2 H,

NHCOCH₂CH₂) ; 2,12-1,92 (m, 16 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 1,68 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,62 (s, 3 H, CH₃) ; 1,60 (s, 12 H, CH₃) ; 1,40-1,35 (m, 3 H, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 1,24-1,17 (m, 3 H, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ppm.

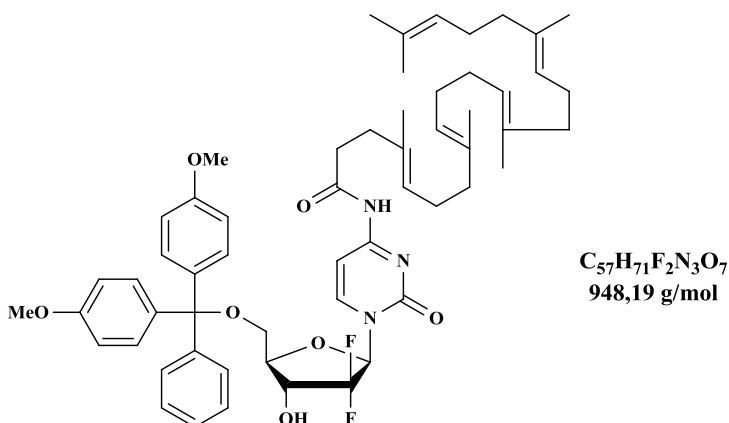
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,0 (C, NHCO) ; 162,7 (C, C-4) ; 156,0 (C, C-2) ; 145,0 (CH, C-6) ; 135,1 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 134,9 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 134,8 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 132,5 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 131,2 (C, =C(CH₃)₂) ; 126,0 (CH, HC=C(CH₃)) ; 124,4 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 124,2 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 123,3 (t, J_{CF} = 261 Hz, CF₂, C-2') ; 100,5-100,3 (m, CH, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 97,1 (CH, C-5) ; 86,6-85,2 (m, CH, C-1') ; 80,1-79,8 (m, CH, C-4') ; 71,3-70,4 (m, CH, C-3') ; 62,1-61,6 (m, CH₂, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 59,8 (CH₂, C-5') ; 39,7 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 39,5 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,6 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 34,4 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 28,3 (2 CH₂) ; 26,7 (2 CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 20,0 (CH₃, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ; 17,7 (CH₃) ; 16,0 (3 CH₃) ; 15,9 (CH₃) ; 15,0-14,9 (m, CH₃, CH(O)(CH₃)OCH₂CH₃) ppm.

RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) : δ = -110,7-113,4 (m, 2 F) ppm.

IR (film) : ν = 2959 ; 2923 ; 2857 ; 1723 ; 1665 ; 1624 ; 1556 ; 1495 ; 1438 ; 1394 ; 1322 ; 1274 ; 1195 ; 1125 ; 1099 ; 1081 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 718,6 (100%) [M+H]⁺ ; 740,6 (12%) [M+Na]⁺.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-5-((Bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)méthyl)-3,3-difluoro-4-hydroxytétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**81**)



A une solution de Gemcitabine-squalène **14** (438 mg ; 0,68 mmol) dans de la pyridine anhydre (4 mL), sont ajoutés 680 mg de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (2,0 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 jours. Le mélange est concentré sous pression réduite puis le résidu rouge obtenu est repris dans une solution saturée de bicarbonate de sodium (10 mL). Le mélange est extrait par de l'acétate d'éthyle (3×25 mL). Les phases organiques sont

rassemblées puis lavées avec de l'eau (20 mL) et une solution de saumure (20 mL), séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite pour donner une huile incolore. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane , 1:2) pour donner le composé protégé **81** (534 mg ; 83%) sous forme d'un solide blanc amorphe.

$R_f = 0,37$ (AcOEt/cyclohexane , 1:1).

$[\alpha]_D^{25} = +4,7$ ($c = 1,5$; MeOH).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9,06$ (s large, 1 H, NH) ; 8,12 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-6) ; 7,40-7,35 (m, 2 H, H-Ar) ; 7,30-7,20 (m, 8 H, H-Ar, H-5) ; 6,81 (d, $J = 8,5$ Hz, 4 H, H-Ar) ; 6,36 (dd, $J_{\text{HF}} = 8,7$ Hz, $J_{\text{HF}} = 5,4$ Hz, 1 H, H-1') ; 5,15-5,02 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 4,47 (td, $J_{\text{HF}} = 11,1$ Hz, $J = 9,0$ Hz, 1 H, H-3') ; 4,09 (m, 1 H, H-4') ; 3,75 (s, 6 H, Ar-OCH_3) ; 3,60 (d, $J = 10,7$ Hz, 1 H, H-5') ; 3,51 (dd, $J = 10,7$ Hz, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-5') ; 2,42-2,35 (m, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{C}$) ; 2,25 (t, $J = 7,9$ Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{C}$) ; 2,08-1,90 (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 1,64 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 1,56 (s, 12 H, CH_3) ; 1,55 (s, 3 H, CH_3) ppm.

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 173,0$ (C, NHCO) ; 162,9 (C, C-4) ; 158,7 (2 C, MeO-C) ; 155,3 (C, C-2) ; 144,4 (CH, C-6) ; 144,1 (C, $(\text{HC})_5\text{C-}$) ; 135,4 (C, $\text{MeOC}(\text{CH})_4\text{C-}$) ; 135,3 (C, $\text{MeOC}(\text{CH})_4\text{C-}$) ; 135,1 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,9 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 132,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 131,1 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 130,0 (2 CH, $\text{MeOC}(\text{CH})_4\text{C}$) ; 129,9 (2 CH, $\text{MeOC}(\text{CH})_4\text{C}$) ; 128,1 (2 CH, $\text{HC}(\text{HC})_4\text{C}$) ; 128,0 (2 CH, $\text{HC}(\text{HC})_4\text{C}$) ; 127,1 (CH, $\text{HC}(\text{HC})_4\text{C}$) ; 125,6 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,4 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,2 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 122,0 (t, $J_{\text{CF}} = 261$ Hz, CF_2 , C-2') ; 113,3 (4 CH, $\text{MeOC}(\text{CH})_4\text{C}$) ; 97,3 (CH, C-5) ; 86,9 (C, Ar_3C) ; 84,4 (dd, $J_{\text{CF}} = 41,2$ Hz, $J_{\text{CF}} = 21,1$ Hz, CH, C-1') ; 80,6 (d, $J_{\text{CF}} = 6,5$ Hz, CH, C-4') ; 69,9 (dd, $J_{\text{CF}} = 27,4$ Hz, $J_{\text{CF}} = 19,5$ Hz, CH, C-3') ; 61,0 (CH_2 , C-5') ; 55,2 (2 CH_3 , OCH_3) ; 39,7 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 39,5 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 36,2 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 34,3 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 28,2 (2 CH_2) ; 26,7 (2 CH_2) ; 26,6 (CH_2) ; 25,6 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 17,6 (CH_3) ; 16,0 (2 CH_3) ; 15,9 (CH_3) ; 15,8 (CH_3) ppm.

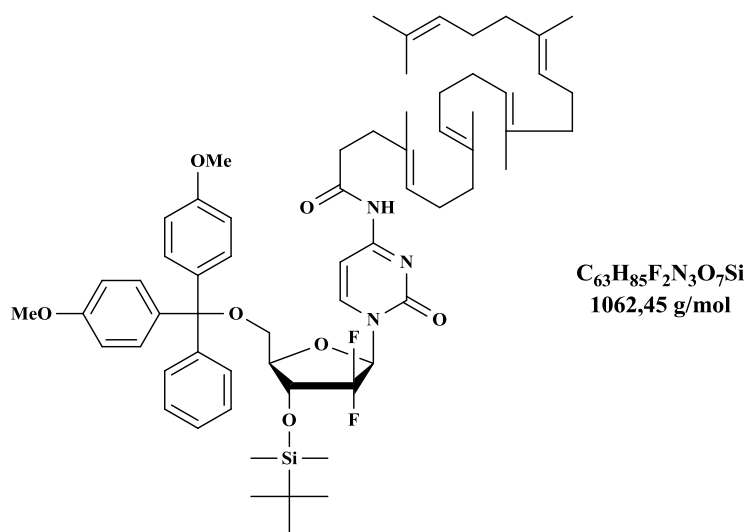
^{19}F RMN (188 MHz, CDCl_3) : $\delta = -115,9$ (d, $J_{\text{FF}} = 240$ Hz, 1 F) ; $-118,7$ (d, $J_{\text{FF}} = 240$ Hz, 1 F) ppm.

IR (film) : $\nu = 2924$; 2853 ; 1724 ; 1660 ; 1610 ; 1557 ; 1508 ; 1489 ; 1442 ; 1382 ; 1316 ; 1251 ; 1196 ; 1176 ; 1131 ; 1083 ; 1034 ; 992 ; 909 ; 826 cm^{-1} .

SM (+APCI) : $m/z = 949,3$ (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 646,7 (12%) $[\text{M-Ph}(\text{MeOPh})_2\text{C}+\text{H}]^+$; 303,2 (73%) $[\text{Ph}(\text{MeOPh})_2\text{C}]^+$.

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{57}\text{H}_{71}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_7 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C 71,52 ; H 7,58 ; N 4,39 ; mesurée: C 71,66 ; H 7,44 ; N 4,37.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-5-((Bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)méthyl)-4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-3,3-difluorotétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**82**)



A une solution de l'alcool protégé **81** (320 mg ; 0,34 mmol) dans du DCM anhydre (4 mL), sont ajoutés 182 mg de DBU (1,2 mmol) et 170 mg de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyl (1,13 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 36 heures à température ambiante puis repris dans une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (10 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par du DCM (3×20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution de saumure (20 mL), séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu visqueux obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 1:2) pour fournir le composé silylé **82** (322 mg ; 90%) sous forme d'une huile épaisse incolore.

$R_f = 0,69$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

$[\alpha]_D^{25} = -13,1$ ($c = 4,0$; EtOH).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8,63$ (s large, 1H, NH) ; 8,18 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H, H-6) ; 7,44-7,25 (m, 9 H, H-Ar) ; 7,17 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H, H-5) ; 6,85 (d, $J = 8,9$ Hz, 4 H, H-Ar) ; 6,38 (dd, $J_{HF} = 9,7$ Hz, $J_{HF} = 4,3$ Hz, 1 H, H-1') ; 5,22-5,06 (m, 5 H, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 4,48-4,36 (m, 1 H, H-3') ; 4,02 (d large, $J = 8,2$ Hz, 1 H, H-4') ; 3,81 (s, 6 H, Ar- OCH_3) ; 3,68 (d large, $J = 11,3$ Hz, 1 H, H-5') ; 3,34 (dd, $J = 11,3$ Hz, $J = 2,8$ Hz, 1 H, H-5') ; 2,56-2,48 (m, 2 H, $NHCOCH_2$) ; 2,34 (t, $J = 8,0$ Hz, 2 H, $NHCOCH_2CH_2$) ; 2,10-1,95 (m, 16 H, $=CHCH_2CH_2C(CH_3)=CH$) ; 1,68 (s, 3 H, $(CH_3)_2C=$) ; 1,63 (s, 3 H, CH_3) ; 1,60 (s, 12 H, CH_3) ; 0,80 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$) ; 0,07 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$) ; -0,06 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 173,1$ (C, NHCO) ; 162,9 (C, C-4) ; 158,8 (2 C, $MeOC(CH_3)_4C$) ; 154,8 (C, C-2) ; 144,1 (CH, C-6) ; 143,8 (C, $(HC)_5C$) ; 135,1 (2 C, $MeOC(CH_3)_4C$) ; 135,0 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 134,9 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 134,8 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 132,8 (C, $=C(CH_3)CH_2$) ; 131,2 (C, $=C(CH_3)_2$) ; 130,1 (4 CH, $MeOC(CH_3)_4C$) ; 128,2 (2 CH, $HC(HC)_4C$) ; 128,0 (2 CH, $HC(HC)_4C$) ; 127,3 (CH, $HC(HC)_4C$) ; 125,7 (CH,

HC=C(CH₃)) ; 124,4 (CH, HC=C(CH₃)) ; 124,3 (CH, HC=C(CH₃)) ; 124,2 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 121,7 (t, J_{CF} = 261 Hz, CF₂, C-2') ; 113,3 (4 CH, MeOC(CH₃)₄C) ; 97,2 (CH, C-5) ; 86,9 (C, Ar₃C) ; 84,7 (dd, J_{CF} = 40,1 Hz, J_{CF} = 24,4 Hz, CH, C-1') ; 80,8 (d, J_{CF} = 8,8 Hz, CH, C-4') ; 70,6 (dd, J_{CF} = 28,0 Hz, J_{CF} = 17,3 Hz, CH, C-3') ; 60,4 (CH₂, C-5') ; 55,2 (2 CH₃, OMe) ; 39,7 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 39,5 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,4 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 34,4 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 28,3 (2 CH₂) ; 26,7 (2 CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 25,6 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 25,4 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi) ; 17,9 (C, (CH₃)₃CSi) ; 17,6 (CH₃) ; 16,0 (2 CH₃) ; 15,9 (CH₃) ; 15,8 (CH₃) ; -4,9 (CH₃, (CH₃)₂Si) ; -5,4 (CH₃, (CH₃)₂Si) ppm.

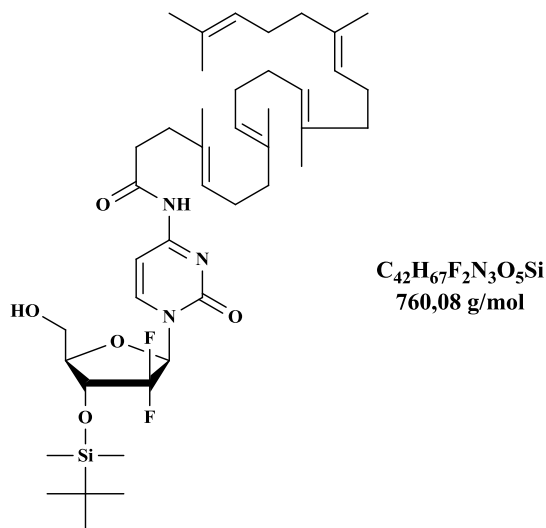
RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) : δ = -114,2 (d, J_{FF} = 239 Hz, 1 F) ; -116,7 (d, J_{FF} = 239 Hz, 1 F) ppm.

IR (film) : ν = 2960 ; 2930 ; 2857 ; 1722 ; 1678 ; 1625 ; 1608 ; 1555 ; 1510 ; 1492 ; 1443 ; 1389 ; 1342 ; 1318 ; 1252 ; 1211 ; 1177 ; 1133 ; 1091 ; 1068 ; 1036 ; 857 ; 838 ; 782 cm⁻¹.

SM (+APCI) : m/z = 1063,6 (100%) [M+H]⁺ ; 303,2 (25%) [Ph(MeOPh)₂C]⁺.

Analyse élémentaire : calculée pour C₆₃H₈₅F₂N₃O₇Si : C 71,22 ; H 8,06 ; N 3,96 ; mesurée : C 70,89 ; H 7,99 ; N 3,87.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(1-((2*R*,4*R*,5*R*)-4-((*tert*-Butyldiméthylsilyl)oxy)-3,3-difluoro-5-(hydroxyméthyl)tétrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**83**)



A une solution du composé **82** (520 mg ; 0,49 mmol) dans un mélange MeOH/dichlorométhane 1:1 (4mL), est ajouté à 0 °C 4 mL d'acide formique. Le mélange réactionnel qui devient immédiatement rouge est agité pendant 45 minutes à 0 °C. Le mélange est repris dans une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium (15 mL), puis extrait avec de l'AcOEt (3×20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec l'eau (20 mL), une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL) puis séchées sur MgSO₄ avant d'être concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est alors purifié par chromatographie sur gel de

silice (AcOEt/cyclohexane, 1:2) pour donner l'alcool **83** (288 mg ; 77%) sous forme de solide amorphe incolore.

$R_f = 0,47$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

$[\alpha]_D^{25} = +36,6$ ($c = 3,5$; EtOH).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 8,94$ (s large, 1 H, NH) ; $7,97$ (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-6) ; $7,46$ (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-5) ; $6,24$ (t, $J_{HF} = 7,6$ Hz, 1 H, H-1') ; $5,24$ - $5,04$ (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $4,43$ (td, $J_{HF} = 11,9$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H-3') ; $4,07$ (d large, $J = 11,9$ Hz, 1 H, H-5') ; $3,96$ (td, $J = 8,0$ Hz, $J_{HF} = 2,5$ Hz, 1 H, H-4') ; $3,81$ (d large, $J = 11,9$ Hz, 1 H, H-5') ; $3,10$ (s large, 1 H, OH) ; $2,60$ - $2,53$ (m, 2 H, NHCOCH_2) ; $2,34$ (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; $2,14$ - $1,97$ (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$) ; $1,68$ (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; $1,62$ (s, 3 H, CH_3) ; $1,60$ (s, 9 H, CH_3) ; $1,58$ (s, 3 H, CH_3) ; $0,91$ (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; $0,13$ (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; $0,12$ (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 173,8$ (C, NHCO) ; $163,2$ (C, C-4) ; $155,2$ (C, C-2) ; $145,0$ (CH, C-6) ; $135,0$ (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $134,8$ (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $134,7$ (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $132,8$ (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $131,1$ (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; $125,6$ (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; $124,3$ (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; $124,2$ (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; $124,1$ (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; $122,0$ (t, $J_{CF} = 261$ Hz, CF_2 , C-2') ; $97,5$ (CH, C-5) ; $85,3$ (t, $J_{CF} = 31,0$ Hz, CH, C-1') ; $81,6$ (CH, C-4') ; $69,7$ (t, $J_{CF} = 22,8$ Hz, CH, C-3') ; $59,2$ (CH_2 , C-5') ; $39,7$ (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $39,6$ (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $39,5$ (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; $36,3$ (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; $34,4$ (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; $28,2$ (2 CH_2) ; $26,7$ (2 CH_2) ; $26,6$ (CH_2) ; $25,6$ (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; $25,4$ (3 CH_3 , $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; $17,9$ (C, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$) ; $17,6$ (CH_3) ; $16,0$ (2 CH_3) ; $15,9$ (CH_3) ; $15,7$ (CH_3) ; $-5,0$ (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; $-5,4$ (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ppm.

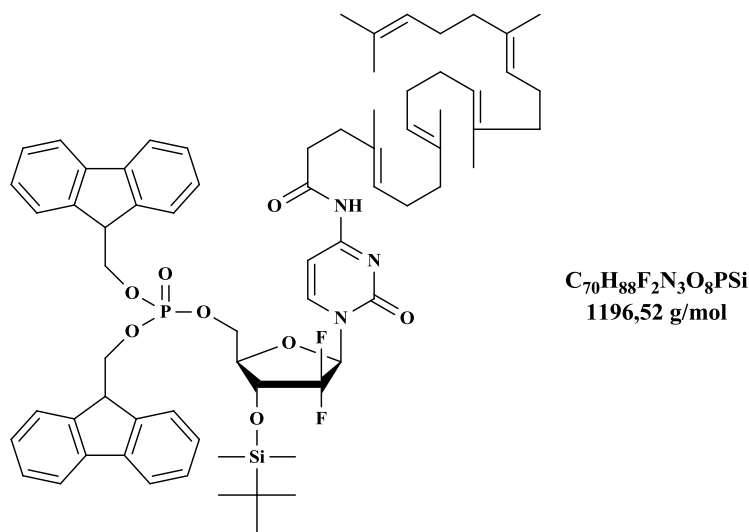
RMN ^{19}F (188 MHz, CDCl_3) : $\delta = -113,6$ (d, $J_{FF} = 238$ Hz, 1 F) ; $-115,1$ (d, $J_{FF} = 238$ Hz, 1 F) ppm.

IR (film) : $\nu = 3600$ - 3000 ; 2969 ; 2931 ; 2857 ; 1727 ; 1678 ; 1659 ; 1617 ; 1558 ; 1495 ; 1435 ; 1393 ; 1322 ; 1255 ; 1211 ; 1136 ; 1094 cm^{-1} .

SM (-ESI) : $m/z = 758,9$ (100%) $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$: C 66,37 ; H 8,88 ; N 5,53 ; mesurée : C 66,33 ; H 9,09 ; N 4,87.

❖ Bis((9*H*-fluorén-9-yl)méthyl) (((2*R*,3*R*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-4,4-difluoro-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèn-amido)pyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyl) phosphate (**84**)



A une solution de l'alcool primaire **83** (170 mg ; 0,224 mmol) dans de l'acétonitrile (0,2 mL) sont ajoutés séquentiellement une solution de 1*H*-tétrazole dans l'acétonitrile (0,45 M ; 2 mL ; 0,9 mmol) et une solution de phosphoramidite **68** (450 mg ; 0,86 mmol) dans du DCM anhydre (2 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 jours puis est refroidi à 0 °C et 0,6 mL d'eau oxygénée à 30 % (5,5 mmol) sont ajoutés lentement. Le mélange est agité à 0 °C pendant 4 heures supplémentaires et est repris dans une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (15 mL). Le mélange est extrait avec de l'AcOEt (4×25 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaHSO₃ (20 mL) et une solution de saumure (20 mL), séchées sur MgSO₄ et enfin concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 1:1) pour donner le phosphotriester **84** (214 mg ; 80%) sous forme d'une huile visqueuse incolore.

$R_f = 0,57$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

$[\alpha]_D^{25} = +17,1$ ($c = 1,4$; EtOH).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ = 9,03 (s large, 1 H, NH) ; 7,75-7,68 (m, 4 H, *H*-Fm) ; 7,57 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, *H*-6) ; 7,55-7,20 (m, 13 H, *H*-Fm, *H*-5) ; 6,26 (t, $J_{HF} = 7,9$ Hz, 1 H, *H*-1') ; 5,21 (t, $J = 6,6$ Hz, 1 H, HNCOCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 5,16-5,06 (m, 4 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; 4,37-4,24 (m, 4 H, CHCH₂OP) ; 4,11 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H, CH-CH₂OP) ; 4,05 (m, 1 H, *H*-3') ; 3,93 (s large, 2 H, *H*-5') ; 3,85 (s large, 1 H, *H*-4') ; 2,65-2,68 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂C(CH₃)) ; 2,37 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, NHCOCH₂CH₂C(CH₃)) ; 2,12-1,93 (m, 16 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 1,68 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,63 (s, 3 H, CH₃) ; 1,60 (s, 9 H, CH₃) ; 1,59 (s, 3 H, CH₃) ; 0,85 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi) ; 0,06 (s, 3 H, (CH₃)₂Si) ; 0,00 (s, 3 H, (CH₃)₂Si) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 173,0 (C, NHCO) ; 162,9 (C, C-4) ; 154,8 (C, C-2) ; 144,3 (CH, C-6) ; 143,0 (C, Fm) ; 142,9 (3 C, Fm) ; 141,7 (C, Fm) ; 141,6 (C, Fm) ; 141,5 (2 C, Fm) ; 135,2 (C,

=C(CH₃)CH₂) ; 135,0 (2 C, =C(CH₃)CH₂) ; 132,9 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 131,3 (C, =C(CH₃)₂) ; 128,1 (4 CH, Fm) ; 127,3 (4 CH, Fm) ; 126,0 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,0 (3 CH, Fm) ; 124,9 (CH, Fm) ; 124,6 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 124,4 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 121,3 (t, J_{CF} = 261 Hz, CF₂, C-2') ; 120,3–120,1 (m, 4 CH, Fm) ; 97,2 (CH, C-5) ; 84,6 (m, CH, C-1') ; 80,0 (t, J_{CF} = 7,0 Hz, CH, C-4') ; 71,2 (dd, J_{CF} = 29,2 Hz, J_{CF} = 18,0 Hz, CH, C-3') ; 69,5 (m, 2 CH₂, FmCH₂OP) ; 64,3 (d, J_{CP} = 4,3 Hz, CH₂, C-5') ; 48,0 (d, J_{CP} = 6,7 Hz, CH, FmC-9) ; 47,9 (d, J_{CP} = 6,7 Hz, CH, FmC-9) ; 39,9 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 39,7 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 36,7 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 34,6 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 28,4 (2 CH₂) ; 26,9 (2 CH₂) ; 26,8 (CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 25,6 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi) ; 18,0 (C, (CH₃)₃CSi) ; 17,8 (CH₃) ; 16,2 (2 CH₃) ; 16,1 (CH₃) ; 16,0 (CH₃) ; -4,8 (CH₃, (CH₃)₂Si) ; -5,3 (CH₃, (CH₃)₂Si) ppm.

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ = -115,1 (d, J_{FF} = 240 Hz, 1 F) ; -117,9 ppm (d, J_{FF} = 240 Hz, 1 F) ppm.

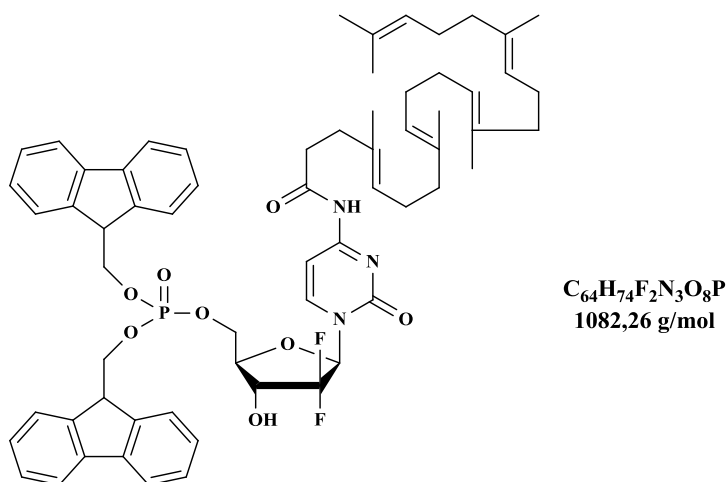
RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) : δ = -0,86 (hept, J_{PH} = 6,0 Hz) ppm.

IR (film) : ν = 2929 ; 2855 ; 1722 ; 1677 ; 1625 ; 1555 ; 1492 ; 1449 ; 1433 ; 1390 ; 1319 ; 1269 ; 1253 ; 1212 ; 1134 ; 1091 ; 1014 ; 989 ; 839 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1235,8 (15%) [M+K]⁺ ; 1219,8 (40%) [M+Na]⁺ ; 1197,1 (100%) [M+H]⁺.

Analyse élémentaire : calculée pour C₇₀H₈₈F₂N₃O₈PSi : C 70,27 ; H 7,41 ; N 3,51 ; mesurée : C 70,10 ; H 7,44 ; N 3,69.

❖ Bis((9*H*-fluorén-9-yl)méthyl) (((2*R*,3*R*,5*R*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentamethyldocosa-4,8,12,16,20-pentaènamidopyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyl) phosphate (**72**)



A une solution du phosphotriester **84** (250 mg ; 0,21 mmol) dans de la pyridine anhydre (0,5 mL) est ajouté à 0 °C 0,5 mL de HF.pyridine (70% w/w ; 19,5 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures puis refroidi à 0 °C. Une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (5 mL) est alors ajoutée lentement. Le mélange est ensuite extrait par de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec

une solution de saumure (10 mL), séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 1:1 puis 2:1) pour fournir l'alcool **72** (155 mg ; 68%) sous forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,15$ (AcOEt/cyclohexane, 1:1).

$[\alpha]_D = +19,0$ ($c = 2,9$; EtOH).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9,03$ (s large, 1 H, NH) ; 7,69 (t, $J = 7,3$ Hz, 4 H, H-Fm) ; 7,57 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H, H-6) ; 7,49 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, H-Fm) ; 7,42 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, H-Fm) ; 7,38–7,18 (m, 9 H, H-Fm, H-5) ; 6,28 (t, $J_{\text{HF}} = 7,6$ Hz, 1 H, H-1') ; 5,19 (t, $J = 6,6$ Hz, 1 H, $\text{HNCOCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 5,20–5,05 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 4,82 (s large, 1 H, OH) ; 4,40–3,96 (m, 10 H, CH_2OP , CHCH_2OP , H-3', H-4', 2 H-5') ; 2,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,40–2,25 (m, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,17–1,90 (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 1,68 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 1,62 (s, 3 H, CH_3) ; 1,60 (s, 9 H, CH_3) ; 1,58 (s, 3 H, CH_3) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 173,2$ (C, CONH) ; 162,9 (C, C-4) ; 155,0 (C, C-2) ; 144,3 (CH, C-6) ; 142,8 (2 C, Fm) ; 142,7 (2 C, Fm) ; 141,4 (3 C, Fm) ; 141,3 (C, Fm) ; 135,1 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,9 (2 C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 132,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 131,2 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 127,9 (4 CH, Fm) ; 127,1 (4 CH, Fm) ; 125,7 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,9 (CH, Fm) ; 124,8 (3 CH, Fm) ; 124,4 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,2 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 121,5 (t, $J_{\text{CF}} = 261$ Hz, CF_2 , C-2') ; 120,1 (3 CH, Fm) ; 120,0 (CH, Fm) ; 97,2 (CH, C-5) ; 84,6 (m, CH, C-1') ; 79,6 (m, CH, C-4') ; 70,2 (m, CH, C-3') ; 69,4 (m, 2 CH_2 , FmCHCH_2OP) ; 65,0 (d, $J_{\text{CP}} = 4,1$ Hz, CH_2 , C-5') ; 47,8 (d, $J_{\text{CP}} = 8,2$ Hz, CH, FmC-9) ; 47,7 (d, $J_{\text{CP}} = 7,8$ Hz, CH, FmC-9) ; 39,7 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 39,5 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 36,4 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 34,5 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 28,2 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 26,8 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 26,7 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 26,6 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 25,7 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 17,6 (CH_3) ; 16,0 (3 CH_3) ; 15,9 (CH_3) ppm.

RMN ^{19}F (188 MHz, CDCl_3) : $\delta = -115,4$ (d, $J_{\text{FF}} = 243$ Hz, 1 F) ; $-118,5$ (d, $J_{\text{FF}} = 243$ Hz, 1 F) ppm.

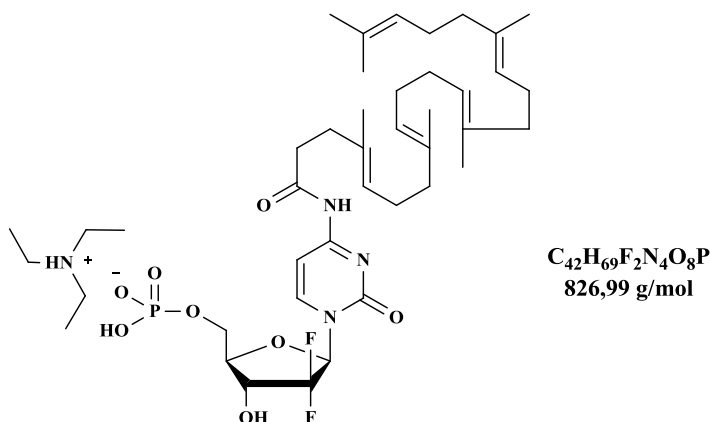
RMN ^{31}P (81 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0,00$ (s) ppm.

IR (film) : $\nu = 3500\text{--}2900$; 3293 ; 2969 ; 2921 ; 2853 ; 1727 ; 1678 ; 1661 ; 1623 ; 1558 ; 1491 ; 1449 ; 1385 ; 1320 ; 1269 ; 1199 ; 1133 ; 1077 ; 1022 ; 741 cm^{-1} .

SM (+APCI) : $m/z = 1082,5$ (10%) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 646,5 (100%) $[\text{M}-(\text{FmO})_2\text{PO} + \text{H}]^+$.

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{64}\text{H}_{74}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_8\text{P} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C 70,44 ; H 6,93 ; N 3,85 ; mesurée : C 70,35 ; H 6,77 ; N 4,03.

❖ ((2*R*,3*R*,5*R*)-4,4-Difluoro-3-hydroxy-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyldocosa-4,8,12,16,20-pentaénamido)pyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyl hydrogénophosphate de triéthylammonium (**31a**)



A une solution du phosphotriester **72** (140 mg ; 0,13 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (3 mL) est ajoutée de la triéthylamine (5 mL ; 36 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante puis concentré sous pression réduite. La poudre blanche obtenue est lavée avec de l'éther diéthylique (3×5 mL) puis séché. Le solide est repris dans le méthanol (5 mL), la solution est filtrée puis concentrée sous pression réduite pour donner le phosphate d'ammonium **31a** (105 mg ; 98%) sous forme d'une solide blanc amorphe.

[α]_D²⁵ = +25,1 (c = 0,88 ; EtOH).

RMN ¹H (400 MHz, [D₄]MeOH) : δ = 8,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H, H-6) ; 7,54 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H, H-5) ; 6,27 (t, *J_{HF}* = 6,9 Hz, 1 H, H-1') ; 5,20 (t, *J* = 6,8 Hz, 1 H, HNC(=O)CH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 5,18-5,05 (m, 4 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 4,39 (td, *J* = 12,7 Hz, *J* = 8,4 Hz, 1 H, H-3') ; 4,28 (d large, *J* = 12,7 Hz, 1 H, H-5') ; 4,15 (ddd, *J* = 12,7 Hz, *J* = 6,1 Hz, *J₃* = 2,4 Hz, 1 H, H-5') ; 4,06 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H, H-4') ; 3,23 (q, *J* = 7,3 Hz, 6 H, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ; 2,54 (t, *J* = 7,5 Hz, 2 H, NHCOCH₂CH₂) ; 2,34 (t, *J* = 7,5 Hz, 2 H, NHCOCH₂CH₂) ; 2,13-1,93 (m, 16 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 1,66 (s, 3 H, (CH₃)₂C=) ; 1,65 (s, 3 H, CH₃) ; 1,59 (s, 12 H, CH₃) ; 1,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 9 H, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, [D₄]MeOH) : δ = 175,2 (C, NHCO) ; 164,8 (C, C-2) ; 157,7 (C, C-4) ; 146,1 (CH, C-6) ; 136,0 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 135,9 (2 C, =C(CH₃)CH₂) ; 134,8 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 132,1 (C, =C(CH₃)₂) ; 126,5 (CH, HNC(=O)CH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 125,7 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,6 (CH, HC=C(CH₃)) ; 125,5 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 123,9 (t, *J_{CF}* = 258 Hz, CF₂, C-2') ; 98,7 (CH, C-5) ; 86,5 (dd, *J_{CF}* = 38,1 Hz, *J_{CF}* = 26,8 Hz, CH, C-1') ; 81,5 (m, CH, C-4') ; 70,0 (dd, *J_{CF}* = 24,0 Hz, *J_{CF}* = 20,5 Hz, CH, C-3') ; 63,1 (d, *J_{CP}* = 4,0 Hz, CH₂, C-5') ; 47,8 (3 CH₂, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ; 40,9 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 40,7 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 37,2 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 35,7 (CH₂, NHCOCH₂CH₂) ; 29,2 (2 CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 27,8 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 27,7 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 27,6 (CH₂, =C(CH₃)CH₂) ; 25,9 (CH₃, (CH₃)₂C=) ; 17,8 (CH₃) ; 16,2 (2 CH₃) ; 16,1 (2 CH₃) ; 9,2 (3 CH₃, (CH₃CH₂)₃NH⁺) ppm.

RMN ^{19}F (188 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = -119,3$ (dd, $J_{\text{FF}} = 239,2$ Hz, $J_{\text{HF}} = 12,3$ Hz, 1 F) ; $-120,2$ (d large, $J_{\text{FF}} = 239,2$ Hz, 1 F) ppm.

RMN ^{31}P (162 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = 1,38$ (s) ppm.

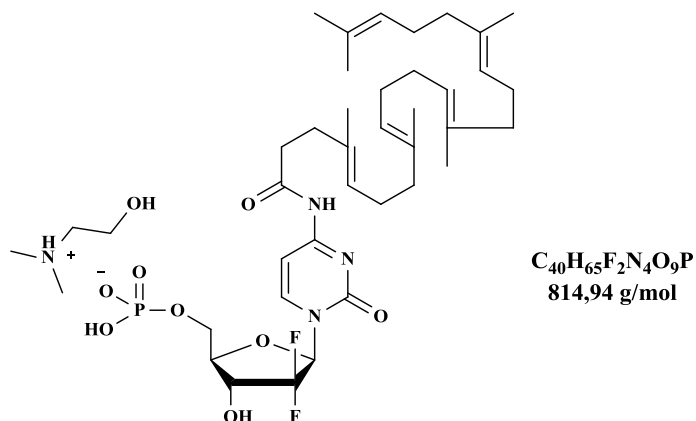
IR (film) : $\nu = 3500\text{--}2800$; 2992 ; 2933 ; 2840 ; 1722 ; 1677 ; 1616 ; 1562 ; 1494 ; 1435 ; 1392 ; 1320 ; 1199 ; 1140 ; 1091 cm^{-1} .

SM (+ESI) : $m/z = 827,7$ (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 770,6 (86%).

SMHR (–ESI) : calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_8\text{F}_2\text{P}$: 724,3538 ; mesurée : 724,3552.

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 59,70 ; H 8,47 ; N 6,63 ; mesurée : C 59,91 ; H 8,34 ; N 6,52.

❖ ((2*R*,3*R*,5*R*)-4,4-Difluoro-3-hydroxy-5-(2-oxo-4-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl docosa-4,8,12,16,20-pentaèn amido)pyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)méthyl hydrogénophosphate de 2-hydroxy-*N,N*-diméthyléthaniminium (**31b**)



Une solution du phosphotriester **72** (88 mg ; 0,081 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (1,5 mL) est traitée par de la diméthyléthanolamine (2,5 mL ; 25 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante puis est concentré sous pression réduite. La poudre blanche obtenue est lavée avec de l'éther diéthylique (3×5 mL) puis reprise dans le méthanol (4 mL). La solution est filtrée puis concentrée sous pression réduite pour donner le phosphate d'ammonium **31b** (56 mg ; 85%) sous forme d'une solide blanc amorphe.

$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{c}}$ = +22,5 ($c = 1,7$; EtOH).

RMN ^1H (400 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = 8,35$ (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-6) ; 7,55 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-5) ; 6,27 (dd, $J_{\text{HF}} = 6,7$ Hz, $J_{\text{HF}} = 6,6$ Hz, 1 H, H-1') ; 5,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 1 H, $\text{HNCCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 5,16–5,06 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 4,40 (td, $J = 12,6$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 1 H, H-3') ; 4,28 (d large, $J = 12,7$ Hz, 1 H, H-5') ; 4,14 (ddd, $J = 12,7$ Hz, $J = 6,1$ Hz, $J_3 = 2,4$ Hz, 1 H, H-5') ; 4,06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H, H-4') ; 3,85

(t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$) ; 3,21 (t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,88 (s, 6 H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,54 (t, $J = 7,7$ Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,33 (t, $J = 7,7$ Hz, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,14-1,92 (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 1,66 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 1,65 (s, 3 H, CH_3) ; 1,59 (s, 12 H, CH_3) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = 175,2$ (C, CONH) ; 164,8 (C, C-4) ; 157,7 (C, C-2) ; 146,1 (CH, C-6) ; 136,0 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 135,9 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 135,8 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 134,4 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 132,0 (C, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 126,5 (CH, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 125,6 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 125,5 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 123,9 (t, $J_{\text{CF}} = 259$ Hz, CF_2 , C-2') ; 98,7 (CH, C-5) ; 86,4 (dd, $J_{\text{CF}} = 33,0$ Hz, $J_{\text{CF}} = 29,0$ Hz, CH, C-1') ; 81,5 (t, $J_{\text{CF}} = 6,5$ Hz, CH, C-4') ; 69,9 (t, $J_{\text{CF}} = 22,5$ Hz, CH, C-3') ; 63,0 (d, $J_{\text{CP}} = 4,3$ Hz, CH_2 , C-5') ; 60,4 (CH_2 , $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$) ; 56,8 (CH_2 , $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 43,7 (s, 2 CH_3 , $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$) ; 40,8 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 40,7 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 37,2 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 35,7 (CH_2 , $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) ; 29,2 (2 CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 27,8 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 27,7 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 27,6 (CH_2 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$) ; 25,9 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$) ; 17,8 (CH_3) ; 16,2 (2 CH_3) ; 16,1 (2 CH_3) ppm.

RMN ^{19}F (188 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = -117,2$ (d, $J = 246$ Hz, 1 F) ; $-118,5$ (d, $J = 246$ Hz, 1 F) ppm.

RMN ^{31}P (81 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$) : $\delta = 2,10$ (s) ppm.

IR (film) : $\nu = 3500\text{--}2500$; 2991 ; 2915 ; 1715 ; 1667 ; 1621 ; 1560 ; 1490 ; 1444 ; 1384 ; 1315 ; 1279 ; 1196 ; 1136 ; 1080 cm^{-1} .

SM (+ESI) : $m/z = 770,6$ (37%) ; 748,6 (50%) ; 726,6 (51%) $[\text{M} - \text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2 + \text{H}]^+$; 646,7 (100%).

SMHR (-ESI) : calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_8\text{F}_2\text{P}$: 724,3538; mesurée : 724,3564.

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_9\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 57,68 ; H 8,11 ; N 6,73 ; mesurée : C 57,52 ; H 8,11 ; N 7,11.

Préparation et caractérisation des nanoparticules des phosphates d'ammonium 31a et 31b : une solution du composé **31a** ou **31b** (3 mg) dans l'éthanol (0,5 mL) est ajouté goutte à goutte, sous agitation (500 t/min) à une solution aqueuse à 5% de dextrose (1 mL). Les nanoparticules se forment alors spontanément. La solution est agitée pendant 2 minutes supplémentaires. La suspension est alors transférée dans un ballon taré puis l'éthanol est évaporé sous pression réduite (30 mm Hg) à température ambiante en utilisant un évaporateur rotatif pendant environ 10 minutes. Le ballon est alors plongé dans un bain d'eau à 37 °C pour environ 5 minutes. L'évaporation continue jusqu'à ce que la masse totale de la suspension atteigne 0,8 – 0,9 g. Le poids de la suspension est ajusté jusqu'à 1,0 g en utilisant de l'eau mQ. Le diamètre moyen des nanoparticules est déterminé à 25 °C par diffusion quasi-élastique de la lumière avec un Zétasizer Malvern.

Les expériences de Microscopie Electronique en Transmission (MET) ont été effectuées sur des échantillons des nanoparticules de sels **31a** et **31b** avec un Microscope Jeol 2000EX au « Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay » (UMR 8080 CNRS). Une goutte (5 µL) de la suspension de nanoparticules est déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone. 5 minutes après le dépôt, le surplus est retiré à l'aide d'un papier absorbant. Une goutte d'acide phosphotungstique à 1% dans l'eau est déposée puis est laissée 30 secondes sur la grille. Les observations ont été faites à un voltage de 200 kV sous un faible flux d'électrons.

Les expériences de Cryo-Microscopie Electronique en Transmission (CryoMET) ont été effectuées avec un Microscope Electronique Jeol 2100 au service de « Microscopie Electronique de l'Institut de Biologie Intégrative » (IFR 83 CNRS Paris). Une goutte (5 µL) de la suspension de nanoparticules à 2 mg/mL est déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone. L'échantillon est alors vitrifié rapidement en le plongeant dans de l'éthane liquide. L'échantillon est ensuite transféré vers un conteneur à cryo-échantillons. Les observations sont faites à un voltage de 200kV sous un faible flux d'électrons. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ.

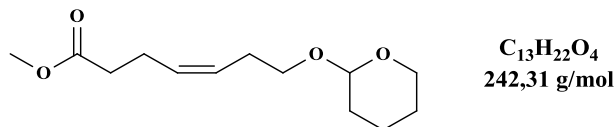
Expériences de diffusion des rayons X aux petits angles : Ces expériences ont été effectuées au synchrotron Autrichien à ELETTRA par Claudie Bourgaux et Elise Lepeltier. Les courbes de diffusion des rayons X aux petits angles ont été enregistrées avec un détecteur gazeux linéaire sensible à la position, rempli d'un mélange argon/éthane.

Activité anticancéreuse in vitro : Les lignées cellulaires L1210 wt (lignée cellulaire leucémie lymphoïde murine sauvage) et L1210 10K (lignée cellulaire résistante mutante de la lignée L1210 wt) sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 GlutaMAX I, complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et de la glutamine (2M). L'activité anticancéreuse de la Gemcitabine (**1**), des nanoparticules de Gemcitabine-squalène **14**, et des nanoparticules des phosphates **31a** et **31b** sur ces lignées cellulaires ont été déterminées en utilisant le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphényl tétrazolium (MTT), en mesurant l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. Les cellules ont été disséminées dans des plaques 96 puits (5000 cellules par puit) et pré-incubées pour 24 heures à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Différentes dilutions des composés **1**, **14**, **31a** et **31b** ont été ajoutées aux cellules dans le milieu de culture. Après 72 heures d'incubation à 37 °C, 200 µL de solution MTT (0,5 mg/mL dans le milieu de culture) sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont de nouveau incubées pendant 2,5 heures à 37 °C. Le milieu de culture est retiré et les cristaux de formazan restants sont dissous dans 200 µL de DMSO. L'absorbance de la solution colorée obtenue, qui est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, a été mesurée à 570 nm par un lecteur de Plaque (Metertech Σ 960, Fisher

Bioblock, Illkirch, France). La concentration inhibitrice à 50% (CI50) des différents composés résulte d'une moyenne de 3 expériences effectuées simultanément dans la même journée, dans différents puits.

IV.3. Conjugués hybrides du Paclitaxel

❖ (Z)-7-(Tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hept-4-énoate de méthyle (**117**)

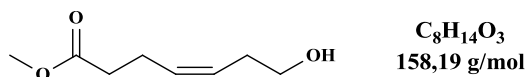


A une solution de bromure de 2-(tétrahydropyran-2-yloxy)-éthyle triphénylphosphonium **110** (8,0 g ; 16,5 mmol) dans du THF anhydre (130 mL), sont ajoutés goutte à goutte et à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8,3 mL d'une solution de NaHMDS 2M dans le THF (16,6 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes supplémentaires à cette même température, puis est ensuite refroidi à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Une solution de 4-oxobutanoate de méthyle (**109**) (3,0 g ; 25,8 mmol) dans le THF anhydre (50 mL) est alors ajoutée goutte à goutte. Le mélange est ramené progressivement à température ambiante. Après 16 heures, le mélange est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans un mélange $\text{Et}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{aq}}$ 1:1 et extrait par de l'éther diéthylique ($3\times 100\text{ mL}$). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure, séchées sur MgSO_4 anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O , 4:1) pour donner l'oléfine **117** (2,84 g ; 71 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,52-5,39 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 4,60-4,55 (m, 1 H, $\text{OCH}(\text{O})\text{CH}_2$) ; 3,90-3,81 (m, 1 H) ; 3,72 (td, $J = 9,5\text{ Hz}$, $J = 7,0\text{ Hz}$, 1 H) ; 3,65 (s, 3 H, CO_2CH_3) ; 3,53-3,44 (m, 1 H) ; 3,39 (td, $J = 9,5\text{ Hz}$, $J = 7,0\text{ Hz}$, 1 H) ; 2,44-2,31 (m, 6 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 1,86-1,44 (m, 6 H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 173,5 (C, CO_2CH_2) ; 129,3 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 127,4 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 98,7 (CH, $\text{OCH}(\text{O})\text{CH}_2$) ; 68,8 (CH_2) ; 62,2 (CH_2) ; 51,5 (CH_3 , CO_2CH_3) ; 34,0 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$) ; 30,7 (CH_2) ; 27,9 (CH_2) ; 25,4 (CH_2) ; 22,8 (CH_2) ; 19,5 (CH_2) ppm.

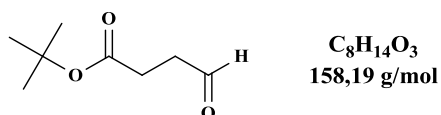
❖ (Z)-7-hydroxyhept-4-énoate de méthyle



A une solution de **117** (180 mg ; 0,74 mmol) dans le MeOH (15 mL) est ajouté de 30 mg d'APTS monohydrate (0,16 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure puis 10 mL de $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ sont ajoutés. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et la phase aqueuse obtenue est extraite avec de l'AcOEt ($3\times 15\text{ mL}$). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure, séchées sur MgSO_4 anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le brut obtenu est

purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt:cyclohexane 1:1) pour donner le (Z)-7-hydroxyhept-4-énoate de méthyle (120 mg ; quant.) sous forme d'un liquide incolore.

❖ 4-Oxobutanoate de *tert*-butyle (**120**)



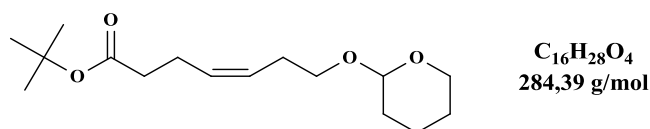
A une solution d'acide pent-4-énoïque (**115**) (8,0 mL ; 78,4 mmol) sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C du chlorure d'oxalyle (7,3 mL ; 86,2 mmol). Le mélange est agité pendant 2 heures à 0 °C puis 1 nuit à 20 °C. Le mélange est ensuite refroidi à 0 °C puis un mélange de 4-DMAP (14 g ; 115 mmol), de *t*-BuOH (39 g ; 523 mmol) dans du DCM (15 mL) est ajouté lentement. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 16 heures puis concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 95:5) pour donner l'ester **119** (8,0 g ; 65 %) sous forme d'un liquide incolore. Celui-ci est repris dans 50 mL de DCM. On fait alors barboter un courant à 5% d'ozone dans la solution refroidie à -78 °C jusqu'à obtention d'une solution de couleur bleue. L'ozone est alors purgée avec de l'oxygène pendant quelques minutes puis de la triphénylphosphine (15,7 g, 60,0 mmol) est ajoutée lentement à -78 °C. Le mélange est ramené à 20 °C et agité 16 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie (Ether de pétrole/AcOEt 9:1) pour donner le 4-oxobutanoate de *tert*-butyle (**120**) (7,0 g ; 76 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9,79 (s large, 1 H, CHO) ; 2,72 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, CO₂CCH₂CH₂CHO) ; 2,54 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, CO₂CCH₂CH₂CHO) ; 1,44 (s, 9 H, (CH₃)₃CO) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 200,3 (CH, CHO) ; 181,4 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 80,7 (C, CH₂CO₂C(CH₃)₃) ; 38,7 (CH₂, O₂CCH₂CH₂CHO) ; 28,0 (3 CH₃, CH₂COOC(CH₃)₃) ; 27,9 (CH₂, CH₂CH₂CHO) ppm.

IR (film) : ν = 2981 ; 1722 ; 1367 ; 1242 ; 1150 ; 844 cm⁻¹.

❖ (Z)-7-(Tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hept-4-énoate de *tert*-butyle (**121**)



A une solution du phosphonium **110** (1,0 g ; 2,06 mmol) dans du THF anhydre (20 mL), sont ajoutés goutte à goutte et à -40 °C, une solution de NaHMDS 1M dans le THF (2,2 mL ; 2,2 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes à cette même température, puis refroidi à -78 °C et 320 mg de 4-oxobutanoate de *tert*-butyle (**120**) (2,02 mmol) dans du THF anhydre (7 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité toute la nuit à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu brut obtenu est purifié par

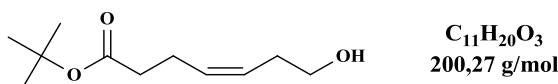
chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O, 9:1) pour donner l'oléfine **121** (350 mg ; 61 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,51-5,33 (m, 2 H, CH₂CH=CHCH₂) ; 4,56 (t, J = 3,5 Hz, 1 H, OCH(O)CH₂) ; 3,89-3,78 (m, 1 H) ; 3,70 (td, J = 9,5 Hz, J = 7,0 Hz, 1 H) ; 3,52-3,42 (m, 1 H), 3,37 (td, J = 9,5 Hz, J = 6,9 Hz, 1 H) ; 2,40-2,17 (m, 6 H, O₂CCH₂CH₂CH=CHCH₂CH₂) ; 1,85-1,37 (m, 15 H, (CH₃)₃CO, CHCH₂CH₂CH₂CH₂O) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 172,5 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 129,7 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 127,0 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 98,7 (CH, OCH(O)CH₂) ; 80,2 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 66,9 (CH₂) ; 62,3 (CH₂) ; 35,5 (CH₂, CO₂CCH₂CH₂) ; 30,6 (CH₂) ; 28,1 (3 CH₃, CO₂C(CH₃)₃) ; 27,9 (CH₂) ; 25,5 (CH₂) ; 23,0 (CH₂) ; 19,6 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2941 ; 1729 ; 1366 ; 1257 ; 1149 ; 1121 ; 1076 ; 1032 ; 985 cm⁻¹.

❖ (Z)-7-Hydroxyhept-4-énoate de *tert*-butyle



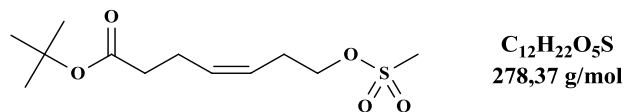
A une solution de l'ester **121** (300 mg ; 1,05 mmol) dans du MeOH (20 mL) sont ajoutés 90 mg (0,47 mmol) d'APTS monohydrate. Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures puis 10 mL de NaHCO_{3aq} sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite, et la phase aqueuse résiduelle est extraite par de l'AcOEt (3×15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (15 mL), séchées sur MgSO₄, puis concentrées sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole:Et₂O 1:1) pour donner le (Z)-7-hydroxyhept-4-énoate de *tert*-butyle (190 mg ; 90 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,56-5,36 (m, 2 H, CH₂CH=CHCH₂) ; 3,65 (t, J = 6,3 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH₂OH) ; 2,43-2,23 (m, 6 H, O₂CCH₂CH₂CH=CHCH₂CH₂) ; 1,43 (s, 9 H, (CH₃)₃CO) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 172,7 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 131,1 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 126,8 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 80,4 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 62,1 (CH₂, =CHCH₂CH₂OH) ; 35,2 (CH₂, CO₂CCH₂CH₂) ; 30,8 (CH₂) ; 28,1 (3 CH₃, C O₂C(CH₃)₃) ; 22,9 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2979 ; 1727 ; 1367 ; 1255 ; 1148 ; 1049 ; 846 ; 727 cm⁻¹.

❖ (Z)-7-(Méthylsulfonyloxy)hept-4-énoate de *tert*-butyle (**126**)



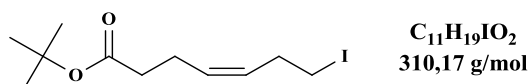
A une solution du (Z)-7-hydroxyhept-4-énoate de *tert*-butyle (190 mg ; 0,90 mmol) dans du DCM anhydre (6 mL), sont ajoutés à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 167 mg de triéthylamine (1,65 mmol) puis du chlorure de mésyle (163 mg ; 1,42 mmol). Le mélange est agité à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 45 minutes puis repris dans l'eau (5 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM ($3\times 15\text{ mL}$). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (15 mL), séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite pour donner le mésylate **126** (249 mg ; quant.) sous forme d'un liquide jaune pâle qui est utilisé directement sans autre purification.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,59-5,48 (m, 1 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 5,46-5,34 (m, 1 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 4,21 (t, J = 6,8 Hz, 2 H, CH_2CH_2OMs) ; 3,01 (s, 3 H, OSO_2CH_3) ; 2,53 (q, J = 6,8 Hz, 2 H, $=CHCH_2CH_2OMs$) ; 2,39-2,23 (m, 4 H, $O_2CCH_2CH_2CH=CH$) ; 1,44 (s, 9 H, $(CH_3)_3CO$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 172,3 (C, $CO_2C(CH_3)_3$) ; 131,9 (CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 124,1 (CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 80,4 (C, $CO_2C(CH_3)_3$) ; 69,1 (CH_2 , CH_2CH_2OMs) ; 37,4 (CH_3 , OSO_2CH_3) ; 37,4 (CH_2 , $O_2CCH_2CH_2$) ; 28,1 (3 CH_3 , $CO_2C(CH_3)_3$) ; 27,3 (CH_2) ; 23,0 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 2979 ; 1723 ; 1353 ; 1256 ; 1172 ; 1149 ; 956 ; 914 ; 804 ; 733 cm^{-1} .

❖ (Z)-7-iodohept-4-énoate de *tert*-butyle



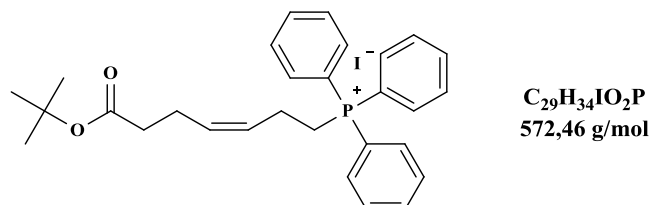
A une solution du mésylate **126** (240 mg ; 0,86 mmol) dans l'acétone (3 mL) sont ajoutés 410 mg d'iodure de sodium (2,7 mmol). Le mélange est agité au reflux de l'acétone pendant 4 heures puis concentré sous pression réduite et repris dans de l'eau (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM ($3\times 10\text{ mL}$). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium (10 mL), séchées sur $MgSO_4$ anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 9:1) pour donner le (Z)-7-iodohept-4-énoate de *tert*-butyle (240 mg ; 90 %) sous forme d'un liquide jaune pâle.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,56-5,45 (m, 1 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 5,42-5,31 (m, 1 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 3,14 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, CH_2CH_2I) ; 2,65 (q, J = 7,2 Hz, 2 H, $CH=CHCH_2CH_2I$) ; 2,36-2,24 (m, 4 H, $O_2CCH_2CH_2CH=CH$) ; 1,44 (s, 9 H, $(CH_3)_3CO$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ = 172,4 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 130,4 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 129,0 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 80,3 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 35,2 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$) ; 31,3 (CH_2) ; 28,1 (3 CH_3 , $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 23,1 (CH_2) ; 5,3 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$) ppm.

IR (film) : ν = 2977 ; 1728 ; 1366 ; 1242 ; 1151 cm^{-1} .

❖ Iodure de (Z)-(7-*tert*-butoxy-7-oxohept-3-ényl)triphénylphosphonium (**125**)



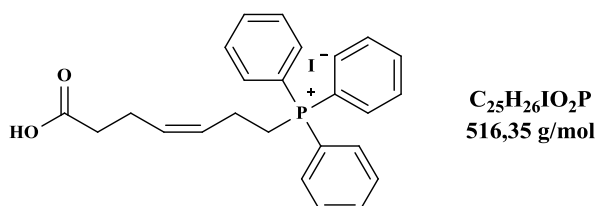
A une solution du (Z)-7-iodohept-4-énoate de *tert*-butyle (1,68 g ; 5,4 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (25 mL) est ajoutée de la triphénylphosphine (1,51 g ; 5,7 mmol). Le mélange est ensuite agité au reflux de CH_3CN pendant 16 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie (DCM/MeOH 95 :5) pour donner le phosphonium **125** (2,27 g ; 73 %) sous forme d'une huile épaisse incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,86-7,59 (m, 15 H, H-ar) ; 5,64-5,52 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 5,36-5,21 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 3,58 (td, J = 12,2 Hz, J = 8,2 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 2,38 (pent, J = 8,0 Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 2,14 (t, J = 6,3 Hz, 2 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,02 (q, J = 6,3 Hz, 2 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 1,31 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ = 172,3 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 135,0 (d, J_{CP} = 2,3 Hz, 3 CH, C-ar) ; 133,4 (d, J_{CP} = 10,6 Hz, 6 CH, C-ar) ; 130,4 (d, J_{CP} = 12,1 Hz, 6 CH, C-ar) ; 130,3 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 126,8 (d, J_{CP} = 15,8 Hz, CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 117,5 (d, J_{CP} = 86,0 Hz, 3 C, C-ar) ; 80,1 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 34,3 (CH_2) ; 27,8 (3 CH_3 , $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 22,8 (d, J_{CP} = 49,1 Hz, CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 22,4 (CH_2) ; 20,1 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 2980 ; 1717 ; 1587 ; 1484 ; 1392 ; 1366 ; 1245 ; 1146 ; 1111 ; 996 ; 918 ; 844 ; 799 ; 722 cm^{-1} .

❖ Iodure de (Z)-(6-carboxyhex-3-ényl)triphénylphosphonium (**127**)

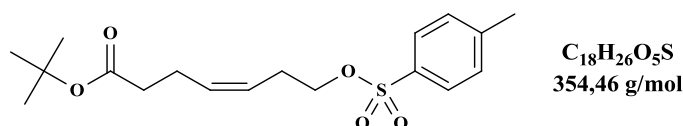


RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,63-7,52 (m, 15 H, H-ar) ; 5,48 (td, J = 14,5 Hz, J = 7,2 Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 5,31-5,16 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 3,49 (td, J = 12,0 Hz, J = 8,2 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 2,34 (m, 2 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 2,19 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$) ; 2,03 (q, J = 6,6 Hz, 2 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ = 176,6 (C, CO_2H) ; 135,0 (3 CH, C-ar) ; 133,4 (d, J_{CP} = 9,8 Hz, 6 CH, C-ar) ; 130,7 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 130,4 (d, J_{CP} = 12,8 Hz, 6 CH, C-ar) ; 126,7 (d, J_{CP} = 15,8 Hz, CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 117,5 (d, J_{CP} = 86,0 Hz, 3 C_q , C-ar) ; 34,2 (CH_2) ; 22,7 (CH_2) ; 22,6 (d, J_{CP} = 48,3 Hz, CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 20,1 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 3012 ; 1719 ; 1587 ; 1485 ; 1438 ; 1112 ; 914 ; 796 ; 720 cm^{-1} .

❖ (Z)-7-(Tosyloxy)hept-4-énoate de *tert*-butyle (**133**)



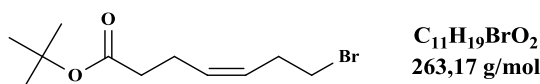
A une solution du (Z)-7-hydroxyhept-4-énoate de *tert*-butyle (200 mg ; 1,0 mmol) dans du DCM (0,5 mL) sont ajoutés à -20°C 145 mg de triéthylamine (1,43 mmol) puis 250 mg de chlorure de tosylate (1,3 mmol) dans 0,5 mL de DCM. Le mélange est agité pendant 36 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 4:1) pour donner le tosylate **133** (290 mg ; 82 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,79 (d, J = 8,5 Hz, 2 H, H-ar) ; 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 2 H, H-ar) ; 5,52-5,40 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 5,35-5,22 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 4,01 (t, J = 6,8 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$) ; 2,45-2,39 (m, 5 H, CH_3Ar , $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$) ; 2,29-2,21 (m, 4 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 1,43 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ = 172,3 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 144,7 (C, C-ar) ; 133,0 (C, C-ar) ; 131,6 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 129,8 (2 CH, C-ar) ; 127,9 (2 CH, C-ar) ; 124,1 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 80,3 (C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 69,6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$) ; 35,1 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$) ; 28,1 (3 CH_3 , $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 27,0 (CH_2) ; 22,9 (CH_2) ; 21,6 (CH_3 , CH_3Ar) ppm.

IR (film) : ν = 2979 ; 1725 ; 1361 ; 1256 ; 1176 ; 1150 ; 1098 ; 964 ; 913 ; 816 ; 774 ; 664 cm^{-1} .

❖ (Z)-7-bromohept-4-énoate de *tert*-butyle (**129**)



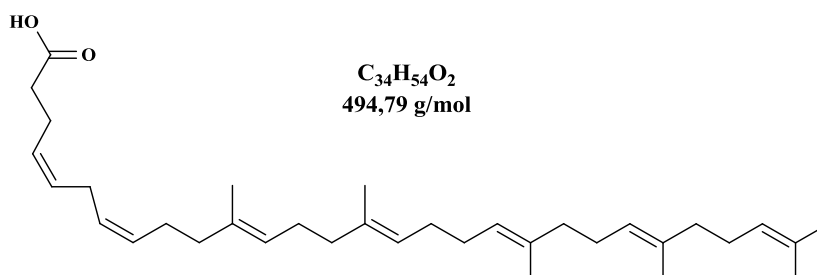
A une solution du mésylate **126** (280 mg ; 1,0 mmol) dans l'acétone (5 mL), on ajoute 300 mg de bromure de lithium (3,5 mmol). Le mélange est ensuite porté au reflux de l'acétone pendant 3 heures puis concentré sous pression réduite et repris dans de l'eau (10 mL). La phase aqueuse est extraite par l'éther diéthylique (3×20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (20 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées sous pression réduite pour donner le composé bromé **129** (220 mg ; 84 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,57-5,35 (m, 2 H, CH₂CH=CHCH₂) ; 3,37 (t, J = 7,1 Hz, 2 H, CH₂CH₂Br) ; 2,64 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH₂Br) ; 2,39-2,22 (m, 4 H, O₂CCH₂CH₂CH=CH) ; 1,44 (s, 9 H, (CH₃)₃CO) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 172,4 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 130,9 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 127,1 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 80,3 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 35,2 (CH₂, CO₂CCH₂CH₂) ; 32,4 (CH₂) ; 30,7 (CH₂) ; 28,1 (3 CH₃, CO₂C(CH₃)₃) ; 23,2 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2976 ; 1727 ; 1455 ; 1392 ; 1366 ; 1258 ; 1209 ; 1151 ; 848 ; 758 ; 727 cm⁻¹.

❖ Acide (4Z,7Z,11E,15E,19E,23E)-11,15,20,24,28-pentaméthylnonacosa-4,7,11,15,19,23,27-heptaénoïque (**107**)



A une solution de l'iodure de phosphonium **125** (505 mg ; 0,95 mmol) dans du THF anhydre (8 mL), est ajouté à -40 °C une solution de NaHMDS (1M dans le THF ; 1,1 mL ; 1,1 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes à -40 °C puis refroidi à -78 °C. L'aldéhyde squalénique (**59**) (560 mg ; 1,46 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est alors ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant 16 heures à température ambiante puis est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther éthylique, filtré sur silice, et rincé avec de l'éther diéthylique puis reconcentré sous pression réduite pour donner l'ester de **107** brut sous forme d'une huile jaune qui est utilisée directement dans l'étape suivante.

A une solution de cet ester dans de l'éthanol (5 mL) est ajouté une solution aqueuse de NaOH 1M (5 mL ; 5 mmol). Le mélange est agité à 80 °C pendant 2 heures puis refroidi à température ambiante et concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'eau (5 mL) puis traité avec une solution aqueuse d'HCl 1N, jusqu'à pH 1. La phase aqueuse est extraite par du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie

flash sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 3:2) pour fournir l'acide **107** (320 mg ; 68 %) sous forme d'une huile incolore.

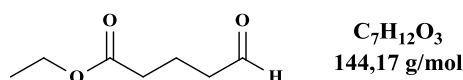
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ = 5,49-5,29 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH); 5,18-5,07 (m, 5 H, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 2,80 (t, J = 6,1 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH); 2,42 (s large, 4 H, HOOCCH₂CH₂CH); 2,20-1,94 (m, 20 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)); 1,68 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂); 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 179,4 (C, COOH); 135,3 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 135,2 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 134,6 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 131,4 (C, (CH₃)₂C=CHCH₂); 130,2 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 130,1 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 127,6 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 127,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 124,8 (CH, (CH₃)C=CHCH₂); 124,6 (CH, (CH₃)C=CHCH₂); 124,5 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂); 124,4 (CH, (CH₃)C=CHCH₂); 39,9 (3 CH₂); 39,6 (CH₂); 34,0 (CH₂, CH₂CO₂H); 28,4 (2 CH₂); 26,9 (CH₂); 26,8 (2 CH₂); 26,0 (CH₂); 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH); 25,7 (CH₂, CH=CHCH₂CH=CH); 22,6 (CH₂, CH₂CH₂CO₂H); 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)); 16,2 (3 CH₃, CH=C(CH₃)); 16,1 (CH₃, CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2959 ; 2926 ; 2859 ; 1711 ; 1441 ; 1384 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 493,0 [M-H]⁻.

❖ 5-Oxopentanoate d'éthyle (**146**)



A de l'acide hex-5-énoïque (**145**) (6,09 g ; 53,4 mmol) on ajoute goutte à goutte à 0 °C du chlorure d'oxalyle (7,47 g ; 58,9 mmol). Le mélange est agité pendant 2 heures à 0 °C puis 1 nuit à 20 °C. Le mélange est ensuite refroidi à 0 °C et 10,0 mL d'éthanol (170 mmol) sont lentement. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est concentré sous vide pour donner l'hex-5-énoate d'éthyle brut qui est utilisé directement dans l'étape suivante.

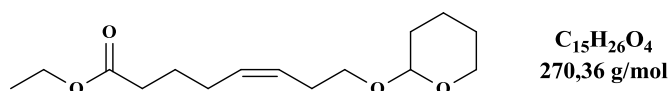
Dans une solution de hex-5-énoate d'éthyle brut dans le DCM anhydre (80 mL), on fait passer un courant d'oxygène à 5% d'ozone à -78 °C jusqu'à obtention d'une solution de couleur bleue. L'ozone est alors purgée avec de l'oxygène pendant quelques minutes puis de la triphénylphosphine (14,5 g ; 55,3 mmol) est ajoutée lentement à -78 °C. Le mélange est ensuite agité 16 heures à 20 °C puis concentré sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie flash (Ether de pétrole/AcOEt 6:1) pour donner le 5-oxopentanoate d'éthyle (**146**) (6,82 g ; 89 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9,77 (t, J = 1,2 Hz, 1 H, CHO) ; 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CO₂CH₂CH₃) ; 2,52 (td, J = 7,2 Hz, J = 1,2 Hz, 2 H, CH₂CHO) ; 2,35 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, CH₂CO₂) ; 1,94 (p, J = 7,2 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂CHO) ; 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, CO₂CH₂CH₃) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 201,6 (CH, CHO) ; 172,9 (C, CO₂CH₂) ; 60,4 (CH₂, CO₂CH₂CH₃) ; 42,9 (CH₂, CH₂CHO) ; 33,2 (CH₂, CH₂CO₂) ; 17,3 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CHO) ; 14,2 (CH₃, CO₂CH₂CH₃) ppm.

IR (film) : ν = 1723 ; 1391 ; 1375 ; 1311 ; 1246 ; 1161 ; 1095 ; 1079 ; 1028 cm⁻¹.

❖ (Z)-8-(Tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)oct-5-énoate d'éthyle (**147**)



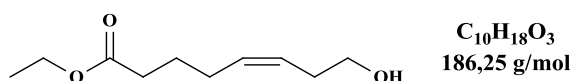
A une solution du phosphonium **110** (7,16 g ; 14,8 mmol) dans du THF anhydre (150 mL), est ajoutée goutte à goutte et à -40 °C, une solution de NaHMDS dans le THF (2M ; 7,3 mL ; 14,6 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes à cette même température puis refroidi à -78 °C. Une solution du 5-oxopentanoate d'éthyle (**146**) (3,15 g ; 21,8 mmol) dans du THF anhydre (60 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est réchauffé jusqu'à température ambiante et agité 16 heures. Le mélange est concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O, 9:1) pour donner l'oléfine **147** (1,83 g ; 46 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,51-5,34 (m, 2 H, CH₂CH=CHCH₂) ; 4,59 (t, J = 3,5 Hz, 1 H, OCH(O)CH₂) ; 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CO₂CH₂CH₃) ; 3,91-3,81 (m, 1 H) ; 3,73 (dt, J = 9,5 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H, CH₂CH₂OCH) ; 3,58-3,45 (m, 1 H, CH₂CH₂OCH) ; 3,39 (dt, J = 9,5 Hz, J_2 = 7,0 Hz, 1 H) ; 2,42-2,24 (m, 4 H, CH₂CO₂, =CHCH₂CH₂OCH) ; 2,10 (q, J = 6,9 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH=CH) ; 1,91-1,45 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂CH=) ; 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, CO₂CH₂CH₃) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,6 (C, CO₂CH₂) ; 130,5 (CH, CH=CH) ; 126,8 (CH, CH=CH) ; 98,7 (CH, OCH(O)CH₂) ; 67,0 (CH₂) ; 62,3 (CH₂) ; 60,2 (CH₂) ; 33,7 (CH₂, CH₂CO₂) ; 30,7 (CH₂) ; 27,9 (CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 25,4 (CH₂) ; 24,8 (CH₂) ; 19,6 (CH₂) ; 14,2 (CH₃, CO₂CH₂CH₃) ppm.

IR (film) : ν = 2943 ; 1734 ; 1372 ; 1352 ; 1242 ; 1200 ; 1181 ; 1157 ; 1133 ; 1120 ; 1075 ; 1029 ; 984 ; 905 ; 870 ; 814 cm⁻¹.

❖ (Z)-8-hydroxyoct-5-énoate d'éthyle



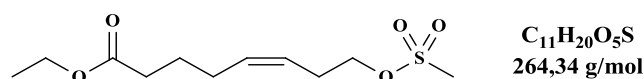
A une solution de l'éther de tétrahydropyrane **147** (1,83 g ; 6,77 mmol) dans du MeOH (130 mL) sont ajoutés 500 mg d'APTS monohydrate (500 mg ; 2,6 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure puis 50 mL de NaHCO_{3aq} sont ajoutés. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et la phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3×50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (50 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 5:1) pour donner le (Z)-8-hydroxyoct-5-énoate d'éthyle (800 mg ; 63 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,61-5,32 (m, 2 H, CH=CH) ; 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CO₂CH₂CH₃) ; 3,63 (t, J = 6,5 Hz, 2 H, CH₂CH₂OH) ; 2,39-2,24 (m, 4 H, CH₂CO₂, CH₂CH₂OH) ; 2,11 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH=) ; 1,87-1,58 (m, 3 H, CH₂CH₂CH₂CH=, OH) ; 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, CO₂CH₂CH₃) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,7 (C, CO₂CH₂CH₃) ; 131,7 (CH, CH=CH) ; 126,5 (CH, CH=CH) ; 62,2 (CH₂, CH₂OH) 60,3 (CH₂, CO₂CH₂CH₃) ; 33,6 (CH₂, CH₂CO₂) ; 30,8 (CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 24,8 (CH₂) ; 14,2 (CH₃, CO₂CH₂CH₃) ppm.

IR (film) : ν = 3407 ; 2951 ; 1732 ; 1373 ; 1312 ; 1243 ; 1220 ; 1179 ; 1155 ; 1046 cm⁻¹.

❖ (Z)-8-(methylsulfonyloxy)oct-5-énoate d'éthyle (**148**)



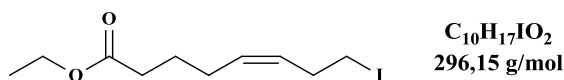
A une solution du (Z)-8-hydroxyoct-5-énoate d'éthyle (800 mg ; 4,3 mmol) dans du DCM anhydre (35 mL), sont ajoutés à -40 °C, 690 mg de triéthylamine (6,8 mmol) puis du chlorure de mésyle (740 mg ; 6,46 mmol). Le mélange est agité à -20 °C pendant 45 minutes. 20 mL d'eau sont ajoutés puis les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite par du DCM (3×20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (20 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées sous pression réduite pour donner le mésylate **148** (1,14 g ; quant.) sous forme d'un liquide jaune pâle.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,62-5,47 (m, 1 H, CH=CH) ; 5,47-5,31 (m, 1 H, CH=CH) ; 4,20 (t, J = 6,8 Hz, 2 H, CH₂OMs) ; 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CO₂CH₂CH₃) ; 3,00 (s, 3 H, OSO₂CH₃) ; 2,49 (q, J = 6,8 Hz, 2 H, CH₂CH₂OMs) ; 2,30 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH₂CO₂) ; 2,10 (q, J = 7,4 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH=) ; 1,71 (p, J = 7,4 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH=) ; 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, CO₂CH₂CH₃) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,4 (C, CO₂CH₂) ; 132,9 (CH, CH=CH) ; 132,7 (CH, CH=CH) ; 69,0 (CH₂, CH₂OMs) 60,3 (CH₂, CO₂CH₂CH₃) ; 37,4 (CH₃, OSO₂CH₃) ; 33,6 (CH₂, CH₂CO₂) ; 27,3 (CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 24,6 (CH₂) ; 14,2 (CH₃, CO₂CH₂CH₃) ppm.

IR (film) : ν = 2953 ; 1727 ; 1351 ; 1244 ; 1198 ; 1171 ; 1102 ; 1043 ; 1027 ; 953 ; 911 ; 854 ; 834 ; 800 ; 737 ; 719 cm⁻¹.

❖ (Z)-8-iodooct-5-énoate d'éthyle (**149**)



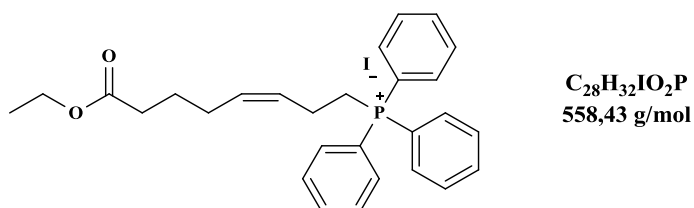
A une solution du mésylate **148** (1,13 g ; 4,3 mmol) dans de l'acétone (15 mL) sont ajoutés 2,1 g d'iodure de sodium (14,0 mmol). Le mélange est porté au reflux de l'acétone pendant 4 heures puis concentré sous pression réduite et repris dans de l'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×30 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium (20 mL), séchées sur $MgSO_4$ anhydre et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 9:1) pour donner le composé iodé **149** (1,18 g ; 93 %) sous forme d'un liquide jaune pâle.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,58-5,44 (m, 1 H, $CH=CH$) ; 5,44-5,29 (m, 1 H, $CH=CH$) ; 4,13 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $CO_2CH_2CH_3$) ; 3,13 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, CH_2I) ; 2,62 (q, J = 7,2 Hz, 2 H, CH_2CH_2I) ; 2,30 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH_2CO_2) ; 2,08 (q, J = 7,4 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH=$) ; 1,70 (p, J = 7,4 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH=$) ; 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, $CO_2CH_2CH_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 173,5 (C, CO_2CH_2) ; 131,2 (CH, $CH=CH$) ; 128,9 (CH, $CH=CH$) ; 60,3 (CH_2 , $CO_2CH_2CH_3$) ; 33,7 (CH_2 , CH_2CO_2) ; 31,4 (CH_2) ; 26,7 (CH_2) ; 24,6 (CH_2) ; 14,3 (CH_3 , $CO_2CH_2CH_3$) ; 5,3 (CH_2 , CH_2I) ppm.

IR (film) : ν = 2963 ; 1731 ; 1373 ; 1242 ; 1210 ; 1169 ; 1128 ; 1031 cm^{-1} .

❖ Iodure de (Z)-(8-éthoxy-8-oxo-oct-3-ényl)triphénylphosphonium (**150**)



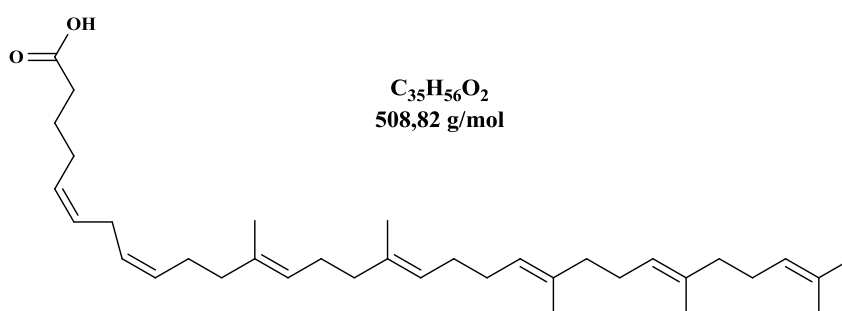
A une solution du composé iodé **149** (1,18 g ; 4,0 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (23 mL), est ajoutée de la triphénylphosphine (1,05 g ; 4,0 mmol). Le mélange est porté au reflux pendant 24 heures puis concentré sous pression réduite. Le mélange brut obtenu est purifié par chromatographie (DCM/MeOH 95:5) pour donner le phosphonium **150** (2,1 g ; 93 %) sous forme d'une huile visqueuse jaune pâle.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,80-7,60 (m, 15 H, H-ar) ; 5,62-5,52 (m, 1 H, $CH=CH$) ; 5,38-5,27 (m, 1 H, $CH=CH$) ; 3,98 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $CO_2CH_2CH_3$) ; 3,61 (m, 2 H, $CH_2P^+Ph_3$) ; 2,37 (m, 2 H, $CH_2CH_2P^+Ph_3$) ; 2,13 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, CH_2CO_2) ; 1,82 (q, J = 7,2 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH=$) ; 1,51 (pent, J = 7,2 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH=$) ; 1,14 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, $CO_2CH_2CH_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 173,2 (C, CO_2CH_2) ; 135,1 (3 CH, CH-ar) ; 133,5 (d, J_{CP} = 10,6 Hz, 6 CH, CH-ar) ; 130,4 (d, J_{CP} = 12,8 Hz, 6 CH, CH-ar) ; 128,3 (d, J_{CP} = 12,8 Hz, CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 126,7 (d, J_{CP} = 14,3 Hz, CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 117,6 (d, J_{CP} = 85,3 Hz, 3 C, C-ar) ; 60,0 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 33,2 (CH_2 , CH_2CO_2) ; 26,3 (CH_2) ; 24,2 (CH_2) ; 23,0 (d, J_{CP} = 49,1 Hz, CH_2 , $\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$) ; 20,0 (CH_2) ; 14,2 (CH_3 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

IR (film): ν = 1724 ; 1437 ; 1244 ; 1184 ; 1164 ; 1141 ; 1112 ; 1028 ; 996 ; 920 ; 742 ; 727 ; 690 cm^{-1} .

❖ Acide (5Z,8Z,12E,16E,20E,24E)-12,16,21,25,29-pentaméthyltriaconta-5,8,12,16,20,24,28-heptaénoïque (**135**)



Voie 1 : L'acide **135** est préparé de la même manière que l'acide **107** (voir page 238), à partir de l'iodure de phosphonium **150**, de NaHMDS et de l'aldéhyde squalénique **59**, suivie d'une saponification dans la soude 1N. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 3:2) pour fournir l'acide **135** (35%) sous forme d'une huile incolore.

Voie 2 : A un mélange biphasique de potasse aqueuse à 50 % (6 mL) et d'éther diéthylique (20 mL) est ajoutée par portion à 0 °C 2,0 g de *N*-nitroso-*N*-méthylurée (2,0 g). Après 10 minutes, La solution étherée est décantée et versée dans un erlenmeyer contenant des pastilles de potasse.

Parallèlement, une solution de l'acide **107** (250 mg ; 0,51 mmol) dans du THF anhydre (1 mL), est traitée à 0 °C par de la triéthylamine (65 mg ; 0,65 mmol) et du chloroformate d'éthyle (63 mg ; 0,58 mmol). Le mélange est agité 20 minutes supplémentaires à 0 °C pour convertir l'acide **107** en l'anhydride mixte correspondant.

La solution obtenue est ajoutée goutte à goutte à 0 °C à la solution étherée de diazométhane. Le mélange est agité 30 minutes à 0 °C puis 2 heures à température ambiante. Le diazométhane en excès est éliminé sous vide sous vide et le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 4:1) pour fournir la diazocétone **143** sous forme d'une huile incolore.

La diazocétone **143** est reprise dans un mélange MeOH/THF 2:1 (30 mL) puis refroidie à 0 °C. 145 mg de triéthylamine (1,4 mmol) et 30 mg de trifluoroacétate d'argent (0,13 mmol) sont alors ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure puis filtré sur celite et concentré sous pression réduite. Le

produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 95:5) pour fournir l'ester méthylique homologué **144** (150 mg ; 59 %) sous forme d'une huile incolore.

L'ester homologué **144** est directement repris dans l'éthanol (7 mL) puis une solution aqueuse de soude 1N (1,5 mL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 17 heures à 20 °C puis l'éthanol est distillé sous pression réduite. La phase aqueuse est traitée avec une solution d'HCl 1N jusqu'à pH 1. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite pour donner l'acide homologué **135** (120 mg ; 82 %) sous forme d'une huile incolore.

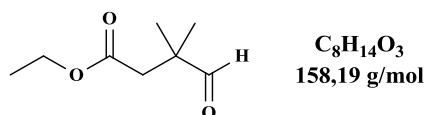
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,44-5,27 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH); 5,20-5,06 (m, 5 H, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 2,77 (t, J = 6,1 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH); 2,37 (t, J = 7,5 Hz, 2 H, CH₂CH₂COOH); 2,21-1,93 (m, 22 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)=, CH=CHCH₂CH₂C(CH₃)=, CHCH₂CH₂CH₂COOH); 1,72 (p, J = 7,5 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂COOH); 1,68 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂); 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 178,9 (C, CO₂H); 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 135,0 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 134,9 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 134,4 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 131,2 (C, (CH₃)₂C=CHCH₂); 129,9 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 129,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 128,5 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 127,6 (CH, CH=CHCH₂CH=CH); 124,7 (CH, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 124,4 (CH, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 124,3 (3 CH, CH₂(CH₃)C=CHCH₂); 39,7 (3 CH₂); 39,5 (CH₂); 33,2 (CH₂, CH₂CH₂CO₂H); 28,3 (2 CH₂); 26,8 (CH₂); 26,7 (2 CH₂); 26,5 (CH₂); 25,8 (CH₂); 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH); 25,6 (CH₂); 24,6 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CO₂H); 17,7 (CH₃, CH=C(CH₃)); 16,0 (3 CH₃, CH=C(CH₃)); 15,9 (CH₃, CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2966 ; 2921 ; 2856 ; 1718 ; 1442 ; 1383 ; 1242 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 507,3 (100%) [M-H]⁻.

❖ 3,3-Diméthyle-4-oxobutanoate d'éthyle (**153**)



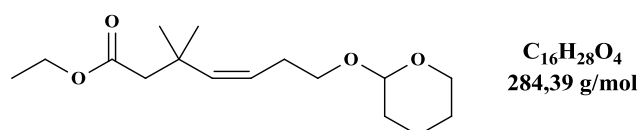
Dans une solution du 3,3-diméthylpent-4-énoate d'éthyle (**152**) (9,0 g ; 57,6 mmol) dans le DCM anhydre (40 mL), on fait passer un courant d'oxygène à 5% d'ozone à -78 °C jusqu'à ce que la solution prenne une couleur bleu. L'excès d'ozone est alors purgé avec de l'oxygène puis de la triphénylphosphine (18,0 g ; 68,6 mmol) est ajoutée lentement à -78 °C. Le mélange réactionnel est réchauffé lentement à température ambiante et agité 16 heures, puis concentré sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 9:1) pour donner l'aldéhyde **153** (2,5 g ; 27 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 9,57 (s, 1 H, CHO) ; 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 2,54 (s, 2 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$) ; 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1,15 (s, 6 H ; $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 204,1 (C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$) ; 171,0 (C, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 60,7 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 44,3 (C, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$) ; 42,2 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 21,8 (2 CH_3 , $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$) ; 14,1 (CH_3 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

IR (film) : ν = 2981 ; 1726 ; 1470 ; 1370 ; 1342 ; 1211 ; 1140 ; 1033 ; 888 ; 747 cm^{-1} .

❖ (Z)-3,3-Diméthyl-7-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hept-4-énoate d'éthyle (**154**)



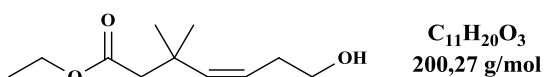
A une solution du phosphonium **110** (4,7 g ; 9,7 mmol) dans du THF anhydre (70 mL) est ajouté lentement à -40°C une solution de NaHMDS (2M dans le THF ; 5,0 mL ; 10,0 mmol). Le mélange réactionnel est agité 10 minutes puis refroidi à -78°C . Une solution de l'aldéhyde **153** (2,0 g ; 12,6 mmol) dans le THF anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est réchauffé à température ambiante et agité 16 heures, puis repris par une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (40 mL). Le mélange est concentré sous pression réduite, et la phase aqueuse obtenue est extraite avec de l'éther diéthylique (3×50 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution de saumure (50 mL), séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O , 9:1) pour fournir l'oléfine **154** (1,83 g ; 66 %) sous forme de liquide incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,46 (d, J = 12,1 Hz, 1 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CHCH}_2$), 5,26 (td, J = 12,1 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CHCH}_2$) ; 4,59 (s large, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{OCH}_2$) ; 4,10 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 3,92-3,80 (m, 1 H) ; 3,75 (q, J = 7,2 Hz, 1 H) ; 3,55-3,43 (m, 1 H) ; 3,41 (q, J = 7,2 Hz, 1 H) ; 2,49 (q, J = 7,2 Hz, 2 H) ; 2,38 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1,86-1,45 (m, 6 H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 1,31-1,17 (m, 9 H, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH}$, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 171,9 (C, CO_2) ; 138,8 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CHCH}_2$) ; 125,7 (CH, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CHCH}_2$) ; 98,8 (CH, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{OCH}_2$) ; 67,2 (CH_2) ; 62,3 (CH_2) ; 59,9 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 47,7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 35,6 (C, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 30,7 (CH_2 , $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$) ; 29,1 (CH_2) ; 28,9 (2 CH_3 , $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{C}$) ; 25,5 (CH_2) ; 19,6 (CH_2) ; 14,3 (CH_3 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

IR (film) : ν = 2956 ; 1732 ; 1201 ; 1121 ; 1034 cm^{-1} .

❖ (Z)-7-Hydroxy-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle



A une solution de l'éther de tétrahydropyrane **154** (410 mg ; 1,44 mmol) dans du méthanol (30 mL) est ajouté de l'APTS monohydraté (150 mg ; 0,79 mmol). Le mélange réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 4 heures puis traité dans une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium (15 mL). Le mélange est concentré sous pression réduite pour éliminer le THF puis la phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3×30 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL), séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 1:1) pour donner le (Z)-7-hydroxy-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle (209 mg ; 72 %) sous forme d'un liquide incolore.

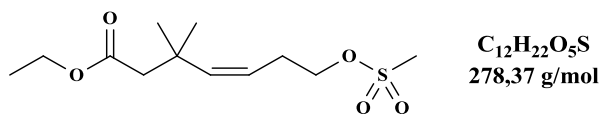
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,50 (d, J = 12,1 Hz, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CH$) ; 5,26 (td, J = 12,1 Hz, J = 7,6 Hz, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CH$) ; 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $CH_3CH_2O_2C$) ; 3,67 (t, J = 6,3 Hz, 2 H, $=CHCH_2CH_2OH$) ; 2,47 (q, J = 6,3 Hz, 2 H, $=CHCH_2CH_2OH$) ; 2,40 (s, 2 H, $CH_2CO_2CH_2CH_3$) ; 1,81 (s large, 1 H, OH) ; 1,33-1,10 (m, 9 H, $CH_2(CH_3)_2CCH$, $CO_2CH_2CH_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 172,1 (C, CO_2) ; 139,9 (CH, $(CH_3)_2CCH=CH$) ; 125,9 (CH, $(CH_3)_2CCH=CH$) ; 62,5 (CH_2 , CH_2CH_2OH) ; 60,1 (CH_2 , $CO_2CH_2CH_3$) ; 47,7 (CH_2 , $CH_2CO_2CH_2CH_3$) ; 35,8 (C, $(CH_3)_2CCH=$) ; 32,0 (CH_2 , $CHCH_2CH_2OH$) ; 29,3 (2 CH_3 , $CH_2(CH_3)_2CCH$) ; 14,2 (CH_3 , $CO_2CH_2CH_3$) ppm.

IR (film) : ν = 3600-3230 ; 2961 ; 1730 ; 1466 ; 1367 ; 1315 ; 1221 ; 1120 ; 1035 ; 723 cm^{-1} .

SM (+ESI) : m/z = 223,1 (100%) $[M+H]^+$.

❖ (Z)-3,3-Diméthyl-7-(méthylsulfonyloxy)hept-4-énoate d'éthyle



A une solution du (Z)-7-hydroxy-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle (1,28 g ; 6,4 mmol) dans du DCM anhydre (40 mL) sont ajoutés à $-40^\circ C$, de la triéthylamine (973 mg ; 9,6 mmol) ainsi que du chlorure de mésyle (1,095 g ; 9,6 mmol). Le mélange réactionnel est agité à $-20^\circ C$ pendant 45 minutes. De l'eau (20 mL) est ajoutée, les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (50 mL), séchées sur $MgSO_4$, puis concentrées sous pression réduite pour fournir le (Z)-3,3-diméthyl-7-(méthylsulfonyloxy)hept-4-énoate d'éthyle (1,77 g ; quant.) sous forme d'un liquide jaune pâle.

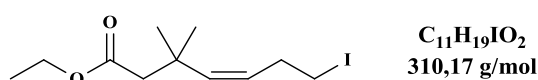
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,54 (d, J = 12,1 Hz, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CH$) ; 5,33-5,07 (m, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CHCH_2$) ; 4,22 (t, J = 6,3 Hz, 2 H, CH_2CH_2OMs) ; 4,10 (q, J = 7,2 Hz, 2 H, $CH_3CH_2O_2C$) ; 3,01

(s, 3 H, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_2$) ; 2,66 (q, $J = 6,3$ Hz, 2 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$) ; 2,36 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1,25-1,10 (m, 9 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=}$, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 172,0$ (C, CO_2) ; 140,7 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 122,7 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 69,2 (CH_2 , $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$) ; 60,1 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 47,7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 37,5 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_2$) ; 35,9 (C, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=}$) ; 29,0 (2 CH_3 , $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 28,4 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$) ; 14,3 (CH_3 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

IR (film) : $\nu = 2971$; 1726 ; 1469 ; 1352 ; 1172 ; 1121 ; 1034 ; 956 ; 919 ; 807 ; 737 cm^{-1} .

❖ (Z)-7-Iodo-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle



A une solution du (Z)-3,3-diméthyl-7-(méthylsulfonyloxy)hept-4-énoate d'éthyle (1,8 g ; 6,5 mmol) dans de l'acétone (30 mL) sont ajoutés 3,3 g d'iodure de sodium (22,0 mmol). Le mélange est agité au reflux de l'acétone pendant 4 heures. Le mélange est concentré sous pression réduite puis repris dans de l'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de thiosulfate de sodium (20 mL) séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 9:1) pour donner le (Z)-7-iodo-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle (1,98 g ; 98 %) sous forme d'un liquide jaune pâle.

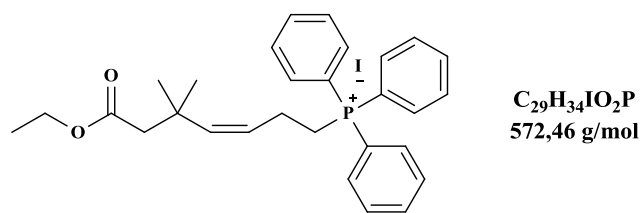
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 5,51$ (d, $J = 12,1$ Hz, 1 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 5,16 (td, $J = 12,1$ Hz, $J = 6,3$ Hz, 1 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 4,11 (q, $J = 7,2$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 3,14 (t, $J = 6,3$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$) ; 2,77 (q, $J = 6,3$ Hz, 2 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{I}$) ; 2,36 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1,25-1,11 (m, 9 H, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH=}$, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 172,1$ (C, CO_2) ; 139,2 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 128,0 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=CH}$) ; 60,0 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 47,7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 35,9 (C, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH=}$) ; 32,4 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{I}$) ; 29,0 (2 CH_3 , $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH=}$) ; 14,3 (CH_3 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 5,2 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$) ppm.

IR (film) : $\nu = 2962$, 1729, 1466, 1366, 1313, 1218, 1169, 1115, 1035, 717 cm^{-1} .

SM (+APCI) : $m/z = 311,1$ (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

❖ Iodure de (Z)-(7-éthoxy-5,5-diméthyl-7-oxohept-3-ényl) triphénylphosphonium (155)



A une solution du (Z)-7-iodo-3,3-diméthylhept-4-énoate d'éthyle (1,98 g ; 6,4 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (32 mL) on ajoute 1,70 g de triphénylphosphine (6,5 mmol). Le mélange est ensuite agité au reflux de l'acétonitrile pendant 24 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 95:5) pour donner l'iodure de phosphonium **155** (3,3 g ; 90 %) sous forme d'une gomme jaune pâle.

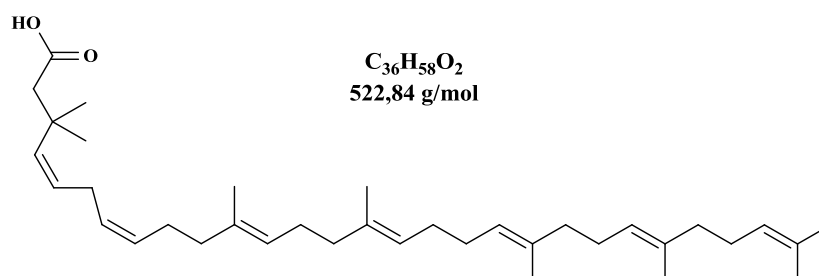
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,89-7,57 (m, 15 H, CH-ar) ; 5,55-5,38 (m, 1 H, (CH₃)₂CCH=CH) ; 5,35-5,20 (m, 1 H, (CH₃)₂CCH=CH) ; 3,96 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, CH₃CH₂OC(=O)CH₂) ; 3,68-3,56 (m, 2 H, =CHCH₂CH₂P⁺Ph₃I) ; 2,47 (m, 2 H, =CHCH₂CH₂P⁺Ph₃I) ; 2,08 (s, 2 H, CH₂CO₂CH₂CH₃) ; 1,13 (t, J = 7,1 Hz, 3 H, CO₂CH₂CH₃) ; 0,95 (s, 6 H, (CH₃)₂CCH=) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 171,3 (C, CO₂) ; 138,7 (CH, (CH₃)₂CCH=CH) ; 135,1 (d, J_{CP} = 2,3 Hz, 3 CH, CH-ar) ; 133,4 (d, J_{CP} = 10,6 Hz, 6 CH, CH-ar) ; 130,4 (d, J_{CP} = 12,8 Hz, 6 CH, CH-ar) ; 125,7 (d, J_{CP} = 14,3 Hz, CH, CH=CHCH₂CH₂P⁺Ph₃I) ; 117,6 (d, J_{CP} = 86,0 Hz, 3 C, C-ar) ; 59,9 (CH₂, CO₂CH₂CH₃) ; 47,1 (CH₂, CH₂CO₂CH₂CH₃) ; 35,5 (C, (CH₃)₂CCH=) ; 28,9 (2 CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 23,1 (d, J_{CP} = 49,1 Hz, CH₂, CH₂CH₂P⁺Ph₃I) ; 21,1 (CH₂, =CHCH₂CH₂P⁺Ph₃I) ; 14,1 (CH₃, CO₂CH₂CH₃) ppm.

IR (film) : ν = 2966 ; 1723 ; 1587 ; 1437 ; 1366 ; 1318 ; 1194 ; 1111 ; 1033 ; 995 ; 920 ; 789 ; 746 ; 721 ; 690 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 445,3 [M-I]⁺.

❖ Acide (4Z,7Z,11E,15E,19E,23E)-3,3,11,15,20,24,28-heptaméthylnonacosa-4,7,11,15,19,23,27-heptaénoïque (**136**)



L'acide **136** est préparé selon le protocole décrit pour la préparation de l'acide **107** (voir page 238) à partir de l'iodure de phosphonium **155** et l'aldéhyde squalénique **59**, suivi d'une saponification avec de la soude 1N.

Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 3:2) pour donner l'acide **136** (57%) sous forme d'une huile incolore.

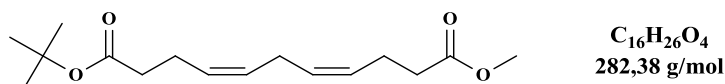
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,46-5,04 (m, 9 H, CH=CHCH₂CH=CHCH₂, CH₂(CH₃)C=CH) ; 2,93 (t, J = 6,7 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,44 (s, 2 H, O(O₂CCH₂C(CH₃)₂)) ; 2,20-1,95 (m, 20 H, 10 CH₂) ; 1,68 (s, 3 H, (CH₃)₂C=CH) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,29 (s, 6 H, CH₂(CH₃)₂CCH=) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 177,8 (C, COOH) ; 136,9 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 135,1 (C, (CH₃)C=CH) ; 135,0 (C, (CH₃)C=CH) ; 134,9 (C, (CH₃)C=CH) ; 134,4 (C, (CH₃)C=CH) ; 131,2 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,0 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CH) ; 128,7 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CH) ; 127,8 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CH) ; 124,7 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,3 (3 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 47,5 (CH₂, CH₂CO₂H) ; 39,7 (3 CH₂) ; 39,5 (CH₂) ; 35,4 (C, (CH₃)₂CCH=) ; 28,9 (2 CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=CH) ; 28,3 (2 CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,7 (2 CH₂) ; 25,9 (CH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 17,7 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,0 (3 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 15,9 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2966 ; 2922 ; 2855 ; 1706 ; 1445 ; 1381 ; 1243 ; 839 ; 723 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 521,6 [M-H]⁻.

❖ (4Z,7Z)-Undéca-4,7-diènedioate de méthyle et de *tert*-butyle (**156**)



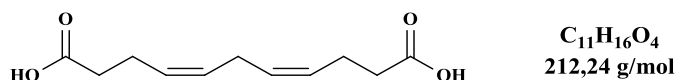
A une solution du bromure de phosphonium **125** (750 mg ; 1,43 mmol) dans du THF anhydre (12 mL), est ajouté goutte à goutte et à -40 °C, une solution de NaHMDS 1M dans le THF (0,80 mL ; 1,6 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes à cette même température puis refroidi à -78 °C. On ajoute alors 200 mg du 4-oxobutanoate de méthyle (**109**) (1,70 mmol) dans du THF anhydre (4 mL). Le mélange est réchauffé jusqu'à température ambiante et agité pendant 17 heures puis concentré sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O, 9:1) pour donner le diester **156** (200 mg ; 50 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,42-5,30 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 3,66 (s, 3 H, CH₂CO₂CH₃) ; 2,81 (s large, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,41-2,21 (m, 8 H, CH₂CH₂CO₂) ; 1,44 (s, 9 H, (CH₃)₃CO₂) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 173,5 (C, CH₂CO₂) ; 172,5 (C, CH₂CO₂) ; 129,3 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 128,8 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 128,3 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,8 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 80,2 (C, CO₂C(CH₃)₃) ; 51,5 (CH₃, CH₂CO₂CH₃) ; 35,4 (CH₂) ; 34,0 (CH₂) ; 28,1 (3 CH₃, CO₂C(CH₃)₃) ; 25,5 (CH₂, CH=CHCH₂CH=CH) ; 22,9 (CH₂) ; 22,8 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2977 ; 1729 ; 1437 ; 1393 ; 1366 ; 1254 ; 1144 ; 849 ; 726 cm⁻¹.

❖ Acide (4Z,7Z)-undéca-4,7-diènedioïque (**158**)



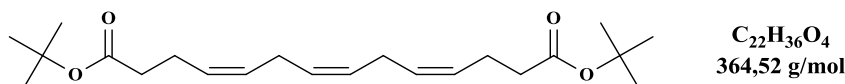
A une solution du diester **156** (200 mg ; 0,71 mmol) dans de l'éthanol (15 mL) est ajoutée une solution aqueuse de soude 1N (5 mL ; 5,0 mmol). Le mélange est agité pendant 6 heures au reflux de l'éthanol puis repris dans une solution aqueuse d'HCl 1N (5 mL). Le mélange est concentré sous pression réduite. La phase aqueuse obtenue est extraite avec du DCM (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ anhydre, puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt) pour donner le diacide **158** (140 mg ; 98 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 11,58 (s large, 2 H, CH_2CO_2H) ; 5,47-5,35 (m, 4 H, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 2,83 (s, 2 H, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 2,41 (m, 8 H, $CH_2CH_2CO_2H$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 179,1 (2 C, CH_2CO_2H) ; 129,4 (2 CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 127,6 (2 CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 34,0 (2 CH_2 , CH_2CO_2H) ; 25,5 (CH_2 , $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 22,5 (2 CH_2 , $CH_2CH_2CO_2H$) ppm.

IR (film) : ν = 3015 ; 1702 ; 1278 ; 1210 ; 913 ; 721 cm^{-1} .

❖ (4Z,7Z,10Z)-Tétradéca-4,7,10-triènedioate de di-*tert*-butyle (**157**)

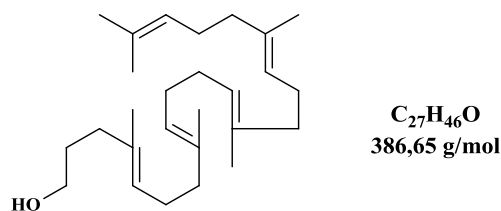


RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,42-5,32 (m, 6 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 2,82 (t, J = 4,9 Hz, 4 H, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 2,37 (m, 8 H, $CHCH_2CH_2COO$) ; 1,44 (s, 18 H, $OC(CH_3)_3$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 172,6 (2 C, CH_2COO) ; 129,1 (2 CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 128,4 (2 CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 128,3 (2 CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; 80,3 (2 C, $OC(CH_3)_3$) ; 35,6 (2 CH_2 , CH_2CO_2) ; 28,3 (6 CH_3 , $OC(CH_3)_3$) ; (2 CH_2 , $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 23,1 (2 CH_2 , $CH_2CH_2CO_2$) ppm.

IR (film) : ν = 2978 ; 1728 ; 1392 ; 1366 ; 1256 ; 1145 ; 847 cm^{-1} .

❖ (4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaène-1-ol (**159**)

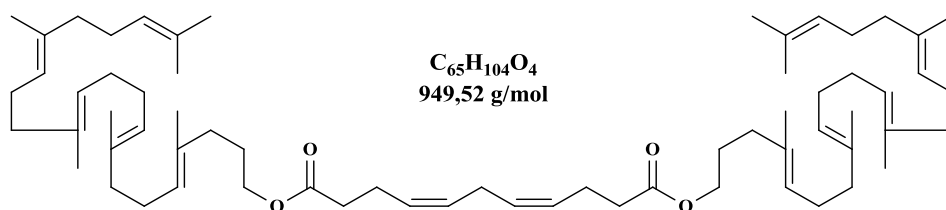


A une solution d'aldéhyde 1,1',2-trisnor-squalénique **59** (1,5 g ; 3,9 mmol) dans de l'éthanol (9 mL), est ajouté par portion du NaBH₄ (145 mg ; 3,8 mmol). Le mélange est agité 30 minutes à température ambiante puis une solution aqueuse de HCl 2N est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH 3. Le mélange est concentré sous pression réduite et est repris dans de l'eau (15 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3×15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 9 :1) pour donner le squalénol **159** (1,32 g ; 88 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,20-5,06 (m, 5 H, C(CH₃)=CHCH₂) ; 3,61 (t, *J* = 7,1 Hz, 2 H, CH₂CH₂OH) ; 2,11-1,95 (m, 20 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 1,68 (s, 3 H, (CH₃)₂C=CH) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 135,3 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 135,1 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 135,0 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 134,7 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 131,4 (C, CH₂CH=C(CH₃)₂) ; 125,0 (CH, CH₂CH=C(CH₃)) ; 124,6 (CH, CH₂CH=C(CH₃)) ; 124,4 (3 CH, CH₂CH=C(CH₃)) ; 63,0 (CH₂, CH₂CH₂OH) ; 39,9 (2 CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 39,8 (CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 36,2 (CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 30,9 (CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 28,4 (2 CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 26,9 (CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 26,8 (CH₂, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; 26,7 (CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 25,8 (CH₃, CH=C(CH₃)₂) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (3 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,0 (CH₃, CH=C(CH₃)) ppm

❖ (4*Z*,7*Z*)-Undéca-4,7-diènedioate de bis((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneyle) (**160**)



A une solution du diacide **158** (140 mg ; 0,66 mmol) dans du DCM anhydre (6 mL) sont ajoutés 140 mg d'EDCI (0,73 mmol), 255 mg de squalénol **159** (0,66 mmol) dans 4 mL de DCM anhydre puis une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange est agité à 20 °C pendant 16 heures, puis concentré sous pression réduite. Le résidu est obtenu par chromatographie (Ether de pétrole/Et₂O 90:10 puis Ether de pétrole/AcOEt 4:1) pour donner le diester **160** (301 mg ; 48 %) sous forme d'une huile incolore.

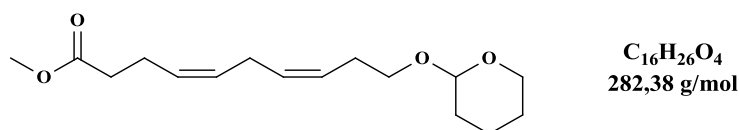
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,37 (s large, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 5,20-5,04 (m, 10 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 4,04 (t, J = 6,6 Hz, 4 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,82 (s large, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,37 (s large, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$) ; 2,18-1,90 (m, 40 H, 20 CH_2) ; 1,68 (s, 6 H, 2 CH_3) ; 1,60 (s, 30 H, 10 CH_3) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ = 173,1 (2 C, CH_2CO_2) ; 135,1 (2 C, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 135,0 (4 C, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 133,7 (2 C, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 131,2 (2 C, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 129,1 (2 CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,0 (2 CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 125,1 (2 CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,4 (4 CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 124,3 (4 CH, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 64,2 (2 CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 39,7 (4 CH_2) ; 35,8 (2 CH_2) ; 34,2 (2 CH_2 , CH_2CO_2) ; 28,3 (4 CH_2) ; 26,9 (2 CH_2) ; 26,8 (2 CH_2) ; 26,7 (6 CH_2) ; 25,7 (2 CH_3) ; 25,5 (CH_2 , $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 22,8 (2 CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$) ; 17,7 (2 CH_3) ; 16,0 (6 CH_3) ; 15,9 (2 CH_3) ppm.

IR (film) : ν = 2922 ; 1737 ; 1446 ; 1382 ; 1161 cm^{-1} .

SM (+ESI) : m/z = 972 (100%) [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

❖ (4Z,7Z)-10-(Tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyle (**163**)



A une solution de l'iodure de phosphonium **108b** (1,0 g ; 1,89 mmol) dans du THF anhydre (12 mL) est ajouté goutte à goutte à -40°C une solution de NaHMDS (2M dans le THF ; 0,95 mL ; 1,9 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes puis refroidi à -78°C . Une solution de l'aldéhyde **165** (360 mg ; 2,3 mmol) dans du THF anhydre (4 mL) est alors ajoutée lentement. Le mélange est réchauffé lentement à température ambiante et agité 16 heures à 20°C , puis traité par une solution aqueuse de NH_4Cl (20 mL). Les solvants sont distillés sous pression réduite, et la phase aqueuse résiduelle est extraite par de l'AcOEt (3×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec l'eau (30 mL) puis une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL), séchées sur MgSO_4 et enfin concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O , 4:1) pour donner l'oléfine **163** (240 mg ; 45 %) sous forme d'un liquide incolore.

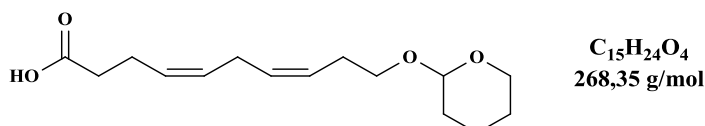
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,52-5,27 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 4,60 (s large, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{OCH}_2$) ; 3,93-3,81 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 3,75 (td, J = 9,4 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,67 (s, 3 H, CO_2CH_3) ; 3,55-3,36 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 2,83 (s large, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,38 (s, 6 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 1,96-1,33 (m, 6 H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 173,4 (C, CO_2) ; 129,5 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 129,3 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 127,7 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 126,2 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 98,7 (CH,

OCHO) ; 66,8 (CH₂, CH₂CH₂OCH) ; 62,2 (CH₂, CH=CH₂CH₂O) ; 51,5 (CH₃, CO₂CH₃) ; 33,9 (CH₂, O₂CCH₂CH₂CH=) ; 30,6 (CH₂) ; 27,9 (CH₂) ; 25,6 (CH₂) ; 25,4 (CH₂) ; 22,7 (CH₂) ; 19,5 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2947, 1738, 1438, 1354, 1159, 1121, 1074, 1031, 985, 907, 731 cm⁻¹.

❖ Acide (4Z,7Z)-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque



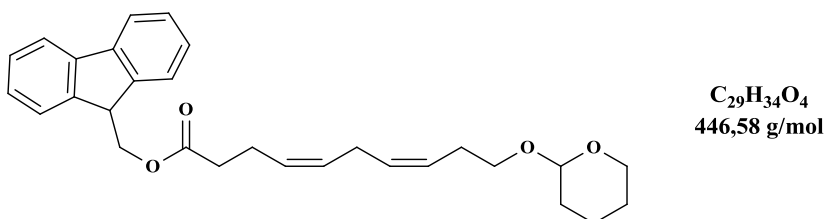
A une solution de l'ester méthylique **163** (120 mg ; 0,43 mmol) dans de l'éthanol (3 mL), on ajoute une solution aqueuse de soude 1N (2 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 heures. Une solution aqueuse de HCl 1N est alors ajoutée lentement à 0 °C jusqu'à pH 1. La phase aqueuse est extraite par de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide pour donner l'acide (4Z,7Z)-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque (100 mg ; 88 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,60-5,30 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 4,63 (s large, CH, OCHOCH₂) ; 3,95-3,83 (m, 1 H, CH₂CH₂OCH) ; 3,74 (td, J = 9,4 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H, =CH₂CH₂OTHP) ; 3,57-3,38 (m, 2 H, CH=CH₂CH₂OTHP, CH₂CH₂OCH) ; 2,85 (s large, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,44-2,28 (m, 6 H, O₂CCH₂CH₂CH=, =CHCH₂CH₂OCH) ; 1,95-1,46 (m, 6 H, OCHCH₂CH₂CH₂CH₂O) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 178,1 (C, CO₂H) ; 129,7 (2 CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 126,2 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 98,8 (CH, OCHOCH₂) ; 67,0 (CH₂, CH₂CH₂CH₂OCH) ; 62,3 (CH₂, CH₂OTHP) ; 33,9 (CH₂, HO₂CCH₂) ; 30,7 (CH₂) ; 27,9 (CH₂) ; 25,7 (CH₂) ; 25,4 (CH₂) ; 22,7 (CH₂) ; 19,6 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2944 ; 1709 ; 1440 ; 1352 ; 1200 ; 1137 ; 1119 ; 1071 ; 1029 ; 982 ; 904 ; 868 ; 812 ; 725 cm⁻¹.

❖ (4Z,7Z)-10-(Tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle)



A une solution de l'acide (4Z,7Z)-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque (60 mg ; 0,22 mmol) dans du DCM anhydre (1,5 mL) sont ajoutés 65 mg de fluorénylméthanol (0,33 mmol), 85 mg d'EDCI (0,44

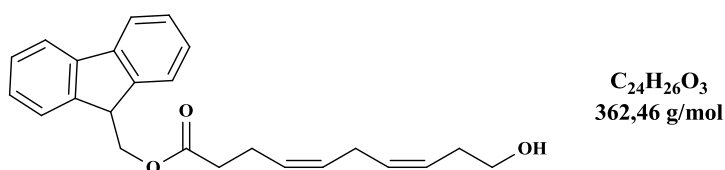
mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 17 heures, puis repris dans une solution aqueuse de NH_4Cl (3 mL). La phase aqueuse est extraite par du DCM (3×5 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 5:1) pour fournir le (4Z,7Z)-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle) (80 mg ; 80 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,75 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,55 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,38 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,29 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 5,53-5,30 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 4,59 (s large, 1 H, OCHOCH_2) ; 4,40 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 4,20 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 3,93-3,82 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 3,74 (td, J = 9,4 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H, CH_2OTHP) ; 3,55-3,38 (m, 2 H, CH_2OTHP , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 2,84 (t, J = 6,1 Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,55-2,30 (m, 6 H, $\text{FmO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 1,92-1,45 (m, 6 H, $\text{O}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 173,0 (C, CO_2) ; 143,8 (2 C, C-ar) ; 141,3 (2 C, C-ar) ; 129,5 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 129,5 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,2 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,2 (2 CH, CH-ar) ; 127,8 (2 CH, CH-ar) ; 127,1 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 125,0 (2 CH, CH-ar) ; 120,0 (2 CH, CH-ar) ; 98,8 (CH, OCHOCH_2) ; 66,9 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}$) ; 63,6 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 62,3 (CH_2 , CH_2OTHP) ; 46,8 (CH, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 34,3 (CH_2) ; 30,7 (CH_2) ; 28,0 (CH_2) ; 25,7 (CH_2) ; 25,5 (CH_2) ; 22,8 (CH_2) ; 19,6 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 3013 ; 2939 ; 1736 ; 1450 ; 1384 ; 1351 ; 1199 ; 1153 ; 1120 ; 1075 ; 1031 ; 983 ; 905 ; 869 ; 814 ; 758 ; 739 cm^{-1} .

❖ (4Z,7Z)-10-Hydroxydéca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle) (**165**)



A une solution du (4Z,7Z)-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle) (75 mg ; 0,17 mmol) dans du méthanol (4 mL) on ajoute 15 mg d'APTS monohydraté (0,079 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 0 °C pendant 4 heures, puis repris dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (2 mL). Le mélange est alors concentré et la phase aqueuse obtenue est extraite par du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous vide pour donner l'alcool brut **165** (57 mg ; 94 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,78 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,41 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,33 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 5,60-5,28 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 4,41

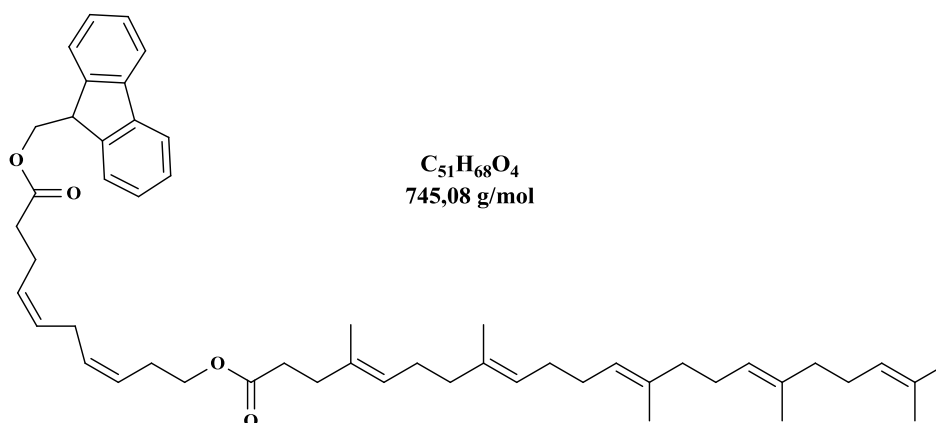
(d, $J = 7,1$ Hz, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 4,22 (t, $J = 7,1$ Hz, CH, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 3,66 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ; 2,85 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,52-2,21 (m, 6 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 173,1$ (C, CO_2) ; 143,8 (2 C, C-ar) ; 141,3 (2 C, C-ar) ; 130,9 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 129,3 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 127,9 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 127,8 (2 CH, CH-ar) ; 127,1 (2 CH, CH-ar) ; 125,8 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 125,0 (2 CH, CH-ar) ; 120,0 (2 CH, CH-ar) ; 66,3 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 62,2 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ; 46,8 (CH, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 34,2 (CH_2) ; 30,85 (CH_2) ; 25,7 (CH_2) ; 22,8 (CH_2) ppm.

IR (film) : $\nu = 3015$; 2944 ; 1734 ; 1477 ; 1449 ; 1383 ; 1351 ; 1152 ; 1103 ; 1049 ; 845 ; 758 ; 739 cm^{-1} .

SM (+ESI) : $m/z = 385,2$ (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneoate de ((3*Z*,6*Z*)-10-((9*H*-fluorén-9-yl)méthoxy)-10-oxodéca-3,6-diènyle)



A une solution de l'alcool (57 mg ; 0,16 mmol) dans du DCM anhydre (1 mL), sont ajoutés 90 mg d'acide squalénique **13** (0,225 mmol), 60 mg d'EDCI (0,31 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 17 heures, puis repris dans une solution aqueuse de NH_4Cl (3 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×5 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 9:1) pour fournir le (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneoate de ((3*Z*,6*Z*)-10-((9*H*-fluorén-9-yl)méthoxy)-10-oxodéca-3,6-diènyle) (77 mg ; 66 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

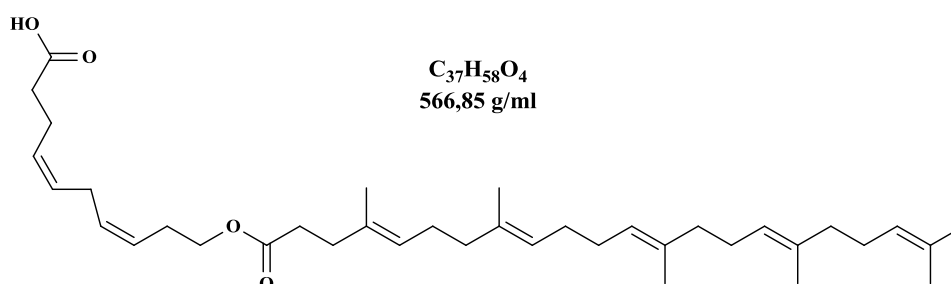
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7,77$ (d, $J = 7,4$ Hz, 2 H, *H*-ar) ; 7,60 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 H, *H*-ar) ; 7,41 (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H, *H*-ar) ; 7,32 (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H, *H*-ar) ; 5,51-5,33 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 5,20-5,05 (m, 5 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 4,41 (d, $J = 7,1$ Hz, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 4,21 (t, $J = 7,1$ Hz, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 4,07 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 2,83 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,59-2,19 (m, 10 H,

$\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$; 2,15-1,93 (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 1,68 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 1,60 (s, 15 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 173,0 (C, CO_2) ; 172,9 (C, CO_2) ; 143,8 (2 C, C-ar) ; 141,3 (2 C, C-ar) ; 135,1 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$) ; 134,9 (3 C, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 133,2 (C, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 129,2 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,0 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 127,8 (2 CH, CH-ar) ; 127,1 (2 CH, CH-ar) ; 125,2 (2 CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 125,0 (3 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$, 2 CH-ar) ; 124,4 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 124,3 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 120,0 (2 CH, CH-ar) ; 66,3 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 63,6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 46,9 (CH, $\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 39,7 (2 CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 39,6 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 34,7 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 34,2 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 33,2 (CH_2 , $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$) ; 28,3 (2 CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 26,9 (2 CH_2) ; 26,8 (2 CH_2) ; 26,7 (2 CH_2) ; 25,6 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 17,7 (CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 16,0 (3 CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 15,9 (CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ppm.

IR (film) : ν = 2927 ; 1738 ; 1450 ; 1157 ; 741 cm^{-1} .

❖ Acide (4Z,7Z)-10-((4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-Pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaénoyloxy)déca-4,7-diénoïque (**138**)



A une solution du (4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentaméthylidocosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de ((3Z,6Z)-10-((9H-fluorén-9-yl)méthoxy)-10-oxodéca-3,6-dienyle) (70 mg ; 0,094 mmol) dans de l'acétonitrile (1 mL) est ajoutée 1,45 g de triéthylamine (14,3 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 heures, puis concentré sous pression réduite. Le résidu est alors repris dans une solution aqueuse de HCl 1N puis extrait avec de l'éther diéthylique (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 1:1 pour donner l'acide **138** (43 mg ; 81 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,53-5,33 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 5,19-5,05 (m, 5 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 4,07 (t, J = 6,9 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ; 2,83 (t, J = 5,9 Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,47-2,37 (m, 8 H, $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 2,28 (m, 2 H,

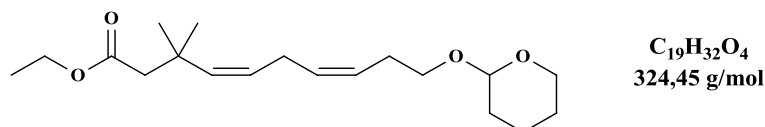
$\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}$) ; 2,14-1,90 (m, 16 H, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 1,68 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 1,60 (s, 15 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 178,1 (C, CO_2H) ; 173,4 (C, CO_2CH_2) ; 135,0 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$) ; 134,8 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$) ; 133,1 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$) ; 131,1 (C, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 130,3 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 129,2 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 127,6 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 125,3 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 124,3 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 124,1 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 63,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 39,6 (2 CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 39,5 (CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 34,5 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$) ; 33,7 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 33,1 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 28,1 (2 CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$) ; 26,8 (CH_2) ; 26,7 (CH_2) ; 26,6 (2 CH_2) ; 25,6 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 25,5 (CH_2 , $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 22,4 (CH_2 , $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 17,5 (CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 15,9 (3 CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 15,8 (CH_3 , $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ppm.

IR (film) : ν = 2910 ; 1737 ; 1712 ; 1441 ; 1382 ; 1156 ; 735 cm^{-1} .

SM (-ESI) : m/z = 565,4 (100%) $[\text{M}-\text{H}]^-$.

❖ (4Z,7Z)-3,3-Diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate d'éthyle (**164**)



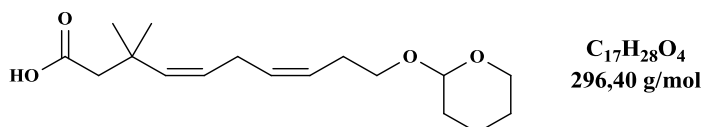
A une solution d'iodure du phosphonium **155** (1,5 g ; 2,62 mmol) dans du THF anhydre (20 mL) est ajouté goutte à goutte et à -40°C une solution de NaHMDS dans le THF (2M ; 1,3 mL ; 2,60 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 10 minutes puis refroidi à -78°C . Une solution de l'aldéhyde **165** (500 mg ; 3,16 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est alors ajoutée goutte à goutte. Le mélange est réchauffé lentement jusqu'à température ambiante et agité 17 heures puis repris dans une solution aqueuse de chlorure d'ammonium (20 mL) puis concentré sous pression réduite. La phase aqueuse résiduelle est extraite avec de l'éther diéthylique (3×30 mL). Les phases organiques sont lavées avec une solution de saumure (30 mL), séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt, 4:1) pour fournir l'oléfine **164** (430 mg ; 51 %) sous forme d'un liquide incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,49-5,31 (m, 3 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 5,21 (td, J = 11,9 Hz, J = 7,5 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 4,59 (m, 1 H, OCHOCH_2) ; 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 3,92-3,82 (m, 1 H) ; 3,74 (td, J = 9,2 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H) ; 3,55-3,44 (m, 1 H) ; 3,41 (td, J = 9,5 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H) ; 2,95 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,45-2,30 (m, 4 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$) ; 1,90-1,40 (m, 6 H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 1,37-1,16 (m, 9 H, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CH}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 171,8 (C, COOCH_2) ; 137,4 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 130,0 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,0 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 126,2 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 98,8 (CH, OCHO) ; 66,9 (CH_2 , $\text{OCHOCH}_2\text{CH}_2$) ; 62,3 (CH_2 , CH_2OTHP) ; 60,0 (CH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}_2$) ; 47,7 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 35,6 (C, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 30,7 (CH_2) ; 29,0 (2 CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CH}$) ; 28,1 (CH_2) ; 26,9 (CH_2) ; 25,5 (CH_2) ; 19,6 (CH_2) ; 14,3 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$) ppm.

IR (film) : ν = 2944 ; 1732 ; 1466 ; 1366 ; 1200 ; 1120 ; 1076 ; 1032 ; 984 ; 905 ; 870 ; 814 ; 729 cm^{-1} .

❖ Acide (4Z,7Z)-3,3-diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque



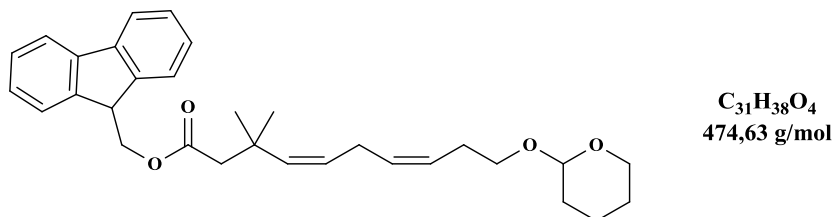
A une solution de l'ester d'éthyle **164** (200 mg ; 0,62 mmol) dans de l'éthanol (4 mL) est ajoutée une solution aqueuse de soude 1N (3 mL). Le mélange est agité pendant 8 heures puis l'éthanol est distillé sous pression réduite. La phase aqueuse est traitée avec une solution d'HCl 1N jusqu'à pH 2. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du DCM (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous pression réduite pour donner l'acide (4Z,7Z)-3,3-diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque (75 mg ; 95 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 5,58-5,32 (m, 3 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 5,23 (td, J = 12,1 Hz, J = 5,5 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 4,63 (s large, CH, OCHO) ; 3,93-3,83 (m, 1 H) ; 3,73 (m, 1 H) ; 3,60-3,35 (m, 2 H) ; 2,96 (s large, 2 H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 2,45-2,23 (m, 4 H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$) ; 1,90-1,42 (m, 6 H, $\text{O}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 1,28 (s, 6 H, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CH}$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 176,1 (C, CO_2CH_2) ; 136,8 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 130,1 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 128,3 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 126,1 (CH, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 98,7 (CH, OCHOCH_2) ; 67,0 (CH_2 , $\text{OCHOCH}_2\text{CH}_2$) ; 62,3 (CH_2 , CH_2OTHP) ; 47,3 (CH_2 , $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 35,7 (C, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}$) ; 30,6 (CH_2) ; 29,1 (2 CH_3 , $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CCH}=\text{CH}$) ; 28,0 (CH_2) ; 26,8 (CH_2) ; 25,4 (CH_2) ; 19,5 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 2943 ; 1706 ; 1365 ; 1201 ; 1119 ; 1073 ; 1030 ; 984 ; 905 ; 726 cm^{-1} .

❖ (4Z,7Z)-3,3-Diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle)



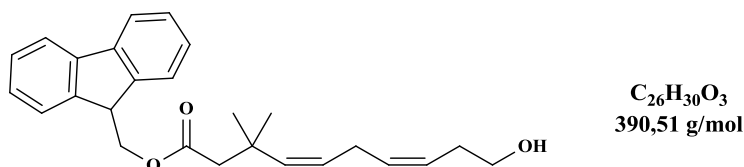
A une solution de l'acide (4Z,7Z)-3,3-diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoïque (110 mg ; 0,37 mmol) dans du DCM anhydre (2 mL) sont ajoutés 102 mg de fluorényléméthanol (0,52 mmol), 145 mg d'EDCI (0,76 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures puis repris dans l'eau (4 mL). La phase aqueuse est extraite par du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 5:1) pour fournir (4Z,7Z)-3,3-diméthyl-10-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle) (126 mg ; 72 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,76 (d, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (d, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,40 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,32 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 5,50-5,40 (m, 2 H, $(CH_3)_2CCH=CHCH_2CH=CH$) ; 5,34 (d, J = 11,9 Hz, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CHCH_2CH=CH$) ; 5,18 (td, J = 11,9 Hz, J = 7,4 Hz, 1 H, $(CH_3)_2CCH=CHCH_2CH=CH$) ; 4,59 (s large, 1 H, $OCH(O)O$) ; 4,44 (d, J = 6,5 Hz, 2 H, $CHCH_2O_2CCH_2$) ; 4,19 (t, J = 6,5 Hz, 1 H, $CHCH_2O_2CCH_2$) ; 3,94-3,82 (m, 1 H) ; 3,75 (td, J = 9,5 Hz, J = 7,1 Hz, 1 H) ; 3,55-3,36 (m, 2 H, CH_2OTHP) ; 2,93 (m, 2 H, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 2,45 (s, 2 H, $O_2CCH_2C(CH_3)_2CH=$) ; 2,42-2,33 (m, 2 H, $CH=CHCH_2CH_2OTHP$) ; 1,90-1,45 (m, 6 H, $O_2CHCH_2CH_2CH_2CH_2O$) ; 1,21 (s, 6 H, $CH_2(CH_3)_2CCH=$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 171,7 (C, CO_2CH_2) ; 143,9 (2 C, C-ar) ; 141,3 (2 C, C-ar) ; 137,2 (CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 129,9 (CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 128,1 (CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 127,7 (2 CH, CH-ar) ; 127,0 (2 CH, CH-ar) ; 126,2 (CH, $CH=CHCH_2CH=CH$) ; 124,9 (2 CH, CH-ar) ; 119,9 (2 CH, CH-ar) ; 98,7 (CH, $OCHO$) ; 66,9 (CH_2 , $OCHOCH_2CH_2$) ; 65,8 (CH_2 , $CHCH_2O_2C$) ; 62,2 (CH_2 , CH_2CH_2OTHP) ; 47,8 (CH_2 , $O_2CCH_2C(CH_3)_2$) ; 46,9 (CH, $CHCH_2O_2CCH_2$) ; 35,5 (C, $O(O=)CCH_2C(CH_3)_2CH=$) ; 30,7 (CH_2) ; 28,9 (2 CH_3 , $CH_2(CH_3)_2C$) ; 28,1 (CH_2) ; 26,9 (CH_2) ; 25,4 (CH_2) ; 19,5 (CH_2) ppm.

IR (film) : ν = 2939 ; 1732 ; 1450 ; 1200 ; 1120 ; 1074 ; 1032 ; 905 ; 870 ; 759 ; 740 cm^{-1} .

❖ (4Z,7Z)-10-Hydroxy-3,3-diméthyl-déca-4,7-diénoate de méthyl(9H-fluorén-9-yle) (166)



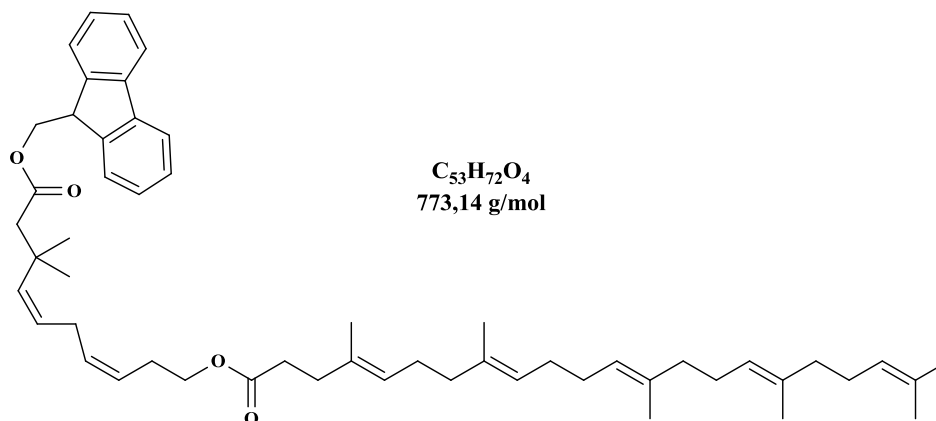
A une solution du (4*Z*,7*Z*)-3,3-diméthyl-10-(tétrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)déca-4,7-diénoate de méthyl(9*H*-fluorén-9-yle) (120 mg ; 0,25 mmol) dans du MeOH (6 mL) on ajoute à 0 °C de 20 mg d'APTS monohydraté (0,10 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures puis traité par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (2 mL). Le mélange est concentré sous pression réduite puis la phase aqueuse résiduelle est extraite avec du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite pour donner l'alcool **166** (93 mg ; 95 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,76 (d, *J* = 7,4 Hz, 2 H, *CH*-ar) ; 7,61 (d, *J* = 7,4 Hz, 2 H, *CH*-ar) ; 7,40 (t, *J* = 7,4 Hz, 2 H, *CH*-ar) ; 7,31 (t, *J* = 7,4 Hz, 2 H, *CH*-ar) ; 5,59-5,24 (m, 3 H, *CH*=*CH*CH₂*CH*=*CH*) ; 5,16 (td, *J* = 11,9 Hz, *J* = 7,4 Hz, 1 H, *CH*=*CH*CH₂*CH*=*CH*) ; 4,43 (d, *J* = 6,6 Hz, 2 H, CHCH₂O₂CCH₂) ; 4,19 (t, *J* = 6,6 Hz, 1 H, CHCH₂O₂CCH₂) ; 3,64 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH₂OH) ; 2,93 (t, *J* = 7,4 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,44 (s, 2 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 2,33 (q, *J* = 6,4 Hz, 2 H, CH₂CH₂OH) ; 1,53 (s large, 1 H, OH) ; 1,20 (s, 6 H, CH₂(CH₃)₂CCH=) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 171,8 (C, CH₂CO₂CH₂) ; 143,9 (2 C, C-ar) ; 141,4 (2 C, C-ar) ; 137,3 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 131,3 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,9 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,7 (2 CH, CH-ar) ; 127,1 (2 CH, CH-ar) ; 125,7 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 124,9 (2 CH, CH-ar) ; 120,0 (2 CH, CH-ar) ; 65,8 (CH₂, CHCH₂O₂CCH₂) ; 62,2 (CH₂, CH₂OTHP) ; 47,7 (CH₂, O₂CCH₂C(CH₃)₂) ; 46,9 (CH, CHCH₂O₂C) ; 35,6 (C, O₂CCH₂C(CH₃)₂) ; 30,9 (CH₂) ; 29,0 (2 CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 26,9 (CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 3427 ; 2957 ; 1731 ; 1450 ; 1212 ; 741 cm⁻¹.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-8,8-Diméthyl-10-oxodéca-3,6-diényl 4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de ((3*Z*,6*Z*)-10-(9*H*-fluorén-9-yl)méthyle



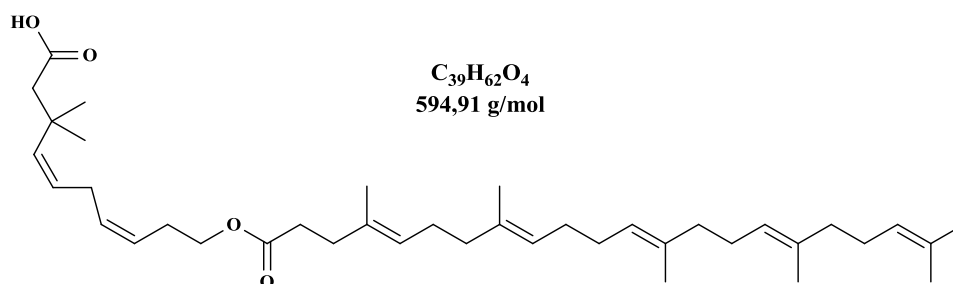
Un mélange de l'alcool **166** (80 mg ; 0,205 mmol) dans le DCM anhydre (1,5 mL) et d'acide squalénique **13** (140 mg, 0,35 mmol), est traité par l'EDCI (90 mg ; 0,47 mmol) et une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 17 heures puis repris dans l'eau (3 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (5 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 9:1 pour fournir le (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-8,8-diméthyl-10-oxodéca-3,6-diényl) 4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de ((3*Z*,6*Z*)-10-(9*H*-fluorén-9-yl)méthyle (125 mg ; 79 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,77 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar), 7,40 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,31 (t, J = 7,4 Hz, 2 H, CH-ar) ; 5,57-5,26 (m, 3 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,25-5,05 (m, 6 H, CH₂(CH₃)C=CHCH₂, CH=CHCH₂CH=CH) ; 4,44 (d, J = 6,6 Hz, 2 H, CHCH₂O₂CCH₂) ; 4,19 (t, J = 6,6 Hz, 1 H, CHCH₂O₂CCH₂) ; 4,07 (t, J = 6,9 Hz, 2 H, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 2,91 (t, J = 6,9 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,49-2,20 (m, 8 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 2,19-1,90 (m, 16 H, CH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 1,69 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂) ; 1,61 (s, 15 H, CH=C(CH₃)) ; 1,21 (s, 6 H, CH₂(CH₃)₂CCH=) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 173,4 (C, CO₂CH₂CH₂CH=) ; 171,6 (C, (CH₃)₂CCH₂CO₂CH₂CH) ; 143,9 (2 C, C-ar) ; 141,3 (2 C, C-ar) ; 137,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 135,1 (C, (CH₃)C=CH) ; 134,9 (2 C, (CH₃)C=CH) ; 133,2 (C, (CH₃)C=CH) ; 131,2 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,8 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,7 (2 CH, CH-ar) ; 127,0 (2 CH, CH-ar) ; 125,1 (2 CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 125,0 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,9 (2 CH, CH-ar) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,2 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 119,9 (2 CH, CH-ar) ; 65,8 (CH₂, CHCH₂O₂CCH₂) ; 63,6 (CH₂, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 47,7 (CH₂, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 46,9 (CH, CHCH₂O₂CCH₂) ; 39,7 (2 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 35,5 (C, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 34,6 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 33,2 (CH₂, CH₂O(O=)CCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 28,9 (2 CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 28,2 (2 CH₂) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,6 (2 CH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 17,7 (CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,0 (3 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 15,9 (CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2916, 1735, 1449, 1382, 1155, 1118, 1008, 758, 739 cm⁻¹.

❖ Acide (4*Z*,7*Z*)-3,3-diméthyl-10-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoyloxy)déca-4,7-diénoïque (**139**)



A une solution du (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-8,8-diméthyl-10-oxodéca-3,6-diényl) 4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de ((3*Z*,6*Z*)-10-(9*H*-fluorén-9-yl)méthyle (80 mg ; 0,10 mmol) dans de l'acétonitrile (2 mL) on ajoute 2,9 g de triéthylamine (28,7 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans une solution d'HCl 1N (5 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec de l'éther diéthylique (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (5 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 1:1) pour donner l'acide **139** (40 mg ; 65 %) sous forme d'une huile incolore.

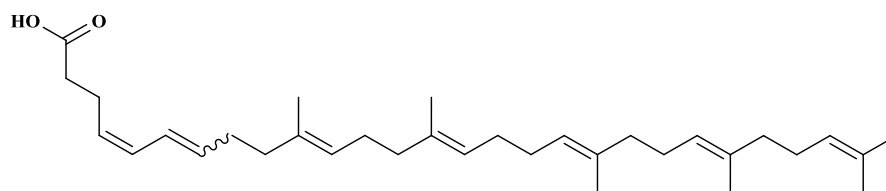
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,55-5,33 (m, 3 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,23 (t, J = 12,0 Hz, J = 9,7 Hz, 1 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,18-5,05 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,07 (t, J = 6,9 Hz, 2 H, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 2,95 (t, J = 7,1 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,43 (s, 2 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 2,46-2,25 (m, 6 H, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 2,13-1,92 (m, 16 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 1,68 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)) ; 1,28 (s, 6 H, CH₂(CH₃)₂CCH=) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 176,3 (C, COOH) ; 173,6 (C, CH₂COOCH₂CH₂CH=) ; 137,2 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 134,9 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 133,2 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 131,2 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,8 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 128,0 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 125,2 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 125,1 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,3 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 63,7 (CH₂, CH=CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 47,2 (CH₂, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 39,7 (2 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 35,5 (C, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 34,7 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 33,3 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 29,0 (2 CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 28,3 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,7 (2 CH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 17,7 (CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,0 (3 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 15,9 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2966 ; 2921 ; 2862 ; 1737 ; 1707 ; 1445 ; 1382 ; 1242 ; 1158 ; 739 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 593,7 (100%) [M-H]⁻.

❖ Acide (4*Z*,10*E*,14*E*,18*E*,22*E*)-10,14,19,23,27-pentaméthyl-octacos-4,6,10,14,18,22,26-heptaénoïque (**140**)



C₃₃H₅₂O₂
480,76 g/mol

Une solution d'iodure de phosphonium **167** (280 mg ; 0,60 mmol) dans du THF anhydre (5 mL), est traitée à -40 °C par une solution de NaHMDS dans le THF (2M ; 0,3 mL ; 0,6 mmol). Le mélange est agité pendant

10 minutes à -40 °C puis refroidi à -78 °C. L'aldéhyde squalénique **59** (250 mg ; 0,65 mmol) dans du THF anhydre (1 mL) est alors ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante puis est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu repris dans l'éther et filtré sur silice. Le solide est rincé avec de l'éther diéthylique puis le filtrat est reconcentré sous pression réduite pour donner l'ester brut **140** sous forme d'une huile jaune.

A une solution de cet ester dans l'éthanol (2 mL) est ajoutée une solution aqueuse de NaOH 1M (1,5 mL ; 1,5 mmol). Le mélange est agité à 80 °C pendant 2 heures puis refroidi à température ambiante et concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'eau (5 mL) puis traité avec une solution aqueuse d'HCl 1N, jusqu'à obtenir un pH de 1. La phase aqueuse est alors extraite avec du DCM (3×5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (5 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 2:1) pour fournir l'acide **140** (133 mg ; 46 %) sous forme d'une huile incolore.

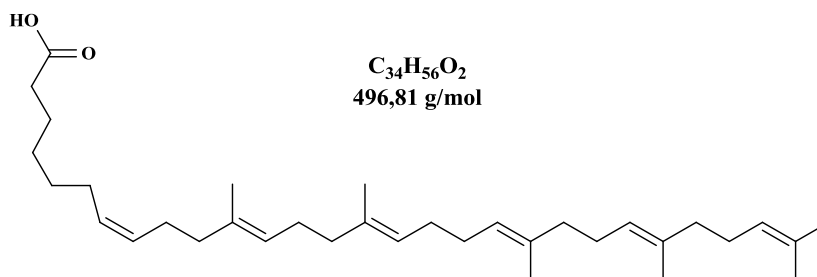
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : la présence de deux isomères induit le dédoublement de certains signaux. δ = 6,35-6,19 (m, 2 H, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH et (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,99 (t, J = 11,0 Hz, 1 H, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,69 (td, J = 15,0 Hz, J = 6,7 Hz, 1 H, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,53-5,38 (m, 2 H, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,32-5,21 (m, 1 H, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,19-5,07 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 2,55-2,40 (m, 4 H, HOOCCH₂CH₂CH) ; 2,31-2,16 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CHCH₂) ; 2,12-1,94 (m, 18 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 1,68 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 178,6 (C, COOH) ; 135,7 (CH, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 135,3 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂) ; 135,2 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 134,4 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 133,0 (CH, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,4 (CH, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 128,8 (CH, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 126,7 (CH, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 124,6 (CH) ; 124,5 (CH) ; 124,4 (2 CH) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,5 (CH₂) ; 34,1 (CH₂, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 34,0 (CH₂, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 31,7 (CH₂, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 28,4 (2 CH₂) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,3 (CH₂, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CHCH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 23,1 (CH₂, (Z,E)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 22,8 (CH₂, (Z,Z)-HOOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2915 ; 1710 ; 1440 ; 1289 ; 944 ; 846 ; 791 ; 719 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 479,4 (100%) [M-H]⁻.

❖ Acide (7Z,11E,15E,19E,23E)-11,15,20,24,28-Pentaméthylnonacos-7,11,15,19,23,27-hexaenoïque
(141)



L'acide **141** est préparé de la même manière que l'acide **107**, à partir du bromure de phosphonium **180**, de NaHMDS et de l'aldéhyde squalénique **59**, suivie d'une saponification dans la soude 1N. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 3:2) pour fournir l'acide **141** (35%) sous forme d'une huile incolore.

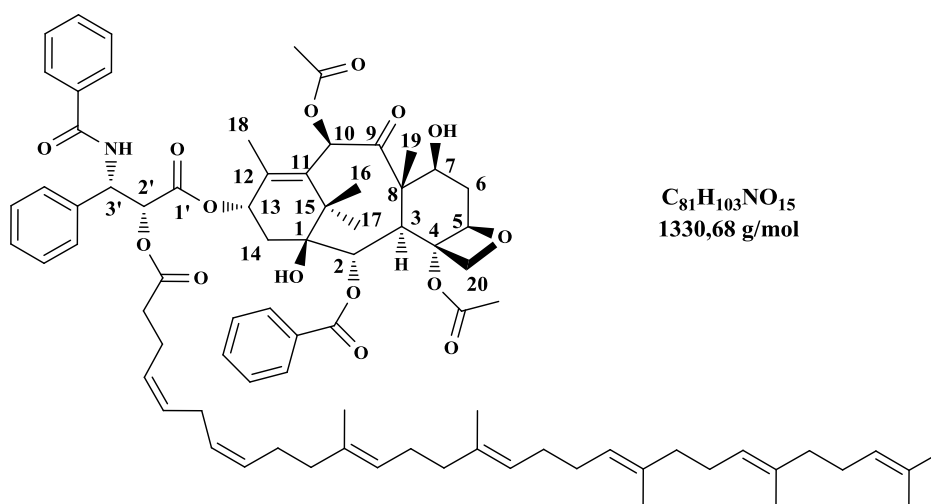
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,40-5,28 (m, 2 H, CH=CHCH₂) ; 5,20-5,05 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 2,35 (t, J = 7,5 Hz, 2 H, CH₂CH₂COOH) ; 2,17-1,92 (m, 24 H, CH₂CH₂CH₂CH=CHCH₂, =CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 1,68 (s, 3 H, CH=C(CH₃)₂) ; 1,65 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂COOH) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)) ; 1,29 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH₂COOH) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 179,8 (C, COOH) ; 135,1 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 134,9 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 134,6 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 131,2 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 129,7 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 129,5 (CH, CH₂CH=CHCH₂) ; 124,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,3 (3 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 39,8 (3 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 34,0 (CH₂, CH₂CH₂COOH) ; 29,3 (CH₂) ; 28,7 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂COOH) ; 28,3 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH=CHCH₂) ; 26,8 (CH₂) ; 26,7 (2 CH₂) ; 25,9 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH=CHCH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 24,6 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂COOH) ; 17,7 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,0 (4 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2917, 2853, 1711, 1441, 1379, 729 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 495,3 (100%) [M-H]⁻.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel (**106**)



A une solution de l'acide **107** (12 mg ; 0,024 mmol) dans du DCM anhydre (0,3 mL) sont ajoutés le Paclitaxel (10 mg ; 0,0117 mmol) dans du DCM anhydre (0,3 mL) puis de l'EDCI (6,0 mg ; 0,031 mmol) et une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir le conjugué **106** (11 mg ; 71 %) sous forme d'un solide amorphe blanc.

$[\alpha]_D = -33,5$ (c = 2,75 ; EtOH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,45-7,31 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,87 (d, J = 9,3 Hz, 1 H, NH) ; 6,30 (s, 1 H, H-10) ; 6,27 (t, J = 8,4 Hz, 1 H, H-13) ; 5,96 (dd, J = 9,3 Hz, J = 3,2 Hz, 1 H, H-3') ; 5,69 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2) ; 5,52 (d, J = 3,2 Hz, 1 H, H-2') ; 5,42-5,22 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,20-5,06 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,98 (d, J = 9,9 Hz, 1 H, H-5) ; 4,46 (dd, J = 9,0 Hz, J_2 = 7,9 Hz, 1 H, H-7), 4,32 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20), 4,20 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20), 3,82 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-3) ; 2,75 (t, J = 6,8 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,46 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,60-2,35 (m, 7 H, 1 H-14, 1 H-6, OH, =CHCH₂CH₂COOPcx) ; 2,23 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,19-1,96 (m, 21 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=, 1 H-14) ; 1,95 (s, 3 H, H-18) ; 1,89 (m, 1 H, H-6) ; 1,75 (s large, 1 H, OH) ; 1,68 (s, 6 H, CH=C(CH₃)₂, H-19) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)) ; 1,24 (s, 3 H, H-16) ; 1,14 (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 172,3 (C, PcxO₂CCH₂) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 170,0 (C, CH₃CO₂) ; 168,2 (C, C-1') ; 167,3 (C, C(=O)NH ou PhCO₂) ; 167,2 (C, C(=O)NH or PhCO₂) ; 143,0 (C, C-12) ; 137,2 (C, C-ar) ; 135,3 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂) ; 135,2 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂) ; 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂) ; 134,5 (C, CH₂(CH₃)C=CHCH₂) ; 133,9 (C, C-ar) ; 133,8 (CH, CH-ar) ; 133,0 (C, C-11) ; 132,2 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,4 (2 CH, CH-ar) ; 130,2 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 129,3 (C, C-ar) ; 129,2 (3 CH, 2 CH-ar, CH=CHCH₂CH=CH) ; 128,9 (4 CH, CH-ar) ; 128,6 (CH, CH-ar) ; 127,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 127,1 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 126,6 (2 CH, CH-ar) ; 124,9 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,6 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,4 (C, C-

1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,8 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,1 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,9 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 35,8 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 35,7 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 33,9 (CH₂, CH₂CH₂COOPcx) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 25,9 (CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 25,7 (CH₂) ; 22,8 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,6 (CH₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 20,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (3 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,1 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 15,0 (CH₃, C-18) ; 9,7 (CH₃, C-19) ppm.

IR (film) : ν = 2921, 1737, 1371, 1241, 1069, 708 cm⁻¹.

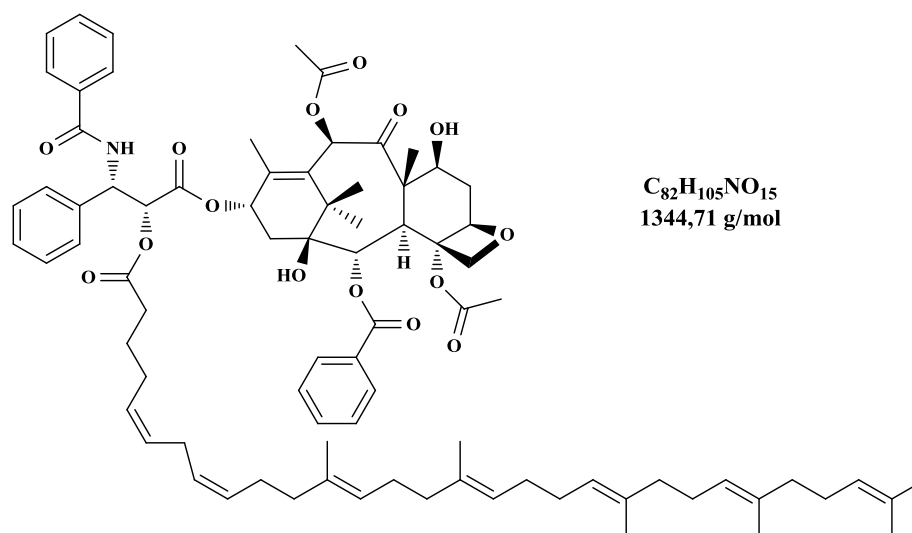
SM (+ESI) : m/z = 1353,0 (100%) [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : Calculée pour C₈₁H₁₀₃NO₁₅ : 1352,7225 [M+Na]⁺ ; mesurée : 1352,7198.

Analyse élémentaire : Calculée pour C₈₁H₁₀₃NO₁₅ : C 73,19 ; H 7,73 ; N 1,03 ; mesurée : C 73,11 ; H 7,80 ; N 1,05.

Profil HPLC : temps de rétention = 18,7 min, pureté = 94 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **181**



La prodrogue **181** est préparée à partir de l'acide **135**, du Paclitaxel, de l'EDCI et de la 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir le conjugué **181** (83%) sous forme d'un solide amorphe blanc.

[α]_D = -35,6 (c = 1,83 ; EtOH).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ = 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,60 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,45-7,31 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,87 (d, J = 9,2 Hz, 1 H, NH) ; 6,30 (s, 1 H, H-10) ; 6,26 (t, J = 8,3 Hz, 1 H, H-13) ; 5,96 (dd, J = 9,2 Hz, J = 3,3 Hz, 1 H, H-3') ; 5,68 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2) ; 5,51 (d, J = 3,3 Hz, 1 H, H-2') ; 5,43-5,23 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,19-5,05 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,98 (d, J = 9,8 Hz, 1 H, H-5) ; 4,45 (m, 1 H, H-7) ; 4,31 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 4,21 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 3,82 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-3) ; 2,73 (t, J = 10,7 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,45 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,63-2,33 (m, 5 H, 1 H-14, 1 H-6, OH, CH₂CH₂COO) ; 2,22 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,21-1,84 (m, 28 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH, CH=CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH, CHCH₂CH₂CH₂COO, 1 H-14, 3 H-18, 1 H-6, OH) ; 1,72-1,64 (m, 8 H, H-19, CHCH₂CH₂CH₂COO, (CH₃)₂C=CH) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)), 1,23 (s, 3 H, H-16) ; 1,13 (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 172,7 (C, PcxO₂CCH₂) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 169,9 (C, CH₃CO₂) ; 168,3 (C, C-1') ; 167,3 (C, C(=O)NH ou PhCO₂) ; 167,2 (C, C(=O)NH ou PhCO₂) ; 143,0 (C, C-12) ; 137,1 (C, C-ar) ; 135,3 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,2 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,0 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 134,5 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 133,8 (C, C-ar) ; 133,7 (CH, CH-ar) ; 132,9 (C, C-11) ; 132,2 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CHCH₂) ; 130,4 (2 CH, CH-ar) ; 130,1 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 129,6 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 129,4 (C, C-ar) ; 129,2 (2 CH, CH-ar) ; 128,9 (4 CH, CH-ar) ; 128,6 (CH, CH-ar) ; 128,4 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,7 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 126,6 (2 CH, CH-ar) ; 124,9 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,6 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,3 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,8 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,0 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,9 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 35,8 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 35,7 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 33,3 (CH₂, CH₂CH₂COO) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,4 (CH₂) ; 25,9 (CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 25,7 (CH₂) ; 24,7 (CH₂, CH₂CH₂CH₂COO) ; 22,8 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 20,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,2 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)₂) ; 14,9 (CH₃, C-18) ; 9,7 (CH₃, C-19) ppm.

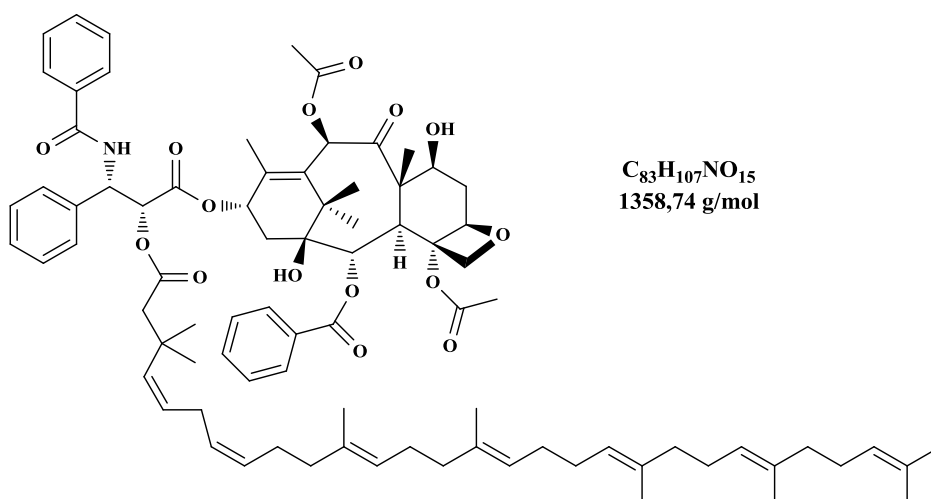
IR (film) : ν = 2925 ; 1738 ; 1640 ; 1450 ; 1371 ; 1238 ; 1178 ; 1143 ; 1069 ; 1025 ; 984 ; 708 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1367,0 [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₂H₁₀₅NO₁₅ : 1366,7382 [M+Na]⁺ ; mesurée : 1366,7440.

Profil HPLC : temps de rétention = 19,2 min, pureté = 95 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **182**



La prodrogue **182** est préparée à partir de l'acide **136**, du Paclitaxel, de l'EDCI et de la 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir la prodrogue **182** (80%) sous forme d'un solide blanc amorphe.

$[\alpha]_D = -35,5$ (c = 0,99 ; EtOH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,45-7,31 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,85 (d, J = 9,2 Hz, 1 H, NH) ; 6,30 (s, 1 H, H-10) ; 6,27 (t, J = 8,3 Hz, 1 H, H-13) ; 5,96 (dd, J = 9,2 Hz, J = 3,3 Hz, 1 H, H-3') ; 5,69 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2) ; 5,49 (d, J = 3,3 Hz, 1 H, H-2') ; 5,40-5,22 (m, 3 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,20-5,07 (m, 6 H, (CH₃)C=CHCH₂, CH=CHCH₂CH=CH) ; 4,98 (d, J = 9,8 Hz, 1 H, H-5) ; 4,46 (dd, J = 9,0 Hz, J = 7,9 Hz, 1 H, H-7) ; 4,31 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 4,20 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 3,82 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-3) ; 2,86 (m, 2 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 2,49 (s, 2 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 2,46 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,60-2,35 (m, 3 H, 1 H-14, 1 H-6, OH) ; 2,23 (s, CH₃, CH₃COO) ; 2,26-1,95 (m, 24 H, 1 H-14, 3 H-18) ; 1,89 (m, 1 H, H-6) ; 1,75 (m, 1 H, OH) ; 1,68 (s, 6 H, (CH₃)₂C=CH, H-19) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,23 (s, 3 H, H-16) ; 1,21 (s, 3 H, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 1,17 (s, 3 H, CH₂(CH₃)₂CCH=CH) ; 1,13 (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 170,8 (C, PcxO₂CCH₂) ; 169,9 (C, CH₃CO₂) ; 168,2 (C, C-1') ; 167,2 (2 C, PhC(=O)NH, PhCO₂) ; 143,1 (C, C-12) ; 137,2 (C, C-ar) ; 137,1 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 135,3 (C, (CH₃)C=CH) ; 135,2 (C, (CH₃)C=CH) ; 135,0 (C, (CH₃)C=CH) ; 134,4 (C, (CH₃)C=CH) ; 133,9 (C, C-ar) ; 133,8 (CH, CH-ar) ; 132,9 (C, C-11) ; 132,1 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CHCH₂) ; 130,4 (2 CH, CH-ar) ; 130,3 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 129,3 (C, C-ar) ; 129,2 (2 CH, CH-ar) ; 128,9 (4 CH, CH-ar) ; 128,8 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 128,6 (CH, CH-ar) ; 127,7 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 126,5 (2 CH, CH-ar) ; 124,9 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,6 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH,

(CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,3 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,8 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,1 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,8 (CH, C-13) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,8 (CH, C-3') ; 47,5 (CH₂, O₂CCH₂C(CH₃)₂CCH=) ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,6 (CH₂) ; 35,7 (CH₂ et C, C-6 ou C-14, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 35,6 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 29,0 (CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 28,8 (CH₃, CH₂(CH₃)₂CCH=) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (2 CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 25,9 (CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 22,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 20,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (2 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,1 (2 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 15,0 (CH₃, C-18) ; 9,7 (CH₃, C-19) ppm.

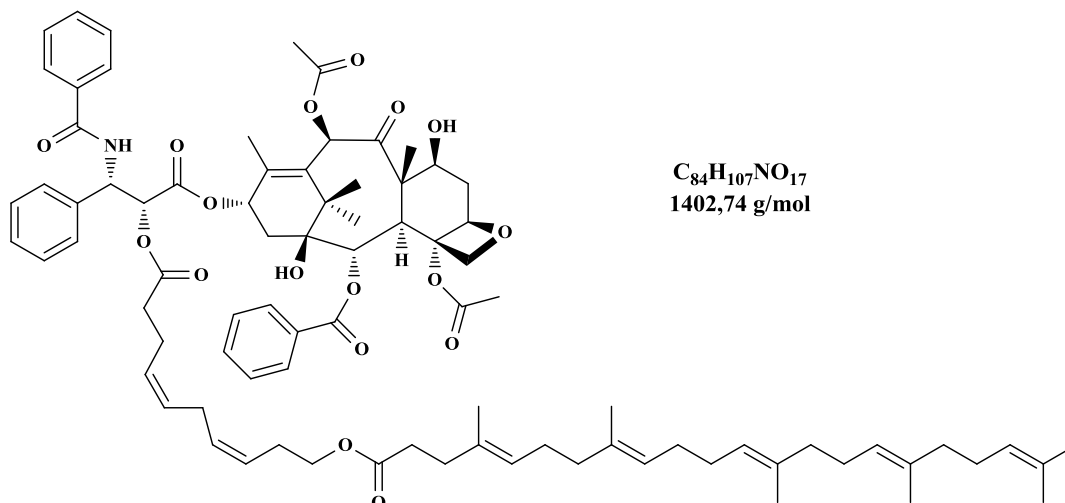
IR (film) : ν = 2930 ; 1734 ; 1645 ; 1451 ; 1371 ; 1238 ; 1177 ; 1108 ; 1068 ; 1025 ; 982 ; 908 ; 732 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1381,0 (100%) [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₃H₁₀₇NO₁₅ : 1380,7538 ; mesurée : 1380,7567.

Profil HPLC : temps de rétention = 19,9 min, pureté = 93 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **183**



La prodrogue **183** est préparée à partir de l'acide **138**, de Paclitaxel, d'EDCI et de 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir la prodrogue **183** (78%) sous forme d'un solide blanc amorphe.

[α]_D = -24,9 (c = 0,85 ; EtOH).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ = 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,42-7,30 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,92 (d, J = 9,0 Hz, 1 H, NH) ; 6,30 (s, 1 H, H-10) ; 6,26 (t, J = 8,3 Hz, 1 H, H-13) ; 5,96 (dd, J = 9,0 Hz, J = 3,2 Hz, 1 H, H-3') ; 5,68 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2) ; 5,51 (d, J = 3,2 Hz, 1 H, H-2') ; 5,48-5,25 (m, 4 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,20-5,05 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,97 (d, J = 9,8 Hz, 1 H, H-5) ; 4,44 (dd, J = 9,0 Hz, J = 7,9 Hz, 1 H, H-7) ; 4,31 (d, J = 8,3 Hz, 1 H, H-20) ; 4,20 (d, J = 8,3 Hz, 1 H, H-20) ; 4,05 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, CH₂CH₂O₂CH₂) ; 3,82 (d, J = 7,0 Hz, 1 H, H-3) ; 2,76 (t, J = 6,2 Hz, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,45 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,63-2,42 (m, 5 H, 1 H-14, 1 H-6, OH, =CHCH₂CH₂COOPcx) ; 2,42-2,32 (m, 6 H, =CHCH₂CH₂CO₂Pcx, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 2,27 (m, 2 H, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 2,22 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,20-1,93 (m, 20 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=, 1 H-14, 3 H-18) ; 1,89 (m, 1 H, H-6) ; 1,75 (m, 1 H, OH) ; 1,68 (s, 6 H, CH=C(CH₃)₂, H-19) ; 1,60 (s, 15 H, CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,23 (s, 3 H, H-16) ; 1,14 (s, 3 H, H-17) ppm,

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 173,5 (C, CH₂CO₂CH₂) ; 172,2 (C, PcxO₂CCH₂) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 169,9 (C, CH₃CO₂) ; 168,2 (C, C-1') ; 167,2 (2 C, PhC(=O)NH, PhCO₂) ; 143,0 (C, C-12) ; 137,2 (C, C-ar) ; 135,3 (C, CH₂C=CH(CH₃)) ; 135,0 (2 C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 133,9 (C, C-ar) ; 133,8 (CH, CH-ar) ; 133,3 (C, CH₂C=CH(CH₃)) ; 132,9 (C, C-11) ; 132,1 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,4 (3 CH, 2 CH-ar, CH=CHCH₂CH=CH) ; 129,6 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 129,3 (C, C-ar) ; 129,2 (3 CH, 2 CH-ar, CH=CHCH₂CH=CH) ; 128,9 (3 CH, CH-ar) ; 128,6 (CH, CH-ar) ; 127,5 (CH, CH=CHCH₂CH=CH) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 126,7 (2 CH, CH-ar) ; 125,3 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,6 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,4 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,7 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,1 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 63,8 (CH₂, CH₂CH₂O₂CCH₂) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,9 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (2 CH₂) ; 39,7 (CH₂) ; 35,7 (2 CH₂, C-6, C-14) ; 34,8 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 33,8 (CH₂, CH₂CH₂COOPcx) ; 33,4 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₂) ; 26,9 (CH₃, C-16) ; 26,8 (3 CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 25,7 (CH₂, CH=CHCH₂CH=CH) ; 22,8 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,6 (CH₂, CHCH₂CH₂CO₂Pcx) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 20,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,2 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,0 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 15,0 (CH₃, C-18) ; 9,7 (CH₃, C-19) ppm.

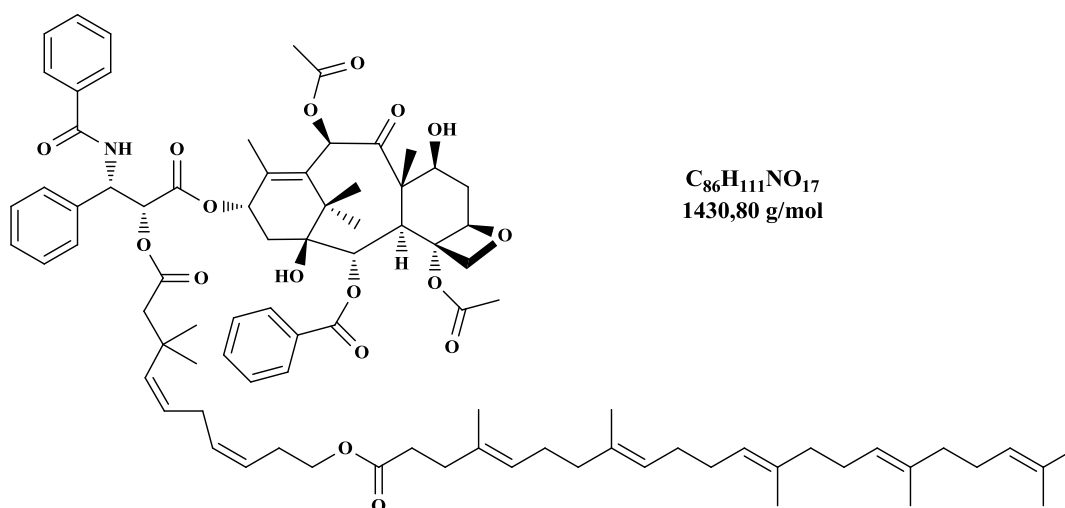
IR (film) : ν = 2911 ; 1726 ; 1639 ; 1533 ; 1451 ; 1371 ; 1239 ; 1178 ; 1147 ; 1070 ; 1025 ; 982 ; 908 ; 799 ; 775 ; 731 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1425,2 (100%) [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₄H₁₀₇NO₁₇ : 1424,7437; mesurée 1424,7472.

Profil HPLC : temps de rétention = 17,3 min, pureté = 96 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **184**



La prodrogue **184** est préparée à partir de l'acide **139**, de Paclitaxel, d'EDCI et de 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir le conjugué **184** (85%) sous forme d'un solide blanc amorphe.

$[\alpha]_D = -25,9$ (c = 1,28 ; EtOH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,1 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (t, J = 7,1 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,43-7,30 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,89 (d, J = 8,9 Hz, 1 H, NH) ; 6,30 (s, 1 H, H-10) ; 6,26 (t, J = 8,3 Hz, 1 H, H-13) ; 5,96 (dd, J = 8,9 Hz, J = 3,2 Hz, 1 H, H-3') ; 5,69 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2) ; 5,49 (d, J = 3,2 Hz, 1 H, H-2') ; 5,45-5,28 (m, 3 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 5,20-5,05 (m, 6 H, (CH₃)C=CHCH₂, CH=CHCH₂CH=CH) ; 4,98 (d, J = 9,8 Hz, 1 H, H-5) ; 4,45 (m, 1 H, H-7) ; 4,32 (d, J = 8,3 Hz, 1 H, H-20) ; 4,21 (d, J = 8,3 Hz, 1 H, H-20) ; 4,04 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 3,82 (d, J = 7,0 Hz, 1 H, H-3) ; 2,87 (m, 2 H, CH=CHCH₂CH=CH) ; 2,49 (s, 2 H, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 2,46 (s, 3 H, CH₃CO₂) ; 2,63-2,31 (m, 6 H, 1 H-14, 1 H-6, =CHCH₂CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃)) ; 2,23 (s, 3 H, CH₃COO) ; 2,20-1,93 (m, 20 H, 1 H-14, 3 H-18, CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 1,89 (m, 1 H, H-6) ; 1,74 (s large, 1 H, OH) ; 1,68 (s, 6 H, (CH₃)₂C=CH, 3 H-19) ; 1,65 (s large, 1H, OH) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; 1,23 (s, 3 H, H-16) ; 1,21 (s, 3 H, CH₂(CH₃)₂CCH=CH) ; 1,17 (s, 3 H, CH₂(CH₃)₂CCH=CH) ; 1,14 (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 173,6 (C, CH₂CO₂CH₂) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 170,8 (C, PcxO₂CCH₂) ; 169,9 (C, CH₃CO₂) ; 168,2 (C, C-1') ; 167,2 (2 C, PhC(=O)NH, PhCO₂) ; 143,1 (C, C-12) ; 137,4 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 137,2 (C, C-ar) ; 135,3 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,1 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 133,9 (C, C-ar) ; 133,8 (CH, CH-ar) ; 133,3 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 132,9 (C, C-11) ; 132,1 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CHCH₂) ; 130,7 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 130,4 (2 CH, CH-ar) ; 129,4 (C, C-ar) ; 129,2 (3 CH, CH-ar) ; 128,9 (3 CH, CH-ar) ; 128,5 (CH, CH-ar) ; 128,2 (CH, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 126,5 (2 CH, CH-ar) ; 125,3 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂, (CH₃)₂CCH=CHCH₂CH=CHCH₂) ; 124,6 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH,

(CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,4 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,8 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,1 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 63,7 (CH₂, CH=CHCH₂CH₂O₂CCH₂) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,8 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 47,4 (CH₂, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 43,3 (C, C-15), 39,9 (2 CH₂) ; 39,8 (CH₂) ; 35,8 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 35,7 (CH₂ et C, C-6 ou C-14, O₂CCH₂C(CH₃)₂CH=) ; 34,8 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃) ; 33,4 (CH₂, CH₂O₂CCH₂CH₂C(CH₃) ; 29,0 (CH₃, (CH₃)₂CCH=CH) ; 28,8 (CH₃, (CH₃)₂CCH=CH) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,1 (CH₂) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (2 CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 22,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 21,0 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,2 (3 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 15,0 (CH₃, C-18) ; 9,8 (CH₃, C-19) ppm.

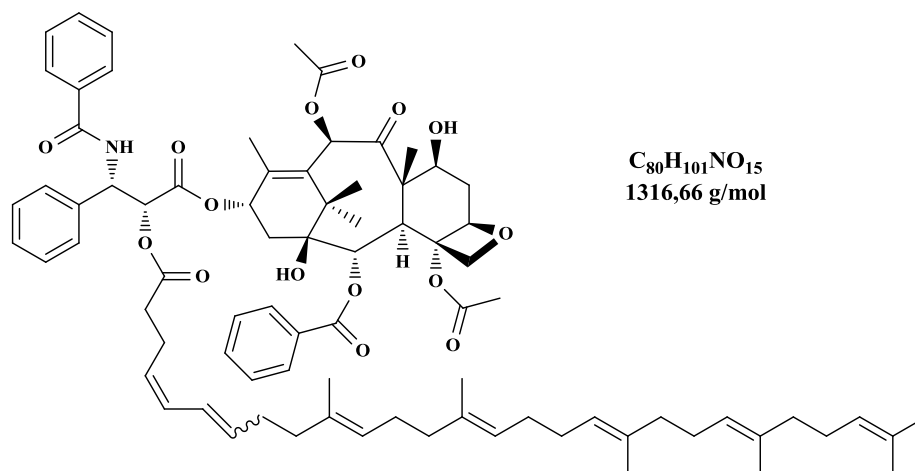
IR (film) : ν = 2926 ; 1728 ; 1662 ; 1582 ; 1525 ; 1487 ; 1450 ; 1371 ; 1239 ; 1177 ; 1108 ; 1069 ; 1025 ; 984 ; 908 ; 855 ; 802 ; 775 ; 731 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1453,1 (100%) [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₆H₁₁₁NO₁₇ : 1452,7750 ; mesurée : 1452,7791.

Profil HPLC : temps de rétention = 18,2 min, pureté = 94 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **185**



La prodrogue **185** est préparée à partir de l'acide **140**, du Paclitaxel, d'EDCI et de 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir la prodrogue **185** (86%) sous forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : la présence de deux isomères provoque le dédoublement de certains signaux.

δ = 8,14 (d, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,61 (t, J = 7,3 Hz, 1 H, CH-ar) ; 7,56-7,47 (m, 3 H, CH-ar) ; 7,46-7,30 (m, 7 H, CH-ar) ; 6,86 (d, J = 9,1 Hz, 1 H, NH) ; 6,36-6,06 (m, 4 H, H-10, H-13, (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH et (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH, (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 6,03-5,86 (m, 2 H, H-3', (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,73-5,60 (m, 2 H, H-2, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,57-5,41 (m, 2 H, H-2', (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,38-5,27 (m, 1 H, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 5,25-5,05 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,98 (d, J = 8,9 Hz, 1 H, H-5) ; 4,45 (dd, J = 10,7 Hz, J = 6,6 Hz, 1 H, H-7) ; 4,32 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 4,20 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H-20) ; 3,82 (d, J = 7,0 Hz, 1 H, H-3) ; 2,62-2,34 (m, 7 H, 1 H-14, 1 H-6, OH, CH₂, CHCH₂CH₂CO₂) ; 2,46 (s, 3 H, CH₃CO₂) ; 2,20 (s, 3 H, CH₃CO₂) ; 2,25-1,79 (m, 23 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃), 1 H-14, 3 H-18, OH, H-6) ; 1,68 (s, 6 H, (CH₃)₂C=CH, H-19) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; 1,24 (s, 3 H, H-16) ; 1,14 (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 204,0 (C, C-9) ; 172,2 (C, CH₂CO₂Pcx) ; 171,4 (C, CH₃CO₂) ; 169,9 (C, CH₃CO₂) ; 168,2 (C, C-1') ; 167,2 (2 C, PhC(=O)NH, PhCO₂) ; 143,0 (C, C-12) ; 137,2 (C, C-ar) ; 136,0 (CH, (Z,E)-OOCCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 135,3 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 135,2 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 135,1 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 134,4 (C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 133,8 (C, C-ar) ; 133,2 (CH, CH-ar) ; 132,9 (C, C-11) ; 132,2 (CH, CH-ar) ; 131,4 (C, (CH₃)₂C=CH) ; 130,4 (3 CH, CH-ar, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 129,3 (C, C-ar) ; 129,2 (2 CH, CH-ar) ; 128,9 (5 CH, CH-ar, (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 128,6 (CH, CH-ar) ; 127,2 (2 CH, CH-ar) ; 126,7 (2 CH, CH-ar) ; 126,4 (CH, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CH) ; 125,4 et 125,1 (CH) ; 125,0 et 124,9 (CH) ; 124,6 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 123,0 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,4 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,8 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 74,1 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,9 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,5 (CH₂) ; 35,8 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 35,7 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 33,9 (CH₂, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CH) ; 33,8 (CH₂, (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CH) ; 31,7 (CH₂, (Z,E)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CHCH₂) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,3 (CH₂, (Z,Z)-O₂CCH₂CH₂CH=CHCH=CHCH₂) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 23,0 (CH₂, O₂CCH₂CH₂CH=CH) ; 22,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 21,0 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (2 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,1 (2 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 15,0 (CH₃, C-18) ; 9,8 (CH₃, C-19) ppm.

IR (film) : ν = 2920 ; 1737 ; 1639 ; 1602 ; 1581 ; 1539 ; 1487 ; 1451 ; 1371 ; 1314 ; 1238 ; 1177 ; 1146 ; 1109 ; 1069 ; 1025 ; 983 ; 947 ; 907 ; 853 ; 800 ; 776 ; 733 ; 709 cm⁻¹.

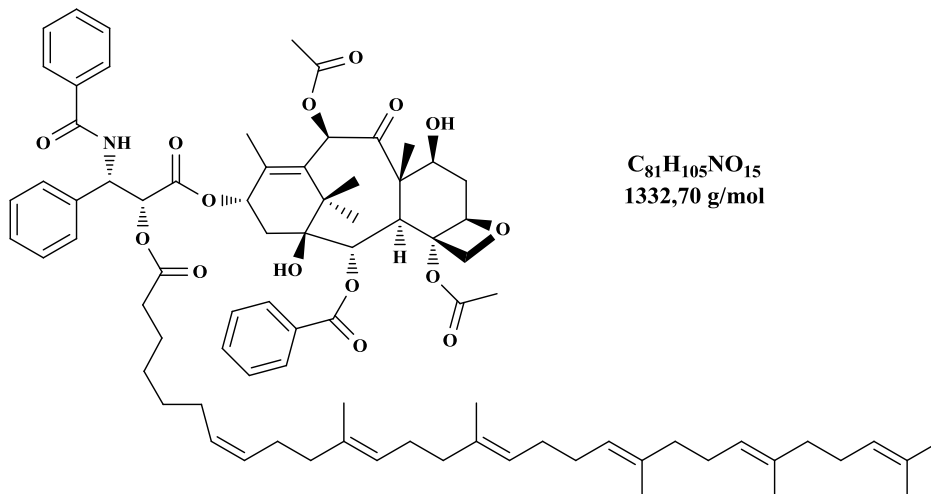
SM (+ESI) : m/z = 1339,0 (100%) [M+Na]⁺, 1354,9 (8%) [M+K]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₀H₁₀₁NO₁₅ : 1338,7069 [M+Na]⁺ ; mesurée : 1338,7061.

Analyse élémentaire : calculée pour C₈₀H₁₀₁NO₁₅.1/2(H₂O) : C 72,48 ; H 7,68 ; N 1,06 ; mesurée : C 72,58 ; H 7,96 ; N 1,11.

Profil HPLC : temps de rétention = 18,21 min, pureté = 91 %.

❖ Conjugué hybride du Paclitaxel **186**



La prodrogue **186** est préparée à partir de l'acide **141**, de Paclitaxel, d'EDCI et de 4-DMAP dans du DCM anhydre de la même manière que la prodrogue **106**. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/EtOAc 3:1) pour fournir la prodrogue **186** (86%) sous forme d'un solide amorphe blanc.

$[\alpha]_D = -35,0$ ($c = 0,80$; EtOH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8,12$ (d, $J = 7,1$ Hz, 2 H, CH-ar) ; $7,73$ (d, $J = 7,1$ Hz, 2 H, CH-ar) ; $7,61$ (t, $J = 7,1$ Hz, 1 H, CH-ar) ; $7,56-7,48$ (m, 3 H, CH-ar) ; $7,45-7,31$ (m, 7 H, CH-ar) ; $6,88$ (d, $J = 9,2$ Hz, 1 H, NH) ; $6,30$ (s, 1 H, H-10) ; $6,27$ (t, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H-13) ; $5,96$ (dd, $J = 9,2$ Hz, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-3') ; $5,68$ (d, $J = 6,9$ Hz, 1 H, H-2) ; $5,51$ (d, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-2') ; $5,40-5,26$ (m, 2 H, $CH_2CH=CHCH_2$) ; $5,20-5,06$ (m, 5 H, $(CH_3)C=CHCH_2$) ; $4,97$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1 H, H-5) ; $4,45$ (m, 1 H, H-7) ; $4,31$ (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H-20) ; $4,20$ (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H-20) ; $3,82$ (d, $J = 6,9$ Hz, 1 H, H-3) ; $2,46$ (s, 3 H, CH_3COO) ; $2,64-2,33$ (m, 5 H, 1 H-14, 1 H-6, OH, CH_2 , $CH_2CH_2CH_2COO$) ; $2,22$ (s, CH_3 , CH_3COO) ; $2,20-1,94$ (m, 28 H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CHCH_2$, $=CHCH_2CH_2C(CH_3)=CH$, 1 H-14, 3 H-18) ; $1,88$ (m, 1 H, H-6) ; $1,81$ (s, 1 H, OH) ; $1,68$ (s, 6 H, $(CH_3)_2C=CH$, H-19) ; $1,60$ (s, 17 H, $CH_2CH=C(CH_3)$, $CH_2CH_2CH_2CH_2COO$) ; $1,29$ (m, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_2COO$) ; $1,23$ (s, 3 H, H-16) ; $1,13$ (s, 3 H, H-17) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 203,9$ (C, C-9) ; $172,8$ (C, $CH_2COOPcx$) ; $171,4$ (C, CH_3CO_2) ; $169,9$ (C, CH_3CO_2) ; $168,2$ (C, C-1') ; $167,2$ (2C, $PhC(=O)NH$, $PhCO_2$) ; $143,0$ (C, C-12) ; $137,2$ (C, C-ar) ; $135,2$ (C, $CH_2(CH_3)C=CH$) ; $135,1$ (C, $CH_2(CH_3)C=CH$) ; $135,0$ (C, $CH_2(CH_3)C=CH$) ; $134,6$ (C, $CH_2(CH_3)C=CH$) ; $133,8$ (C, C-ar) ; $133,7$ (CH, CH-ar) ; $132,9$ (C, C-11) ; $132,1$ (CH, CH-ar) ; $131,4$ (C, $(CH_3)_2C=CHCH_2$) ; $130,4$ (2 CH, CH-ar) ; $129,9$ (CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; $129,5$ (CH, $CH_2CH=CHCH_2$) ; $129,3$ (C, C-ar) ; $129,2$ (2 CH, CH-ar) ; $128,9$ (4 CH, CH-ar) ; $128,6$ (CH, CH-ar) ; $127,2$ (2 CH, CH-ar) ;

126,6 (2 CH, CH-ar) ; 124,7 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (CH, C-5) ; 81,2 (C, C-4) ; 79,3 (C, C-1) ; 76,6 (CH₂, C-20) ; 75,7 (CH, C-10) ; 75,3 (CH, C-2) ; 73,9 (CH, C-2') ; 72,3 (CH, C-7) ; 71,9 (CH, C-13) ; 58,7 (C, C-8) ; 52,9 (CH, C-3') ; 45,7 (CH, C-3) ; 43,3 (C, C-15) ; 39,9 (3 CH₂) ; 39,7 (CH₂) ; 35,7 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 35,6 (CH₂, C-6 ou C-14) ; 33,9 (CH₂, CH₂CH₂CO₂) ; 29,4 (CH₂) ; 28,7 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂) ; 28,4 (2 CH₂) ; 27,1 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH=CH) ; 27,0 (CH₃, C-16) ; 26,9 (CH₂) ; 26,8 (2 CH₂) ; 26,0 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH=CH) ; 25,8 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 24,8 (CH₂, CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOPcx) ; 22,8 (CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (CH₃, C-17) ; 20,9 (CH₃, CH₃CO₂) ; 17,8 (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,2 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 14,9 (CH₃, C-18) ; 9,7 (CH₃, C-19) ppm.

IR (film) : ν = 2930, 1738, 1638, 1529, 1488, 1450, 1371, 1239, 1178, 1069, 1025, 983, 907, 855, 801, 777, 733, 708 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1355,5 [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : calculée pour C₈₁H₁₀₅NO₁₅ : 1354,7382 [M+Na]⁺ ; mesurée : 1354,7419.

Analyse élémentaire : calculée pour C₈₁H₁₀₅NO₁₅.1/2(H₂O) : C 72,33; H 8,10; N 1,05 ; mesurée : C 72,51; H 7,89; N 1,04.

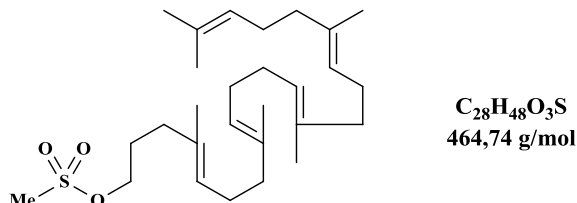
Préparation et caractérisation des nanoparticules des conjugués du Paclitaxel : une solution de chaque bioconjugué (1 mg) dans l'éthanol (100 µL) est ajoutée goutte à goutte, sous agitation (500 t/min) dans une solution aqueuse à 5% de dextrose (1 mL). Les nanoparticules se forment alors spontanément. La solution est agitée pendant 2 minutes supplémentaires. La suspension est alors transférée dans un ballon taré puis l'éthanol est distillé sous pression réduite (30 mm Hg) à température ambiante en utilisant un évaporateur rotatif pendant environ 10 minutes. Le ballon est alors plongé dans un bain d'eau à 37 °C pour environ 5 minutes. L'évaporation continue jusqu'à ce que la masse totale de la suspension atteigne 0,8 – 0,9 g. Le poids de la suspension est alors ajusté jusqu'à 1,0 g en utilisant de l'eau mQ. Le diamètre moyen des nanoparticules est déterminé à 25 °C par diffusion quasi-élastique de la lumière avec un Zetasizer Nano ZS Malvern.

Activité anticancéreuse in vitro : La lignée cellulaire A549 (lignée cellulaire du carcinome du poumon humain) est cultivée dans le milieu F-12K complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Les lignées cellulaires Hep G2 (lignée cellulaire du carcinome du foie humain), HT-29 (lignée cellulaire de l'adénocarcinome colorectal humain), MCF-7 (lignée cellulaire de l'adénocarcinome du sein), MCF-7 MDR (lignée cellulaire de l'adénocarcinome du sein multi-drug resistant) et KB 3.1 (lignée cellulaire du carcinome épithélial humain) sont cultivées dans un mélange DMEM/Ham's F12 (1:1) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de

streptomycine et de la glutamine (2M). La lignée cellulaire Mia Paca-2 (lignée cellulaire du carcinome du pancréas humain) est cultivée dans le milieu DMEM complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. L'activité anticancéreuse du Paclitaxel (**85**), des nanoparticules des conjugués hybrides du Paclitaxel **106**, **181**, **182**, **183**, **184**, **185** et **186** et des nanoparticules du Paclitaxel-squalène **23** sur ces lignées cellulaires ont été déterminées en utilisant le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphényl tétrazolium (MTT) qui mesure l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. Les cellules ont été disséminées dans des plaques 96 puits et pré-incubées 24 heures à 37 °C dans une atmosphère à 5% CO₂ humidifiée. Différentes dilutions de ces composés sont ajoutées au milieu de culture. Après 72 heures d'incubation à 37 °C, chaque puit est décanté puis 100 µL de solution MTT (0,5 mg/mL dans le milieu de culture) sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont incubées pendant 2,5 heures à 37 °C. 100 µL de solution de SDS 10 % dans l'eau (10 mM HCl) sont ajoutés puis les plaques sont de nouveau incubées pendant 1 nuit à 37 °C. L'absorbance de la solution colorée obtenue, qui est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, a été mesurée à 570 nm par un lecteur de Plaque (Metertech Σ 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France) pour déterminer la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) des différents composés. Celles-ci sont une moyenne de 3 différentes expériences effectuées simultanément dans la même journée sur différents puits.

IV.4. Cisplatine monosqualène et Cisplatine bis-squalène

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-pentaméthyl docosa-4,8,12,16,20-pentaèneyl méthanesulfonate (**208**)



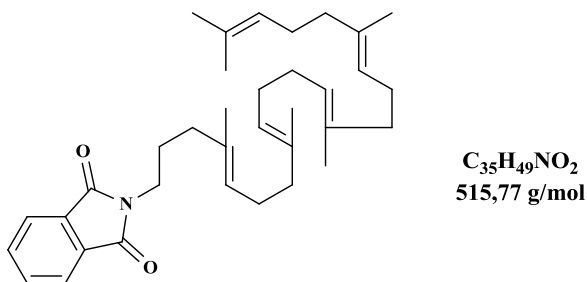
A une solution de squalénol **159** (1,32 g ; 3,4 mmol) dans du DCM anhydre (18 mL) on ajoute de la triéthylamine (581 mg ; 5,7 mmol) ainsi que du chlorure de mésyle (592 mg ; 5,2 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 2 heures puis traité par 10 mL d'eau. La phase organique est séparée puis la phase aqueuse est extraite au DCM (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ anhydre puis concentrées sous pression réduite pour donner le mésylate brut **208** (1,6 g, quant.) sous forme d'une huile jaune.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,20-5,06 (m, 5 H, $CH_2C=CH(CH_3)$) ; 4,20 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2OMs$) ; 2,99 (s, 3 H, $CH_3SO_2CH_2$) ; 2,11-1,95 (m, 18 H, $CH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 1,83 (m, 2 H, $CH_2CH_2C(CH_3)=CH$) ; 1,68 (s, 3 H, $(CH_3)_2C=CH$) ; 1,60 (s, 15 H, $CH=C(CH_3)$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 135,3 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 135,1 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 135,0 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 133,0 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 131,4 (C, $CH=C(CH_3)_2$) ; 126,0 (CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 124,6 (CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 124,5 (CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 124,4 (2 CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 69,8 (CH_2CH_2OMs) ; 39,9 (2 CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 39,7 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 37,5 ($CH_3CH_2SO_2CH_3$) ; 35,3 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 28,4 (2 CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 27,4 ($CH_2CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 26,9 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 26,8 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 26,7 ($CH_2CHCH_2CH_2C(CH_3)=CH$) ; 25,9 ($CH_3CH=C(CH_3)_2$) ; 17,8 ($CH_3CH=C(CH_3)$) ; 16,2 (3 $CH_3CH=C(CH_3)$) ; 16,0 ($CH_3CH=C(CH_3)$) ppm.

IR (film) : ν = 2975 ; 2924 ; 2849 ; 1452 ; 1435 ; 1383 ; 1358 ; 1331 ; 1260 ; 1174 ; 1109 ; 974 ; 955 ; 923 ; 833 ; 809 ; 738 ; 722 cm^{-1} .

❖ 2-((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaène)isoindoline-1,3-dione (209)



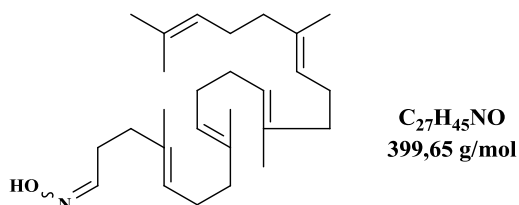
A une solution du mésylate **208** (1,6 g ; 3,44 mmol) dans du DMF anhydre (20 mL) sont ajoutés du phtalimide de potassium (900 mg ; 4,9 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique d'iode de potassium. Le mélange est agité à 80 °C pendant une nuit puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 5:1) pour donner le phtalimide **209** (1,5 g ; 85 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,80 (m, 2 H, H-ar) ; 7,63 (m, 2 H, H-ar) ; 5,20-5,06 (m, 5 H, $CH_2C=CH(CH_3)$) ; 3,60 (t, J = 7,1 Hz, 2 H, CH_2CH_2N) ; 2,11-1,95 (m, 18 H, $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 1,70 (q, J = 7,1 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2N$) ; 1,68 (s, 3 H, $(CH_3)_2C=CH$) ; 1,60 (s, 15 H, $CH_2CH=C(CH_3)$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 168,5 (2 C, $C=O$) ; 135,2 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 135,1 (2 C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 135,0 (C, C-Ar) ; 134,0 (2 CH, CH-Ar) ; 133,7 (C, C-Ar) ; 132,3 (C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 131,4 (C, $CH=C(CH_3)_2$) ; 125,2 (CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 124,5 (2 CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 124,4 (2 CH, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 123,3 (2 CH, CH-Ar) ; 39,9 (2 CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 39,8 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 38,0 (CH_2) ; 37,0 (CH_2) ; 28,4 (2 CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 27,1 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 26,9 (CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 26,8 (2 CH_2 , $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 25,8 (CH_3 , $CH=C(CH_3)_2$) ; 17,8 (CH_3 , $CH=C(CH_3)$) ; 16,2 (3 CH_3 , $CH=C(CH_3)$) ; 16,0 (CH_3 , $CH=C(CH_3)$) ppm.

IR (film) : ν = 2923 ; 1773 ; 1712 ; 1438 ; 1394 ; 1367 ; 1188 ; 1087 ; 1039 ; 834 ; 794 ; 719 cm^{-1} .

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaène oxime **207**



A une solution de l'aldéhyde squalénique **59** (300 mg ; 0,78 mmol) dans un mélange EtOH/eau 1:1 (2,5 mL) sont ajoutés de l'acétate de sodium (100 mg ; 1,2 mmol) et du chlorhydrate d'hydroxylamine (85 mg ; 1,2 mmol). Le mélange est agité pendant 1 nuit puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris

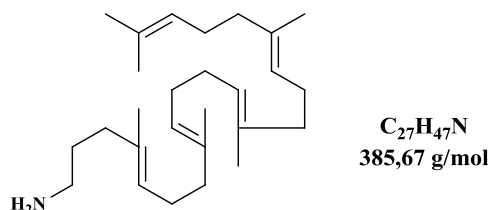
dans de l'eau (10 mL) puis la phase aqueuse est extraite par de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de saumure (10 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées sous pression réduite pour donner un mélange 1/1 des oximes syn/anti **207** (280 mg ; 90 %) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,40 (t, J = 5,8 Hz, 0,5 H, HO-N=CHCH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 6,69 (t, J = 5,3 Hz, 0,5 H, HO-N=CHCH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 5,21-5,06 (m, 5 H, CH₂C=CH(CH₃)) ; 2,52-2,45 (m, 1 H, HO-N=CHCH₂CH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 2,34-2,26 (m, 1 H, HO-N=CHCH₂CH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 2,18-1,98 (m, 18 H) ; 1,68 (s, 3 H, C(CH₃)₂=CH) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 151,6 (0,5 CH, HO-N=CHCH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 151,2 (0,5 CH, HO-N=CHCH₂, isomère *E* ou *Z*) ; 134,7 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 134,5 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 133,1 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 132,9 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 130,7 (C, CH=C(CH₃)₂) ; 125,4 (CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 125,3 (CH, C(CH₃)=CH) ; 124,3 (2 CH, C(CH₃)=CH) ; 124,2 (CH, C(CH₃)=CH) ; 124,1 (CH, C(CH₃)=CH) ; 39,6 (2 CH₂) ; 39,5 (CH₂) ; 36,4 (CH₂) ; 35,5 (CH₂) ; 28,1 (3 CH₂) ; 27,9 (CH₂) ; 26,6 (2 CH₂,) ; 26,5 (CH₂,) ; 26,4 (CH₂,) ; 25,5 (CH₃, CH=C(CH₃)₂) ; 23,1 (CH₂,) ; 17,4 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 15,8 (3 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 15,6 (0,5 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 15,6 (0,5 CH₃, CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2916 ; 1450 ; 1382 ; 1083 ; 915 ; 737 cm⁻¹.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaène-1-amine (**206**)



Voie 1 : A une solution du phthalimide **209** (1,5 g ; 2,9 mmol) dans du MeOH (15 mL), on ajoute 826 mg d'hydrazine monohydratée (16,5 mmol). Le mélange est agité au reflux du méthanol pendant 2 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans une solution aqueuse de NaOH 0,1N (50 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3×50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH/Et₃N 90:10:1) pour donner la squalénamine **206** (960 mg ; 86 %) sous forme d'une huile incolore.

Voie 2 : A une suspension de LiAlH₄ (300 mg ; 7,9 mmol) dans du THF anhydre (7 mL) est ajoutée à 0 °C et goutte à goutte une solution de l'oxime squalénique **207** (1,2 g ; 3,0 mmol) dans du THF anhydre (7 mL). Le mélange est ensuite ramené progressivement à température ambiante puis agité au reflux du THF pendant 4 heures. Le mélange est dilué avec du THF (10 mL) puis quelques gouttes d'AcOEt sont ajoutées. Une solution de NaOH_{aq} 1N est ajoutée lentement à 0 °C jusqu'à formation d'un précipité blanc. Le mélange est

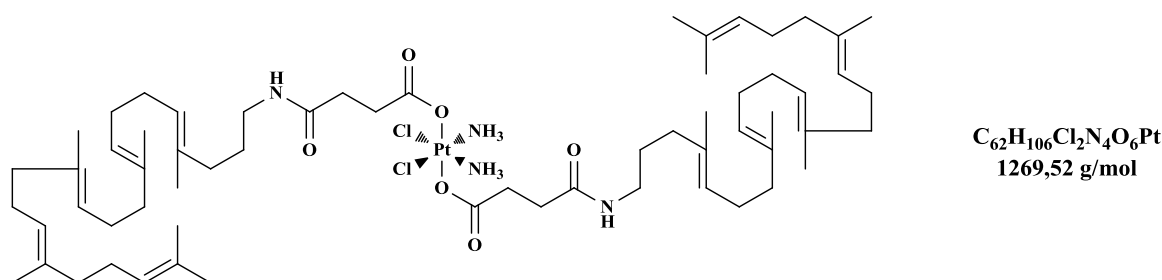
filtré sur celite puis le filtrat est concentré sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH/Et₃N 90:10:1) pour donner la squalénamine **206** (850 mg ; 73 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,20-5,07 (m, 5 H, CH₂C=CH(CH₃)) ; 2,60 (t, J = 6,9 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH₂) ; 2,14-1,85 (m, 20 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=CH) ; 1,68 (s, 3 H, (CH₃)₂C=CH) ; 1,60 (s, 15 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 136,0 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 135,8 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 135,6 (C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 132,0 (C, CH=C(CH₃)₂) ; 125,8 (CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 125,7 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 125,6 (CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 125,5 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 42,3 (CH₂) ; 41,0 (3 CH₂) ; 38,2 (CH₂) ; 32,0 (CH₂) ; 29,4 (2 CH₂) ; 27,9 (CH₂) ; 27,8 (CH₂) ; 27,7 (CH₂) ; 26,1 (CH₃, CH=C(CH₃)₂) ; 18,0 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,4 (3 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,2 (CH₃, CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2925 ; 2855 ; 1448 ; 1381 ; 1239 ; 1130 ; 1105 ; 833 ; 732 cm⁻¹.

❖ Cisplatine bis-squalène **205**



A une solution du disuccinatocisplatine **189** (148 mg ; 0,28 mmol) dans du THF anhydre (4 mL) sont ajoutés à 0 °C 72,6 mg de triéthylamine (0,72 mmol) puis goutte à goutte du chloroformate d'éthyle (66,1 mg ; 0,61 mmol). Le mélange est agité pendant 20 minutes à 0 °C puis une solution de squalénamine **206** (500 mg ; 1,30 mmol) dans du THF anhydre (1 mL) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP sont ajoutées. Le mélange est ensuite agité pendant 4 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière puis est concentré sous pression réduite. Le mélange brut obtenu est purifié directement par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2) pour donner le complexe **205** (124 mg ; 35 %) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, [D₇]DMF) : δ = 7,75 (t, J = 5,6 Hz, 2 H, CH₂NHC=O) ; 7,20-6,50 (m, 6 H, NH₃) ; 5,25-5,00 (m, 10 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 3,15-3,05 (m, 4 H, CH₂CH₂NHC=O) ; 2,47 (t, J = 6,9 Hz, 4 H, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 2,37 (t, J = 6,9 Hz, 4 H, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 2,15-1,90 (m, 40 H, NHCH₂CH₂CH₂C, CHCH₂CH₂(CH₃)C=) ; 1,66 (s, 6 H, (CH₃)₂C=CH) ; 1,61 (s, 18 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; 1,59 (s, 12 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ = 182,4 (2 C, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 173,1 (2 C, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 135,3 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,2 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,0 (2 C,

(CH₃)C=CHCH₂) ; 134,2 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 131,4 (2 C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 125,1 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,4 (6 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 39,9 (6 CH₂) ; 37,2 (2 CH₂) ; 32,5 (2 CH₂, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 32,2 (2 CH₂, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 28,4 (4 CH₂) ; 26,9 (6 CH₂) ; 26,8 (4 CH₂) ; 25,8 (2 CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 17,8 (2 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,2 (4 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; 16,1 (4 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)).

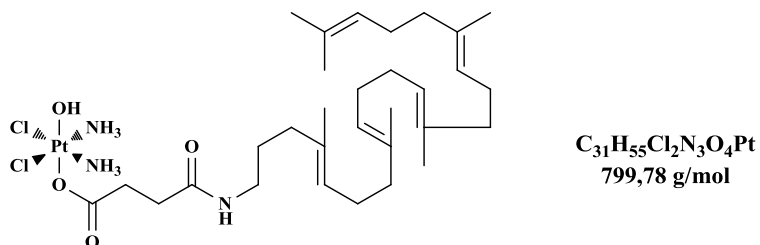
RMN ¹⁹⁵Pt (53,8 MHz, [D₇]DMF) : δ = 1174,4 (710 Hz) ppm.

IR (film) : ν = 2956; 2916; 2856; 1641; 1555; 1445; 1383; 1336; 1308; 1258; 1219; 1110; 856 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1271,1 (100%) [M+H]⁺.

SMHR (-ESI) : Calculée pour C₆₂H₁₀₆Cl₂N₄O₆Pt¹⁹⁵ : 1267,7137 ; mesurée 1267,7046.

❖ Cisplatine mono-squalène **210**



A un mélange de *N*-hydroxysuccinimide (45 mg ; 0,39 mmol) et d'EDCI (70 mg ; 0,37 mmol) dans le DMF anhydre (0,3 mL) sont ajoutés une solution de l'hydroxosuccinatocisplatine **202** (124 mg ; 0,29 mmol) dans du DMF anhydre (0,7 mL). Le mélange est agité pendant 90 minutes puis une solution de squalénamine **206** (300 mg ; 0,78 mmol) dans du DMF anhydre (1,0 mL) est ajoutée. Le mélange est de nouveau agité pendant 48 heures à l'abri de la lumière puis concentré sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 80:20) pour donner le complexe **210** (50 mg ; 22 %) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (400 MHz, [D₇]DMF) : δ = 7.72 (t, *J* = 5,4 Hz, 1 H, CH₂NHC=O) ; 6,70-6,20 (m, 6 H, 2 NH₃) ; 5,20-5,06 (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 3,09 (q, *J* = 6,4 Hz, 2 H, CH₂CH₂NHC=O) ; 2,45-2,39 (m, 2 H, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 2,38-2,32 (m, 2 H, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 2,13-1,93 (m, 20 H, NHCH₂CH₂CH₂C, CHCH₂CH₂(CH₃)C=) ; 1,65 (s, 3 H, (CH₃)₂C=CH) ; 1,60 (s, 9 H, CH=C(CH₃)) ; 1,59 (s, 6 H, CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, [D₇]DMF) : δ 181,7 (C, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 172,6 (C, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 135,6 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,5 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,3 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 135,1 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 131,5 (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; 125,0 (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,9 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,8 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 40,2 (3 CH₂) ; 39,4 (CH₂) ; 37,5 (CH₂) ; 33,4 (CH₂, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 32,9 (CH₂, PtO₂CCH₂CH₂C(=O)NH) ; 28,7 (2 CH₂) ; 28,5 (CH₂) ;

27,2 (2 CH₂) ; 27,0 (CH₂) ; 25,7 (CH₃, (CH₃)₂C=CH) ; 17,7 (CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,1 (3 CH₃, CH=C(CH₃)) ; 16,0 (CH₃, CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : ν = 2923; 1707; 1640; 1558; 1440; 1376; 1219; 1077; 806 cm⁻¹.

SM (-ESI) : m/z = 800,3 (100%) [M-H]⁻.

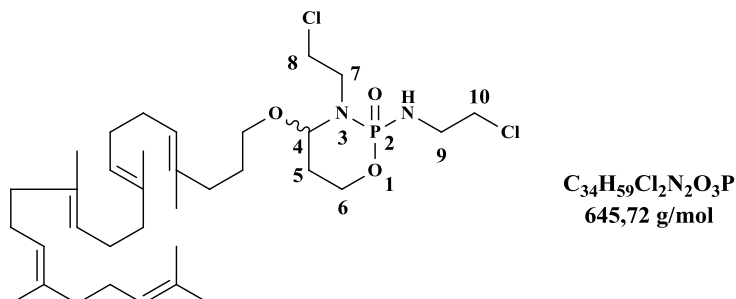
SMHR (-ESI) : Calculée pour C₃₁H₅₇Cl₂N₃O₄Pt¹⁹⁵ : 799,3353; mesurée 799,3353.

Préparation et caractérisation des nanoparticules des complexes squalénisés du Cisplatine : une solution du complexe **210** (1 mg) dans l'éthanol (150 μ L) est ajoutée goutte à goutte, sous agitation (500 rpm) dans une solution aqueuse à 5% de dextrose (1 mL). Pour le complexe **205**, une solution dans l'acétone (1 mg dans 150 μ L) est préparée puis ajoutée goutte à goutte à la solution aqueuse. Les nanoparticules se forment alors spontanément. La solution est agitée pendant 2 minutes supplémentaires. La suspension est alors transférée dans un ballon taré puis l'éthanol est distillé sous pression réduite (30 mm Hg) à température ambiante en utilisant un évaporateur rotatif. Le ballon est alors plongé dans un bain d'eau à 37 °C pour environ 5 minutes, l'évaporation continue jusqu'à ce que la masse totale de la suspension atteigne 0,8 – 0,9 g. Le poids de la suspension est alors ajusté jusqu'à 1,0 g en utilisant de l'eau milliQ.

Activité anticancéreuse in vitro : Les lignées cellulaires L-929 (fibroblastes murins), M109 (carcinome du poumon murin) et Panc-1 (carcinome du pancréas humain) ont été cultivées dans le milieu DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline et 50 μ g/mL de streptomycine. La lignée cellulaire BxPc-3 (adénocarcinome du pancréas humain), a été cultivée dans le milieu RPMI 1640 complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline et 50 μ g/mL de streptomycine. Les autres lignées testées ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. L'activité anticancéreuse du cisplatine, des nanoparticules de Cisplatine mono-squalène **210** et des nanoparticules de Cisplatine bis-squalène **205** ont été déterminées en utilisant le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphényl tétrazolium (MTT), dans les mêmes conditions que précédemment.

IV.5. Ifosfamide-squalène

❖ 4-Squalénoxy-ifosfamide (**229**)



A une solution du 4-méthoxy-ifosfamide **227** (50 mg ; 0,17 mmol) dans du DCM (0,5 mL) est ajouté à -78°C 28 mg de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,19 mmol). Le mélange est agité à -78°C pendant 10 minutes puis une solution du squalénol **159** (200 mg ; 0,52 mmol) dans du DCM (0,8 mL) est ajoutée lentement. Le mélange est ensuite agité pendant 30 minutes supplémentaires. Une solution de NaHCO_3 aq (5 mL) est ajoutée et le mélange est extrait avec du DCM (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM:MeOH:Et₃N 98:2:0,1) pour donner le 4-squalénoxy-ifosfamide **229** (58 mg ; 53 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (400 MHz, [D_6]acetone) : la présence de deux isomères provoque le dédoublement de certains signaux. δ = 5,24-5,09 (m, 5 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 4,75 et 4,70 (2 t, J = 4,2 Hz, 1 H, H-4) ; 4,50-4,38 (m, 1 H, H-6) ; 4,21-4,09 (m, 1 H, H-6) ; 4,00-3,90 (m, 1 H, NH) ; 3,80-3,71 (m, 2 H, H-8) ; 3,66 (t, J = 6,3 Hz, 2 H, H-9) ; 3,58-3,43 (m, 3 H, H-7, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,33-3,16 (m, 3 H, 2 H-10, H-7) ; 2,19-1,97 (m, 20 H, 9 CH_2 , 2 H-5) ; 1,78-1,72 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 1,68 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 1,64 (s, 12 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 1,61 (s, 3 H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ppm.

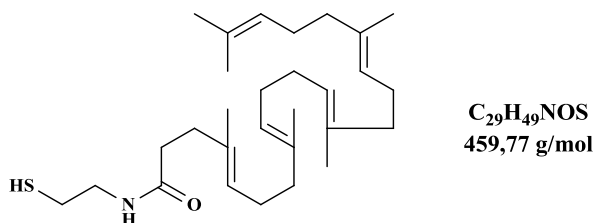
RMN ^{13}C (100 MHz, [D_6]acetone) : la présence de deux isomères provoque le dédoublement de certains signaux. δ = 135,6 (2 C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 135,4 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 135,0 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 131,6 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 125,2 (2 CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 125,1 (CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 125,0 (CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 124,9 (CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 89,7 (CH, C-4) ; 68,1 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 63,2 (d, J_{CP} = 6,0 Hz, CH_2 , C-6) ; 50,2 (d, J_{CP} = 4,0 Hz, CH_2 , C-7) ; 46,6 (d, J_{CP} = 4,0 Hz, CH_2 , C-9) ; 44,0 (CH_2 , C-8) ; 43,5 (CH_2 , C-10) ; 40,5 (3 CH_2) ; 36,7 (CH_2) ; 32,2 (CH_2) ; 28,9 (3 CH_2) ; 27,5 (CH_2) ; 27,4 (CH_2) ; 27,3 (CH_2) ; 25,9 (CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$) ; 17,8 (CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 16,2 (2 CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$) ; 16,1 (2 CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$).

RMN ^{31}P (81 MHz, CDCl_3) : δ = 10,65 (s) ; 10,25 (s) ppm.

SM (+APCI) : $m/z = 647,3$ (72%) $[M+2+H]^+$; $645,3$ (100%) $[M+H]^+$; $387,3$ (24%) $[M-C_7H_{13}Cl_2N_2O_2P+H]^+$; $261,0$ (8%) $[M+2-C_{27}H_{46}O+H]^+$; $259,0$ (14%) $[M-C_{27}H_{46}O+H]^+$.

SMHR (+ESI) : Calculée pour $C_{34}H_{59}Cl_2^{35}N_2O_3P$: 667,3538 ; mesurée : 667,3555.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-(2-Mercaptoéthyl)-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaèneamide (**231**)



A une solution de d'acide squalénique **13** (405 mg ; 1,01 mmol) dans du THF anhydre (16 mL) sont ajoutés 120 mg de NHS (1,04 mmol) et de la DCC (208 mg ; 1,01 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures puis filtré. Le filtrat est concentré sous pression réduite. Le produit brut obtenu est repris dans du DCM (12 mL) puis de la triéthylamine (0,4 mL ; 2,9 mmol) et du chlorhydrate de cystéamine (330 mg ; 2,9 mmol) sont ajoutés. Le mélange est de nouveau agité à température ambiante pendant 24 heures puis la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1N (2×10 mL) et une solution de saumure (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 3:1) pour donner l'amide **231** (330 mg ; 72 %) sous forme d'une huile incolore.

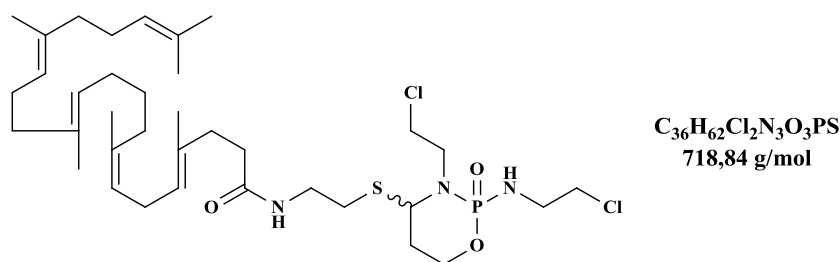
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 5,94$ (s large, 1 H, NH) ; $5,20-5,05$ (m, 5 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; $3,40$ (m, 2 H NHCH₂CH₂SH) ; $2,62$ (td, $J = 7,1$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂SH) ; $2,29$ (s, 4 H, NH(O=)CCH₂CH₂C(CH₃)=) ; $2,11-1,96$ (m, 16 H, CH₂CH₂C(CH₃)=) ; $1,68$ (s, 3 H, (CH₃)₂C=CH) ; $1,62$ (s, 3 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; $1,60$ (s, 12 H, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 173,0$ (C, NHC=O) ; $135,3$ (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; $135,1$ (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; $135,0$ (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; $133,6$ (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; $131,4$ (C, (CH₃)C=CHCH₂) ; $125,7$ (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; $124,6$ (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; $124,5$ (CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; $124,4$ (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; $42,4$ (CH₂) ; $39,9$ (2 CH₂) ; $39,7$ (CH₂) ; $35,4$ (CH₂) ; $35,3$ (CH₂) ; $28,4$ (2 CH₂) ; $26,9$ (CH₂) ; $26,8$ (2 CH₂) ; $25,9$ (CH₃, CH=C(CH₃)₂) ; $24,9$ (CH₂) ; $17,8$ (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; $16,2$ (3 CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ; $16,1$ (CH₃, CH₂CH=C(CH₃)) ppm.

IR (film) : $\nu = 2964$; 2924 ; 2845 ; 1646 ; 1549 ; 1452 ; 1444 ; 1381 ; 1239 ; 1197 ; 1151 ; 1129 ; 1108 ; 903 ; 845 ; 775 ; 732 cm⁻¹.

SM (+APCI) : $m/z = 460,4$ (100%) $[M+H]^+$.

❖ 4-Squalènecystéamide-ifosfamide **230**



A une solution du 4-méthoxy-ifosfamide **227** (40 mg ; 0,14 mmol) dans du DCM (0,5 mL) sont ajouté à -78 °C 20,7 mg de $BF_3 \cdot OEt_2$ (0,14 mmol). Le mélange est agité à -78 °C pendant 10 minutes puis une solution du *N*-(mercaptoéthyl)-squalénamide **231** (180 mg ; 0,39 mmol) dans du DCM (0,7 mL) est ajoutée lentement. Le mélange est ensuite agité pendant 30 minutes. Une solution de $NaHCO_3$ aq (5 mL) est ajoutée et le mélange est extrait avec du DCM (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM:MeOH:Et₃N 98:2:0,1) pour donner le conjugué **230** (40 mg ; 40 %) sous forme d'une huile incolore.

IR (film) : $\nu = 2963; 2930; 2864; 1644; 1551; 1443; 1381; 1364; 1230; 1166; 1126; 1102; 1071; 1036; 975; 932\text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (400 MHz, [D₆]acétone) : $\delta = 7,32$ (s large, 1 H, NH) ; 5,24-5,07 (m, 5 H, $(CH_3)C=CHCH_2$) ; 4,80-4,66 (m, 2 H, H-4, 1 H-6) ; 4,34-4,15 (m, 2 H, H-6, NH) ; 3,87-3,76 (m, 2 H, H-8) ; 3,62 (t, $J = 7,2\text{ Hz}$, 2 H, H-9) ; 3,53-3,44 (m, 2 H, H-7) ; 3,41-3,18 (m, 4 H, H-10, $NHCH_2CH_2S$) ; 2,70-2,58 (m, 2 H, $NHCH_2CH_2S$) ; 2,50-2,38 (m, 1 H, H-5) ; 2,26 (s, 4 H, $(CH_3)CCH_2CH_2C(=O)NH$) ; 2,14-1,96 (m, 17 H, $CH_2(CH_3)C=$, $CH_2CH=C(CH_3)$, 1 H-5) ; 1,66 (s, 3 H, $(CH_3)_2C=CH$) ; 1,61 (s, 12 H, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 1,59 (s, 3 H, $CH_2CH=C(CH_3)$) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, [D₆]acétone) : $\delta = 172,8$ (C, CONH) ; 135,6 (2 C, $(CH_3)C=CH$) ; 135,5 (C, $(CH_3)C=CH$) ; 135,0 (C, $(CH_3)C=CH$) ; 131,6 (C, $(CH_3)C=CH$) ; 125,2 (2 CH, $(CH_3)C=CH$) ; 125,1 (CH, $(CH_3)C=CHCH_2$) ; 125,0 (CH, $(CH_3)C=CHCH_2$) ; 124,9 (CH, $(CH_3)C=CHCH_2$) ; 66,3 (CH, C-4) ; 63,9 (d, $J_{CP} = 7,0\text{ Hz}$, CH_2 , C-6) ; 48,6 (d, $J_{CP} = 2,9\text{ Hz}$, CH_2 , C-7) ; 45,8 (d, $J_{CP} = 4,7\text{ Hz}$, CH_2 , C-9) ; 44,2 (CH_2 , C-10) ; 42,6 (d, $J_{CP} = 4,2\text{ Hz}$, CH_2 , C-8) ; 40,5 (3 CH_2) ; 39,9 (CH_2 , $NHCH_2CH_2S$) ; 36,3 (CH_2) ; 35,7 (CH_2) ; 33,4 (d, $J_{CP} = 5,0\text{ Hz}$, CH_2 , C-5) ; 32,6 (CH_2) ; 31,8 (CH_2) ; 28,9 (3 CH_2) ; 27,5 (CH_2) ; 27,4 (CH_2) ; 27,3 (CH_2) ; 25,9 (CH_3 , $(CH_3)_2C=CH$) ; 17,8 (CH_3 , $CH=C(CH_3)$) ; 16,2 (2 CH_3 , $CH=C(CH_3)$) ; 16,1 (2 CH_3 , $CH=C(CH_3)$).

SM (+ESI) : $m/z = 741,3$ (100%) $[M+H]^+$; 743,3 (85%) $[M+2+H]^+$.

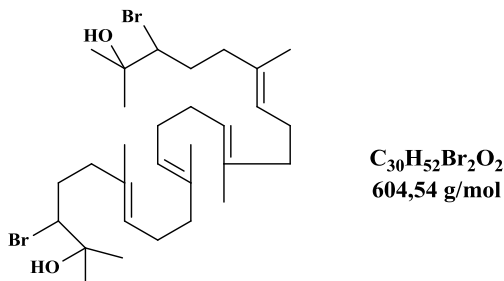
SMHR (+ESI) : Calculée pour $C_{36}H_{62}Cl_2N_3O_3PS$: 740,3524; mesurée : 740,3551.

Préparation et caractérisation des nanoparticules des dérivés squalénisés de l’Ifosfamide : une solution de chaque dérivé **229** ou **230** (1 mg) dans l’acétone (100 µL) est ajoutée goutte à goutte, sous agitation (500 t/min) dans une solution aqueuse à 5% de dextrose (1 mL). Les nanoparticules se forment alors spontanément. La solution est agitée pendant 2 minutes supplémentaires. La suspension est alors transférée dans un ballon taré puis l’éthanol est distillé sous pression réduite (30 mm Hg) à température ambiante en utilisant un évapoteur rotatif à 37 °C pour environ 5 minutes jusqu’à ce que la masse totale de la suspension atteigne 0,8 – 0,9 g. Le poids de la suspension est alors ajusté jusqu’à 1,0 g en utilisant de l’eau milliQ.

Activité anticancéreuse *in vitro* : Les tests biologique *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que dans les parties précédentes, sur les lignées décrites précédemment.

IV.6. Bola-conjugués

❖ (6*E*,10*E*,14*E*,18*E*)-3,22-Dibromo-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltetracos-6,10,14,18-tetraène-2,23-diol (248)



A une solution de squalène (**10**) (5 g ; 12,2 mmol) dans du THF (30 mL) on ajoute 4 mL d'eau. Le mélange est refroidi à 0 °C puis quelques gouttes de THF sont de nouveau ajoutées pour obtenir une solution homogène. Du *N*-bromosuccinimide (5,2 g ; 29,2 mmol) est ajouté par portion à 0 °C puis le mélange est agité pendant 3 heures à température ambiante. Le mélange est concentré sous pression réduite et le résidu est repris dans l'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (3×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est chromatographié sur gel de silice (Ether de pétrole/ Et_2O 95:5 puis 80:20) pour fournir la dibromhydrine **248** (1,8 g ; 24 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

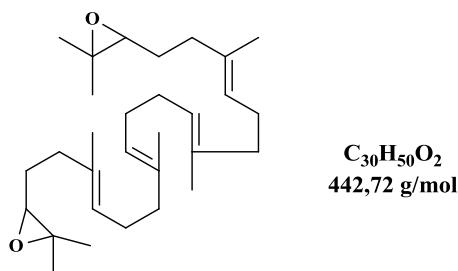
$R_f = 0,21$ (Ether de pétrole/ Et_2O 80:20).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 5,25-5,07 (m, 4 H, $C(CH_3)=CHCH_2$) ; 3,97 (d, J = 11,2 Hz, 2 H, CH_2CHBr) ; 2,39-1,86 (m, 20 H, $CHCH_2CH_2C(CH_3)=$) ; 1,59 (s, 12 H, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 1,33 (s, 6 H, $(CH_3)_2C(OH)CH$) ; 1,32 (s, 6 H, $(CH_3)_2C(OH)CH$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 135,0 (2 C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 133,1 (2 C, $CH_2C(CH_3)=CH$) ; 126,1 (2 CH, $C(CH_3)=CHCH_2$) ; 124,6 (2 CH, $C(CH_3)=CHCH_2$) ; 72,6 (2 C, $(CH_3)_2C(OH)CH$) ; 71,0 (2 CH, CH_2CHBr) ; 39,8 (2 CH_2) ; 38,3 (2 CH_2) ; 32,3 (2 CH_2) ; 28,4 (2 CH_2) ; 26,8 (2 CH_2) ; 26,7 (2 CH_3 , $(OH)C(CH_3)_2$) ; 26,0 (2 CH_3 , $C(OH)(CH_3)_2$) ; 16,2 (2 CH_3 , $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 16,0 (2 CH_3 , $CH=C(CH_3)CH_2$) ppm.

IR (film) : ν = 2928 ; 1445 ; 1382 ; 1333 ; 1225 ; 1119 ; 961 ; 909 ; 772 ; 732 cm^{-1} .

❖ 3,3'-((3*E*,7*E*,11*E*,15*E*)-3,7,12,16-Tétraméthyltétradéca-3,7,11,15-tetraène-1,18-diyl)bis(2,2-diméthyloxirane) (**249**)



Une solution de la dibromhydrine **248** (1,8 g ; 2,96 mmol) dans du méthanol (25 mL) est traitée par du carbonate de potassium (2,5 g ; 18,1 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 17 heures puis filtré sur celite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 80:20) pour donner le diépoxyde **249** (750 mg ; 57 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

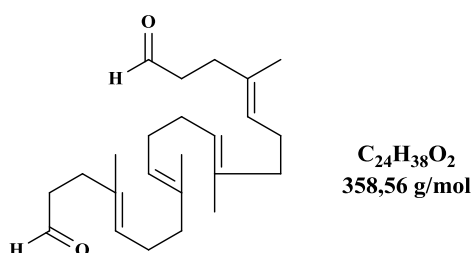
R_f = 0,39 (Ether de pétrole/Et₂O 80:20).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5,20-5,02 (m, 4 H, CH₂C(CH₃)=CH) ; 2,67 (t, *J* = 6,1 Hz, 2 H, CH₂CH(O)C(CH₃)₂) ; 2,14-1,87 (m, 20 H, 10 CH₂) ; 1,60 (s, 6 H, CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,68 (s, 6 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,27 (s, 6 H, (CH₃)₂C(O)CH) ; 1,23 (s, 6 H, (CH₃)₂C(O)CH) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 135,0 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 134,0 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 125,0 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 124,5 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 64,3 (2 CH, CH(O)C(CH₃)₂) ; 58,4 (2 C, (CH₃)₂C(O)CH) ; 39,8 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 36,4 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 28,4 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 27,6 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 26,8 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 25,0 (2 CH₃, (CH₃)₂C(O)CH) ; 18,9 (2 CH₃, (CH₃)₂C(O)CH) ; 16,1 (4 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film) : ν = 2959 ; 2922 ; 1447 ; 1377 ; 1249 ; 1122 ; 873 ; 681 cm⁻¹.

❖ (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17-Tétraméthylcosa-4,8,12,16-tétraènedial (**250**)



A une solution du diépoxyde squalénique **249** (650 mg ; 1,47 mmol) dans de l'éther diéthylique (25 mL) est traité par de l'acide periodique dihydraté (850 mg ; 3,73 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures puis repris dans de l'eau (10 mL). Les phases sont séparées puis la phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/Et₂O 80:20) pour donner le dialdéhyde **250** (180 mg ; 34 %) sous forme d'une huile jaune.

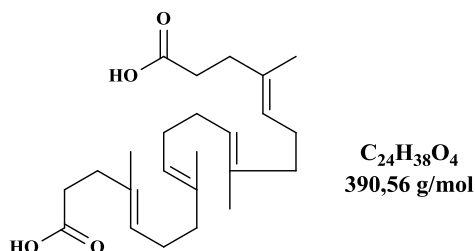
$R_f = 0,32$ (Ether de pétrole/Et₂O 80:20).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 9,73$ (t, $J = 1,8$ Hz, 2 H, CH₂CH₂CHO) ; 5,20-5,06 (m, 4 H, CH₂C(CH₃)=CHCH₂) ; 2,50 (t, $J = 7,4$ Hz, 4 H, CH₂CH₂CHO) ; 2,30 (t, $J = 7,4$ Hz, 4 H, CH₂CH₂CHO) ; 2,14-1,90 (m, 12 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 1,61 (s, 6 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,58 (s, 6 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 202,7$ (2 CH, CHO) ; 134,9 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 133,0 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 125,5 (2 CH, C(CH₃)=CH) ; 124,6 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 42,3 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 39,7 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 32,0 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 28,4 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 26,7 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 16,2 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,1 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film) : $\nu = 2914$; 1724 ; 1444 ; 1385 ; 1078 ; 850 ; 671 cm⁻¹.

❖ Acide (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17-tétraméthylcosa-4,8,12,16-tétraènedioïque (**247**)



A une solution du dialdéhyde **250** (180 mg ; 0,5 mmol) dans de l'acétone (3 mL) on ajouté à 0 °C du réactif de Jones jusqu'à ce qu'une coloration rouge persiste. L'excès de chrome (VI) est alors décomposé par quelques gouttes d'isopropanol jusqu'à l'obtention d'une coloration verte. Une solution de saumure est ajoutée puis la phase aqueuse est extraite par de l'AcOEt (3×10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Ether de pétrole 1:1) pour fournir le diacide **247** (65 mg ; 33 %) sous forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,35$ (AcOEt/Ether de pétrole 1:1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 10,3$ -10,0 (s large, 2 H, COOH) ; 5,22-5,03 (m, 4 H, CH₂C(CH₃)=CHCH₂) ; 2,44 (t, $J = 7,3$ Hz, 4 H, CH₂CH₂COOH) ; 2,30 (t, $J = 7,3$ Hz, 4 H, CH₂CH₂COOH) ; 2,15-1,91 (m, 12 H, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 1,61 (s, 6 H, CH=C(CH₃)CH₂) ; 1,59 (s, 6 H, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 180,0$ (2 C, COOH) ; 134,9 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 132,9 (2 C, CH₂C(CH₃)=CH) ; 125,6 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 124,7 (2 CH, C(CH₃)=CHCH₂) ; 39,7 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 34,5 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 33,2 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=) ; 28,2 (2

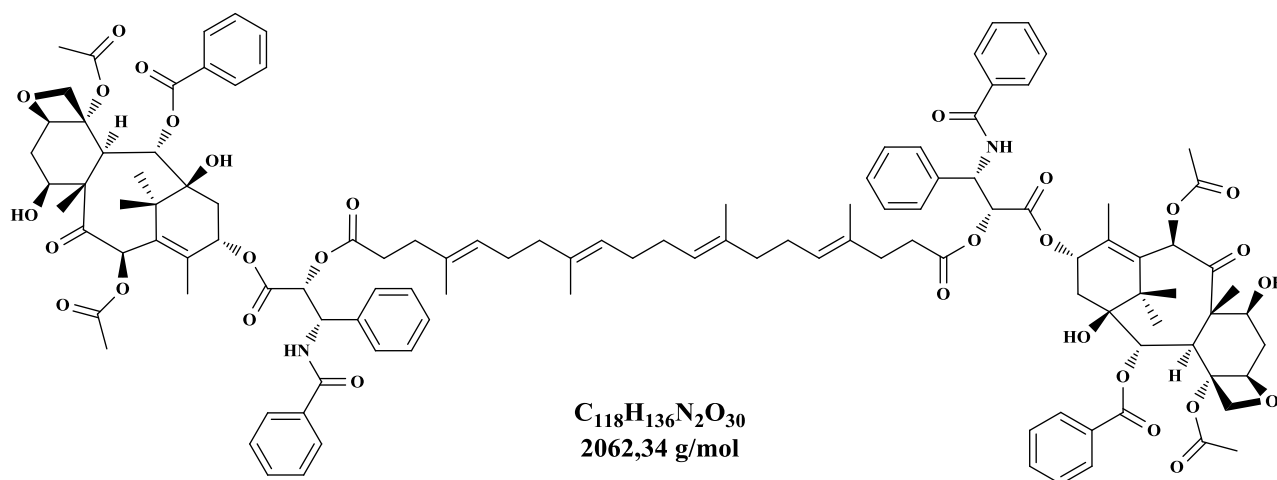
CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=); 26,6 (2 CH₂, CHCH₂CH₂C(CH₃)=); 16,1 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂); 16,0 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ppm.

IR (film): ν = 2969 ; 2915 ; 2858 ; 1705 ; 1450 ; 1410 ; 1384 ; 1300 ; 1210 ; 1160 ; 1146 ; 1099 ; 947 ; 853 ; 745 ; 701 cm⁻¹.

SM (-ESI): m/z : 389,2 (100%) [M-H]⁻.

SMHR (-ESI): calculée pour C₂₄H₃₈O₄: 389,2692 ; mesurée : 389,2711.

❖ Bola-conjugué du Paclitaxel (**244**)



A une solution du diacide **247** (15 mg ; 0,038 mmol) dans du DCM anhydre (0,4 mL) on ajoute une solution de Paclitaxel (47 mg ; 0,055 mmol) dans du DCM anhydre (0,4 mL), de l'EDCI (14 mg ; 0,073 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 1:2) pour fournir le bola-conjugué **244** (50 mg ; 88 %) sous forme d'un solide blanc amorphe.

R_f = 0,71 (Ether de pétrole/AcOEt 1:4).

[α]_D = -37,4 (c = 0,615; EtOH).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,13 (d, J = 7,3 Hz, 4 H, CH-ar) ; 7,73 (d, J = 7,3 Hz, 4 H, CH-ar) ; 7,6 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, CH-ar) ; 7,55-7,46 (m, 6 H, CH-ar) ; 7,45-7,29 (m, 14 H, CH-ar) ; 6,89 (d, J = 9,1 Hz, 2 H, NH) ; 6,30 (s, 2 H, H-10) ; 6,26 (t, J = 8,9 Hz, 2 H, H-13) ; 5,95 (dd, J = 9,1 Hz, J = 2,9 Hz, 2 H, H-3') ; 5,68 (d, J = 7,0 Hz, 2 H, H-2) ; 5,49 (d, J = 2,9 Hz, 2 H, H-2') ; 5,17-5,01 (m, 4 H, (CH₃)C=CHCH₂) ; 4,97 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, H-5) ; 4,44 (m, 2 H, H-7) ; 4,31 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, H-20) ; 4,20 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, H-20) ; 3,82 (d, J = 7,0 Hz, 2 H, H-3) ; 2,45 (s, 6 H, CH₃COO) ; 2,63-2,32 (m, 8 H, 2 H-14, 2 H-6, CHCH₂CH₂COO) ; 2,22 (s, 6 H, CH₃COO) ; 2,28-2,11 (m, 6 H, 2 H-14, CHCH₂CH₂COO) ; 2,07-1,97 (m, 8 H, (CH₃)C=CHCH₂CH₂) ; 1,96-1,83 (m, 12 H, (CH₃)C=CHCH₂CH₂, 6 H-18, 2 H-6) ; 1,78 (s, 2 H, 2 OH) ;

1,71 (s, 2 H, 2 OH) ; 1,68 (s, 6 H, H-19) ; 1,58 (s, 6 H, (CH₃)C=CH₂) ; 1,55 (s, 6 H, (CH₃)C=CH₂) ; 1,23 (s, 6 H, H-16) ; 1,13 (s, 6 H, H-17) ppm.

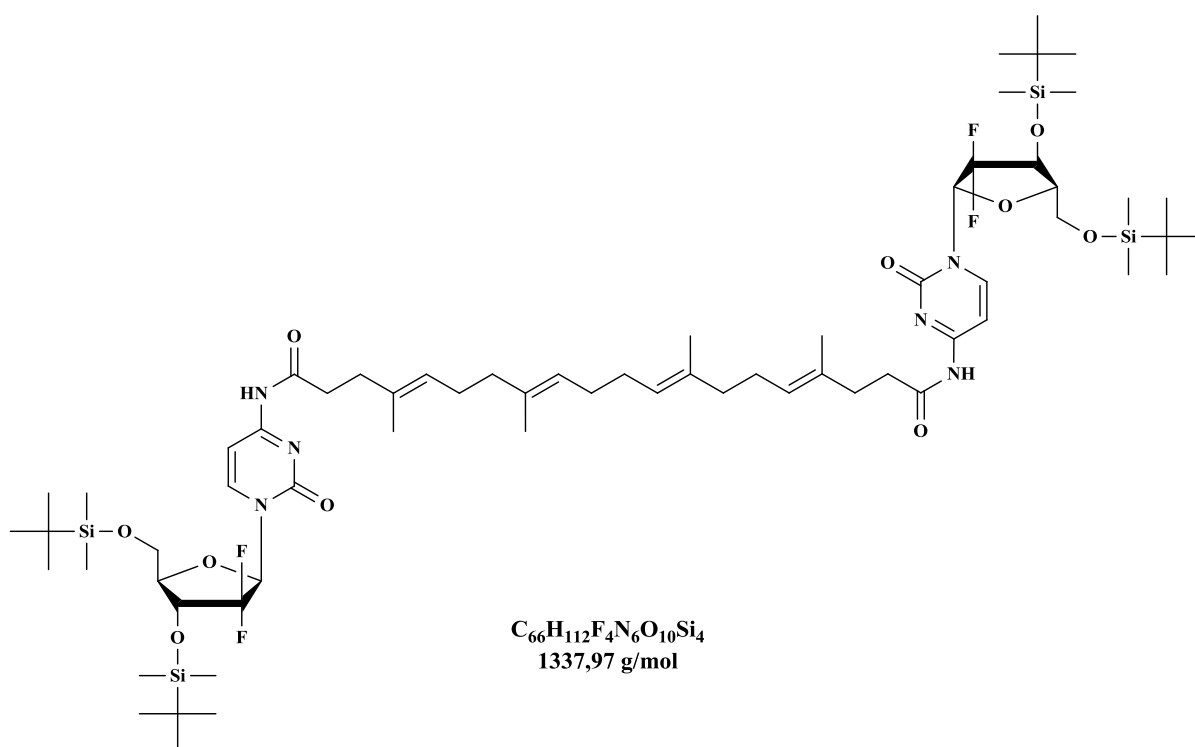
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 203,9 (2 C, C-9) ; 172,5 (2 C, PcxO₂CCH₂) ; 171,4 (2 C, CH₃CO₂) ; 169,9 (2 C, CH₃CO₂) ; 168,2 (2 C, C-1') ; 167,2 (4 C, C(=O)NH, PhCO₂) ; 143,0 (2 C, C-12) ; 137,2 (2 C) ; 135,1 (2 C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 133,9 (2 C, C-ar) ; 133,8 (2 CH, CH-ar) ; 132,9 (2 C, C-11) ; 132,8 (2 C, CH₂(CH₃)C=CH) ; 132,1 (2 CH, CH-ar) ; 130,4 (4 CH, CH-ar) ; 129,3 (2 C, C-ar) ; 129,2 (4 CH, CH-ar) ; 128,9 (8 CH, CH-ar) ; 128,6 (2 CH, CH-ar) ; 127,2 (4 CH, CH-ar) ; 126,7 (4 CH, CH-ar) ; 125,6 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 124,5 (2 CH, (CH₃)C=CHCH₂) ; 84,6 (2 CH, C-5) ; 81,2 (2 C, C-4) ; 79,3 (2 C, C-1) ; 76,6 (2 CH₂, C-20) ; 75,7 (2 CH, C-10) ; 75,3 (2 CH, C-2) ; 74,0 (2 CH, C-2') ; 72,3 (2 CH, C-7) ; 71,9 (2 CH, C-13) ; 58,7 (2 C, C-8) ; 53,0 (2 CH, C-3') ; 45,7 (2 CH, C-3) ; 43,3 (2 C, C-15) ; 39,7 (2 CH₂, CH₂(CH₃)C=CHCH₂CH₂C) ; 35,7 (4 CH₂, C-6, C-14) ; 34,3 (2 CH₂, CH₂CH₂CO₂) ; 32,7 (2 CH₂, CH₂CH₂CO₂) ; 28,4 (2 CH₂, CH₂(CH₃)C=CHCH₂CH₂) ; 27,0 (2 CH₃, C-16) ; 26,9 (2 CH₂, CH₂(CH₃)C=CHCH₂CH₂) ; 22,8 (2 CH₃, CH₃CO₂) ; 22,3 (2 CH₃, C-17) ; 20,9 (2 CH₃, CH₃CO₂) ; 16,2 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 16,0 (2 CH₃, CH=C(CH₃)CH₂) ; 14,9 (2 CH₃, C-18) ; 9,7 (2 CH₃, C-19) ppm.

IR (film) : ν = 2994 ; 1735 ; 1712 ; 1602 ; 1582 ; 1451 ; 1372 ; 1315 ; 1262 ; 1238 ; 1178 ; 1142 ; 1111 ; 1095 ; 1069 ; 1050 ; 1027 ; 965 ; 945 ; 907 ; 797 ; 778 ; 734 ; 728 ; 709 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 2084,0 (100%) [M+Na]⁺.

SMHR (+ESI) : Calculée pour C₁₁₈H₁₃₆N₂O₃₀ : 2083,9076 [M+Na]⁺ ; mesurée : 2083,9136.

❖ Bola-conjugué de la Gemcitabine silylée (**252**)



A une solution de Gemcitabine silylée **251** (150 mg ; 0,31 mmol) et de diacide **247** (55 mg ; 0,14 mmol) dans un mélange THF/DMF 1:1 anhydre (4 mL) sont ajoutés 208 mg de HAUT (0,55 mmol) et de la base de Hünig (111,3 mg ; 0,86 mmol). Le mélange est agité pendant 17 heures à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau (10 mL), et la phase aqueuse est extraite par de l'AcOEt (3×15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de saumure (2 ×15 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 3:1) pour donner le composé **252** (105 mg ; 56 %) sous forme d'une huile incolore.

R_f = 0,43 (Ether de pétrole/AcOEt 1:1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 10,64 (s, 2 H, NH) ; 8,07 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, H-6) ; 7,46 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, H-5) ; 6,31 (dd, J = 10,0 Hz, J = 3,7 Hz, 2 H, H-1') ; 5,25-4,84 (m, 4 H, CH₂CH=C(CH₃)CH₂) ; 4,33 (td, J_{HF} = 11,6 Hz, J = 8,3 Hz, 2 H, H-3') ; 4,00 (d, J = 10,0 Hz, 2 H, H-4' ou H-5') ; 3,96 (d, J = 10,0 Hz, 2 H, H-4' ou H-5') ; 3,80 (d large, J = 10,0 Hz, 2 H, H-5') ; 2,82-2,52 (m, 4 H, NHCOCH₂) ; 2,30 (t, J = 7,3 Hz, 4 H, NHCOCH₂CH₂) ; 2,11-1,87 (m, 12 H, =CHCH₂CH₂C(CH₃)) ; 1,56 (s, 6 H, CH₃) ; 1,52 (s, 6 H, CH₃) ppm.

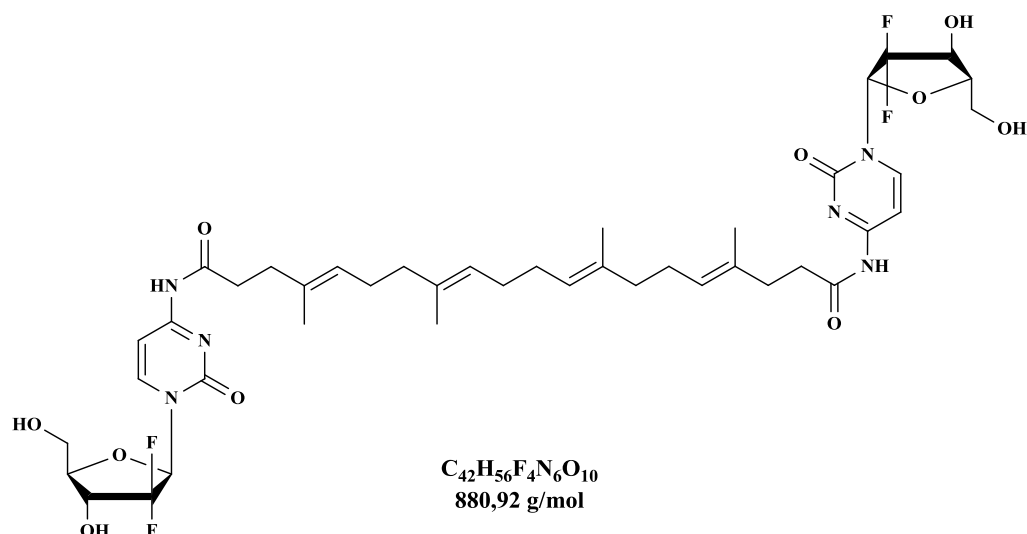
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 174,5 (2 C, NHCO) ; 163,8 (2 C, C-4) ; 154,9 (2 C, C-2) ; 144,0 (2 CH, C-6) ; 134,6 (2 C, CH=C(CH₃)CH₂) ; 133,1 (2 C, CH=C(CH₃)CH₂) ; 125,3 (2 CH, HC=C(CH₃)) ; 124,7 (2 CH, HC=C(CH₃)CH₂) ; 122,1 (t, J = 261,0 Hz, 2 CF₂, C-2') ; 97,5 (CH, C-5) ; 84,8 (dd, J_{CF} = 39,7 Hz, J_{CF} = 24,8 Hz, 2 CH, C-1') ; 81,5 (d, J_{CF} = 8,3 Hz, 2 CH, C-4') ; 69,5 (dd, J_{CF} = 26,9 Hz, J_{CF} = 18,5 Hz, 2 CH, C-3') ; 60,1 (2 CH₂, C-5') ; 39,5 (2 CH₂, CH=C(CH₃)CH₂CH₂CH) ; 36,3 (2 CH₂) ; 34,6 (2 CH₂) ; 28,1 (2 CH₂) ; 26,2 (2 CH₂) ; 26,0 (6 CH₃, (CH₃)₃CSi) ; 25,6 (6 CH₃, (CH₃)₃CSi) ; 18,5 (2 C, (CH₃)₃CSi) ; 18,1 (2 C, (CH₃)₃CSi) ; 16,0 (4 CH₃, (CH₃)C=CH) ; -4,7 (2 CH₃, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) ; -5,2 (2 CH₃, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) ; -5,3 (4 CH₃, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) ppm.

RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) : δ = -114,05 (ddd, J = 239,5 Hz, J = 11,6 Hz, J = 3,4 Hz, 2 F) ; -115,81 (td, J = 239,5 Hz, J = 10,5 Hz, 2 F) ppm.

IR (film) : ν = 2930 ; 2861 ; 1677 ; 1627 ; 1560 ; 1491 ; 1438 ; 1390 ; 1320 ; 1254 ; 1198 ; 1148 ; 1092 ; 956 ; 907 ; 860 ; 839 ; 832 ; 812 ; 778 ; 730 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 1360,5 (100%) [M+Na]⁺.

❖ Bola-conjugué de la Gemcitabine (**245**)



A une solution du silylée **244** (35 mg ; 0,026 mmol) dans du THF (1 mL) est ajoutée une solution de TBAF dans le THF (1,1 M ; 0,2 mL ; 0,22 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (AcOEt puis AcOEt/MeOH 95:5) pour fournir le Bola-conjugué **246** (12 mg ; 52 %) sous forme d'un solide blanc amorphe.

$R_f = 0,16$ (AcOEt).

RMN 1H (300 MHz, $[D_6]$ acétone) : δ = 10,11 (s large, 2 H, NH) ; 8,33 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, H-6) ; 7,42 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, H-5) ; 6,29 (t, J_{HF} = 7,4 Hz, 2 H, H-1') ; 5,30-4,92 (m, 4 H, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 4,50 (td, J_{HF} = 12,4 Hz, J = 8,3 Hz, 2 H, H-3') ; 4,02 (m, 4 H, 2 H-5', 2 H-4') ; 3,88 (dd, J = 13,2 Hz, J_{HF} = 3,2 Hz, 2 H, H-5') ; 2,68 (t, J = 7,6 Hz, 4 H, $NHCOCH_2$) ; 2,33 (t, J = 7,6 Hz, 4 H, $NHCOCH_2CH_2$) ; 2,15-1,83 (m, 12 H, $=CHCH_2CH_2C(CH_3)$) ; 1,63 (s, 6 H, CH_3) ; 1,60 (s, 6 H, CH_3) ppm.

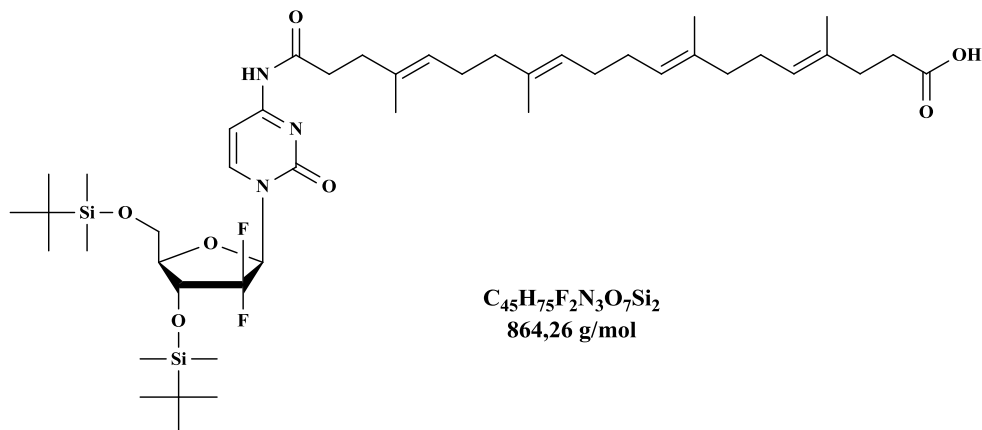
RMN ^{13}C (75 MHz, $[D_6]$ acétone) : δ = 175,5 (2 C, NHCO) ; 164,8 (2 C, C-4) ; 157,7 (2 C, C-2) ; 145,9 (2 CH, C-6) ; 135,8 (2 C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 134,3 (2 C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 126,5 (2 CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 125,7 (2 CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 123,9 (2 CF_2 , C-2') ; 98,3 (CH, C-5) ; 86,9-86,0 (m, 2 CH, C-1') ; 82,9 (2 CH, C-4') ; 70,5-69,9 (m, 2 CH, C-3') ; 60,3 (2 CH_2 , C-5') ; 40,6 (2 CH_2 , $CH=C(CH_3)CH_2CH_2CH$) ; 37,1 (2 CH_2) ; 35,7 (2 CH_2) ; 29,2 (2 CH_2) ; 27,6 (2 CH_2) ; 26,6 (CH_2) ; 16,3 (2 CH_3) ; 16,1 (2 CH_3) ppm.

RMN ^{19}F (188 MHz, $[D_6]$ acétone) : δ = -116,85 (s, 4 F) ppm. (découplé proton)

IR (film) : ν = 3500-3100 ; 2978 ; 2948 ; 2860 ; 1727 ; 1658 ; 1613 ; 1561 ; 1494 ; 1433 ; 1385 ; 1310 ; 1273 ; 1194 ; 1131 ; 1094 cm^{-1} .

SM (+ESI) : m/z = 904 (100%) $[M+Na]^+$.

❖ Carboxy-squalène Gemcitabine silylée (**253**)



A une solution du diacide **247** (75 mg ; 0,19 mmol) dans du THF anhydre (2 mL) sont ajoutés une solution de la Gemcitabine silylée **251** (66 mg ; 0,13 mmol) dans du DMF anhydre (2 mL), 70 mg de HATU (0,18 mmol), de la base de Hünig (0,07 mL ; 0,4 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange est agité à température ambiante pendant 17 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié directement sur gel de silice (Ether de pétrole/AcOEt 3:1 puis 1:1) pour donner l'acide **253** (40 mg ; 35 %) sous forme d'une huile incolore.

$R_f = 0,69$ (Ether de pétrole/AcOEt 1:1).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 11,30 (s, 1 H, NH) ; 8,07 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-6) ; 7,48 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, H-5) ; 6,30 (dd, J = 9,9 Hz, J = 4,1 Hz, 1 H, H-1') ; 5,22-5,02 (m, 4 H, $CH_2CH=C(CH_3)$) ; 4,32 (td, J_{HF} = 11,5 Hz, J = 8,1 Hz, 1 H, H-3') ; 4,02 (d, J = 9,9 Hz, 1 H, H-4' ou H-5') ; 3,96 (d, J = 9,9 Hz, 1 H, H-4' ou H-5') ; 3,80 (d large, J = 9,9 Hz, 1 H, H-5') ; 2,55 (dd, J = 9,3 Hz, J = 6,2 Hz, 2 H, CH_2) ; 2,46 (dd, J = 8,2 Hz, J = 6,2 Hz, 2 H, CH_2) ; 2,40-2,24 (m, 4 H, 2 CH_2) ; 2,20-1,84 (m, 12 H, $=CHCH_2CH_2C(CH_3)$) ; 1,63 (s, 3 H, $(CH_3)C=CH$) ; 1,60 (s, 3 H, $(CH_3)C=CH$) ; 1,58 (s, 3 H, $(CH_3)C=CH$) ; 1,56 (s, 3 H, $(CH_3)C=CH$) ; 0,94 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$) ; 0,90 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$) ; 0,12 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$) ; 0,09 (s, 3 H, $(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 179,4 (C, COOH) ; 174,4 (C, NHCO) ; 163,4 (C, C-4) ; 154,1 (C, C-2) ; 144,8 (CH, C-6) ; 134,8 (C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 134,4 (C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 133,3 (C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 133,0 (C, $CH=C(CH_3)CH_2$) ; 125,4 (CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 125,2 (CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 125,1 (CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 124,9 (CH, $HC=C(CH_3)CH_2$) ; 122,0 (CF_2 , C-2') ; 96,8 (CH, C-5) ; 85,2-84,8 (m, CH, C-1') ; 81,5 (d, J_{CF} = 8,2 Hz, CH, C-4') ; 69,6 (dd, J_{CF} = 26,9 Hz, J_{CF} = 18,5 Hz, CH, C-3') ; 60,1 (CH_2 , C-5') ; 39,7 (2 CH_2 , $CH=C(CH_3)CH_2CH_2CH$) ; 39,3 (CH_2 , $CH=C(CH_3)CH_2CH_2CH$) ; 36,8 (CH_2) ; 34,6 (CH_2) ; 34,4 (CH_2) ; 33,6 (CH_2) ; 27,9 (CH_2) ; 28,0 (CH_2) ; 26,6 (CH_2) ; 26,0 (3 CH_3 , $(CH_3)_3CSi$) ; 25,8 (CH_2) ; 25,6 (3

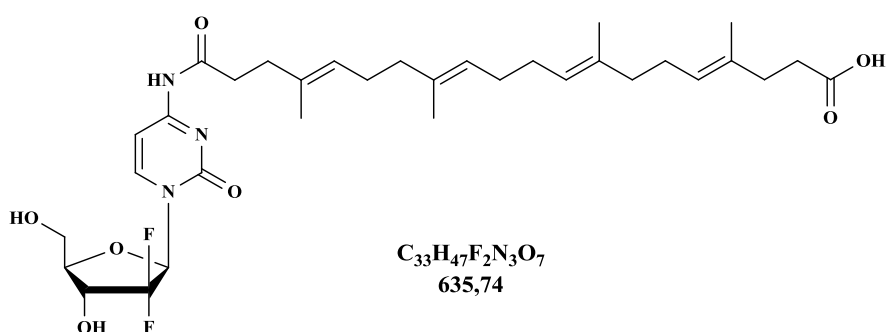
CH₃, (CH₃)₃CSi) ; 18,5 (C, (CH₃)₃CSi) ; 18,1 (C, (CH₃)₃CSi) ; 16,4 (CH₃) ; 16,0 (3 CH₃) ; -4,6 (CH₃, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) ; -5,2 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) ppm.

RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) : δ = -113,93 (ddd, J = 240,0 Hz, J = 11,7 Hz, J = 4,0 Hz, 1 F) ; -115,92 (td, J = 240,0 Hz, J = 10,4 Hz, 1 F) ppm.

IR (film) : ν = 2987 ; 2860 ; 1705 ; 1617 ; 1504 ; 1493 ; 1391 ; 1254 ; 1211 ; 1198 ; 1093 ; 907 ; 839 ; 809 ; 779 ; 734 cm⁻¹.

SM (+ESI) : m/z = 887 (100%) [M+Na]⁺.

❖ Carboxy-squalène Gemcitabine (254)



A une solution de la Gemcitabine-squalène silylée **253** (35 mg ; 0,040 mmol) dans du THF (1 mL) est ajoutée une solution de TBAF dans le THF (1,1 M ; 0,5 mL ; 0,55 mmol). Le mélange est agité pendant 4 heures à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt puis AcOEt/MeOH 95:5) pour fournir le composé déprotégé **254** (20 mg ; 79 %) sous forme d'un solide blanc amorphe.

RMN ¹H (300 MHz, [D₆]acétone) : δ = 8,33 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-6) ; 7,41 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, H-5) ; 6,27 (t, J_{HF} = 7,4 Hz, 1 H, H-1') ; 5,38-4,98 (m, 4 H, CH₂CH=C(CH₃)) ; 4,48 (td, J_{HF} = 12,5 Hz, J = 8,3 Hz, 1 H, H-3') ; 4,13-3,94 (m, 2 H, H-5', H-4') ; 3,88 (dd, J = 12,5 Hz, J = 3,1 Hz, 1 H, H-5') ; 2,70-2,59 (m, 2 H, NHCOCH₂) ; 2,49-2,20 (m, 6 H, NHCOCH₂CH₂, CH₂CH₂COOH) ; 2,19-1,84 (m, 12 H, C(CH₃)=CHCH₂CH₂) ; 1,65 (s, 3 H, C(CH₃)=CH) ; 1,63 (s, 3 H, C(CH₃)=CH) ; 1,59 (s, 6 H, C(CH₃)=CH) ppm.

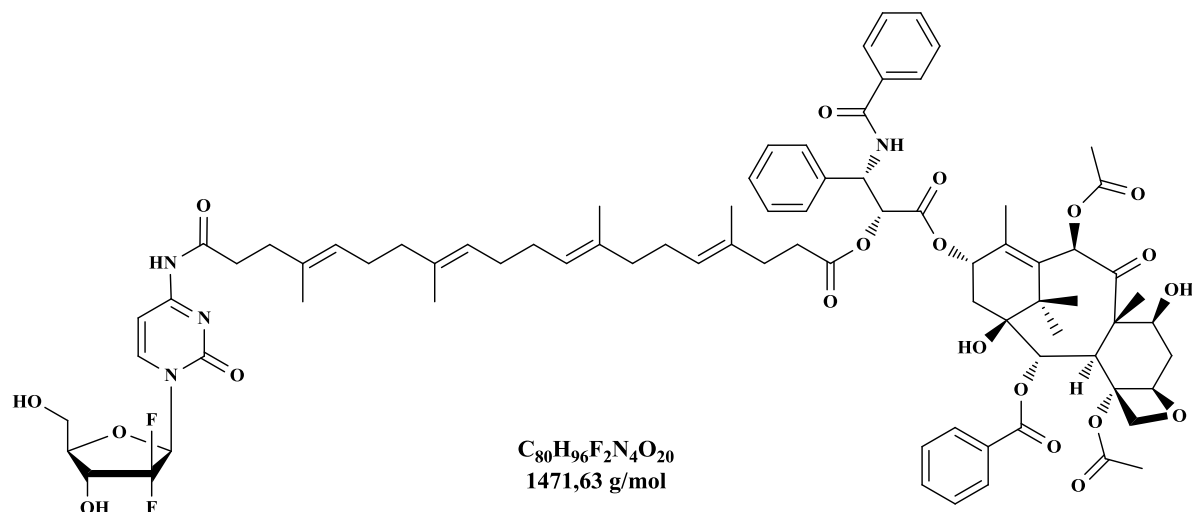
RMN ¹³C (75 MHz, [D₆]acétone) : δ = 175,5 (C, NHCO) ; 174,1 (C, COOH) ; 164,1 (C, C-4) ; 155,3 (C, C-2) ; 145,8 (CH, C-6) ; 135,5 (2 C, CH=C(CH₃)CH₂) ; 134,5 (C, CH=C(CH₃)CH₂) ; 134,3 (C, =C(CH₃)CH₂) ; 125,9 (CH, CH=C(CH₃)CH₂) ; 125,5 (CH, CH=C(CH₃)CH₂) ; 125,4 (CH, CH=C(CH₃)CH₂) ; 123,9 (CF₂, C-2') ; 96,9 (CH, C-5) ; 86,2-85,3 (m, CH, C-1') ; 82,5 (CH, C-4') ; 69,8 (t, J_{CF} = 23,0 Hz, CH, C-3') ; 60,1 (CH₂, C-5') ; 40,4 (2 CH₂, CH=C(CH₃)CH₂) ; 37,0 (CH₂) ; 35,5 (CH₂) ; 35,4 (CH₂) ; 33,6 (CH₂) ; 28,9 (2 CH₂) ; 27,3 (CH₂) ; 27,2 (CH₂) ; 16,2 (4 CH₃, (CH₃)C=CH) ppm.

RMN ¹⁹F (188 MHz, [D₆]acétone) : δ = -116,98 (s, 2 F) ppm. (découplé du proton)

IR (film) : ν = 3500-3000 ; 2932 ; 2856 ; 1698 ; 1665 ; 1615 ; 1580 ; 1559 ; 1492 ; 1384 ; 1272 ; 1198 ; 1133 ; 1085 ; 1071 cm^{-1} .

SM (+ESI) : m/z = 636 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

❖ Bola-conjugué mixte Paclitaxel/Gemcitabine (**246**)



A une solution de l'acide **254** (20 mg ; 0,031 mmol) dans un mélange DCM/acétone 1:1 (1 mL), sont ajoutés le Paclitaxel (26 mg ; 0,031 mmol), de l'EDCI (12 mg ; 0,062 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de 4-DMAP. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6 heures puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié directement sur gel de silice (Ether de Pétauole/AcOEt) pour fournir le Bola-conjugué Mixte **246** (14 mg ; 31 %) sous forme d'un solide blanc amorphe.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ = 9,02 (s, 1 H, NHCOCH_2) ; 8,26-7,92 (m, 3 H, $\text{CH-Ar}_{\text{pcx}}$, H-6_{gem}) ; 7,89-7,65 (m, 2 H, $\text{CH-Ar}_{\text{pcx}}$) ; 7,65-7,10 (m, 12 H, H-5_{gem}, $\text{CH-Ar}_{\text{pcx}}$) ; 6,49-6,00 (m, 3 H, H-10_{pcx}, H-13_{pcx}, H-1'_{gem}) ; 5,90 (dd, J = 8,9 Hz, J = 4,0 Hz, 1 H, H-3'_{pcx}) ; 5,66 (d, J = 6,9 Hz, 1 H, H-2_{pcx}) ; 5,51 (d, J = 4,0 Hz, 1 H, H-2'_{pcx}) ; 5,23-4,86 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$, H-5_{pcx}) ; 4,63-4,34 (m, 2 H, H-7_{pcx}, H-3'_{gem}) ; 4,34-4,23 (m, 1 H, H-20_{pcx}) ; 4,21-4,17 (m, 1 H, H-20_{pcx}) ; 3,99 (d, J = 8,6 Hz, 1 H) ; 3,93-3,84 (m, 1 H) ; 3,82-3,76 (m, 2 H) ; 2,73-2,12 (m, 17 H) ; 2,12-1,77 (m, 18 H) ; 1,66 (s, 3 H, H-19_{pcx}) ; 1,59 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 1,56 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 1,52 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CHCH}_2$) ; 1,23 (s, 3 H, H-16_{pcx}) ; 1,13 (s, 3 H, H-17_{pcx}) ppm.

Préparation et caractérisation des nanoparticules des bola-conjugués : Une solution de chaque dérivé **244** ou **246** (1 mg) dans l'éthanol (100 μL) (ou le THF pour **245**) est ajoutée goutte à goutte, sous agitation (500 t/min) dans une solution aqueuse à 5% de dextrose (1 mL). Les nanoparticules se forment alors spontanément. La solution est agitée pendant 2 minutes supplémentaires. La suspension est alors transférée dans un ballon taré puis l'éthanol (ou le THF) est distillé sous pression réduite (30 mm Hg) à température

ambiante en utilisant un évaporateur rotatif pendant environ 10 minutes puis à 37 °C pour environ 5 minutes jusqu'à ce que la masse totale de la suspension atteigne 0,8 – 0,9 g. Le poids de la suspension est alors ajusté jusqu'à 1,0 g en utilisant de l'eau milliQ.

Activité anticancéreuse *in vitro* : Les lignées cellulaires testées ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. Les activités anticancéreuses du Paclitaxel (**85**), des nanoparticules du Bola-conjugué du Paclitaxel **244** et des nanoparticules de Paclitaxel-squalène (**23**) sur ces lignées cellulaires ont été déterminées en utilisant le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphényl tétrazolium (MTT), puis dans les mêmes conditions que précédemment.

V. BIBLIOGRAPHIE

- (1) GLOBOCAN; IARC; <http://globocan.iarc.fr/> Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, 2008.
- (2) Salata, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* **2004**, 2, 3.
- (3) Duncan, R. Nanomedicine gets clinical. *Mater. Today* **2005**, 8, 16-17.
- (4) Mishra, B.; Patel, B. B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, 6, 9-24.
- (5) Whitesides, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1161-1165.
- (6) Bawarski, W. E.; Chidlowsky, E.; Bharali, D. J.; Mousa, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* **2008**, 4, 273-282.
- (7) Gill, P. S.; Espina, B. M.; Muggia, F.; Cabriaes, S.; Tulpule, A. et al. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J. Clin. Oncol.* **1995**, 13, 996-1003.
- (8) Forssen, E.; Ross, M. E. DaunoXome® Treatment of Solid Tumors: Preclinical and Clinical Investigations. *J. Liposome Res.* **1994**, 4, 481-512.
- (9) Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K.; Sparreboom, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* **2001**, 37, 1590-1598.
- (10) Kloover, J. S.; den Bakker, M. A.; Gelderblom, H.; van Meerbeeck, J. P. Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. *Br. J. Cancer* **2004**, 90, 304-305.
- (11) Sparreboom, A.; van Zuylen, L.; Brouwer, E.; Loos, W. J.; de Bruijn, P. et al. Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res.* **1999**, 59, 1454-1457.
- (12) Green, M. R.; Manikhas, G. M.; Orlov, S.; Afanasyev, B.; Makhson, A. M. et al. Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2006**, 17, 1263-1268.
- (13) Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2009**, 4, 99-105.
- (14) Desai, N.; Trieu, V.; Yao, Z.; Louie, L.; Ci, S. et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 1317-1324.
- (15) Ibrahim, N. K.; Desai, N.; Legha, S.; Soon-Shiong, P.; Theriault, R. L. et al. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 1038-1044.
- (16) Ibrahim, N. K.; Samuels, B.; Page, R.; Doval, D.; Patel, K. M. et al. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 6019-6026.
- (17) Gradishar, W. J.; Tjulandin, S.; Davidson, N.; Shaw, H.; Desai, N. et al. 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, 7794-7803.
- (18) Nyman, D. W.; Campbell, K. J.; Hersh, E.; Long, K.; Richardson, K. et al. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 7785-7793.
- (19) Junghanns, J.-U.; Müller, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, 3, 295-310.
- (20) Hertel, L. W.; Boder, G. B.; Kroin, J. S.; Rinzel, S. M.; Poore, G. A. et al. Evaluation of the Antitumor Activity of Gemcitabine (2',2'-Difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* **1990**, 50, 4417-4422.
- (21) Moore, M. Activity of gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma. A review. *Cancer* **1996**, 78, 633-638.

- (22) Carmichael, J.; Fink, U.; Russell, R. C.; Spittle, M. F.; Harris, A. L. et al. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **1996**, 73, 101-105.
- (23) Gatzemeier, U.; Manegold, C.; Eberhard, W.; Wilke, H. J.; Chomy, F. et al. Ifosfamide and gemcitabine: a phase II trial in advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* **1998**, 25, 15-18.
- (24) Aapro, M. S.; Martin, C.; Hatty, S. Gemcitabine--a safety review. *Anticancer Drugs* **1998**, 9, 191-201.
- (25) Hui, Y. F.; Reitz, J. Gemcitabine: a cytidine analogue active against solid tumors. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **1997**, 54, 162-170; quiz 197-198.
- (26) Postmus, P. E.; Schramel, F. M.; Smit, E. F. Evaluation of new drugs in small cell lung cancer: the activity of gemcitabine. *Semin. Oncol.* **1998**, 25, 79-82.
- (27) Carmichael, J. The role of gemcitabine in the treatment of other tumours. *Br. J. Cancer* **1998**, 78 Suppl 3, 21-25.
- (28) Graziadei, I.; Kelly, T.; Schirmer, M.; Geisen, F. H.; Vogel, W. et al. Antitumor effect of the nucleoside analogs 2-chlorodeoxyadenosine and 2',2'-difluorodeoxycytidine on human hepatoma HepG2 cells. *J. Hepatol.* **1998**, 28, 504-509.
- (29) Heinemann, V.; Xu, Y. Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W. et al. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* **1990**, 38, 567-572.
- (30) Huang, P.; Chubb, S.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* **1991**, 51, 6110-6117.
- (31) Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V. et al. 2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1879-1884.
- (32) Mackey, J. R.; Mani, R. S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J. D. et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* **1998**, 58, 4349-4357.
- (33) Gourdeau, H.; Clarke, M. L.; Ouellet, F.; Mowles, D.; Selner, M. et al. Mechanisms of uptake and resistance to troxacitabine, a novel deoxycytidine nucleoside analogue, in human leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res.* **2001**, 61, 7217-7224.
- (34) Heinemann, V.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* **1988**, 48, 4024-4031.
- (35) Gandhi, V.; Plunkett, W. Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res.* **1990**, 50, 3675-3680.
- (36) Ruiz van Haperen, V. W.; Veerman, G.; Eriksson, S.; Boven, E.; Stegmann, A. P. et al. Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res.* **1994**, 54, 4138-4143.
- (37) Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **2001**, 15, 875-890.
- (38) Kroep, J. R.; Loves, W. J.; van der Wilt, C. L.; Alvarez, E.; Talianidis, I. et al. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 371-376.
- (39) Galmarini, C. M.; Clarke, M. L.; Jordheim, L.; Santos, C. L.; Cros, E. et al. Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol.* **2004**, 4, 8.
- (40) Abbruzzese, J. L.; Grunewald, R.; Weeks, E. A.; Gravel, D.; Adams, T. et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J. Clin. Oncol.* **1991**, 9, 491-498.
- (41) Neff, T.; Blau, C. A. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **1996**, 24, 1340-1346.
- (42) Li, D.; Xie, K.; Wolff, R.; Abbruzzese, J. L. Pancreatic cancer. *Lancet* **2004**, 363, 1049-1057.
- (43) Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J. M. et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **2007**, 344, 71-77.
- (44) Brusa, P.; Immordino, M. L.; Rocco, F.; Cattel, L. Antitumor activity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *Anticancer Res.* **2007**, 27, 195-199.

- (45) Arias, J. L.; Reddy, L. H.; Couvreur, P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* **2010**, *12*, 97-104.
- (46) Guo, P.; Ma, J.; Li, S.; Guo, Z.; Adams, A. L. et al. Targeted delivery of a peripheral benzodiazepine receptor ligand-gemcitabine conjugate to brain tumors in a xenograft model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, *48*, 169-176.
- (47) Ali, S. M.; Khan, A. R.; Ahmad, M. U.; Chen, P.; Sheikh, S. et al. Synthesis and biological evaluation of gemcitabine-lipid conjugate (NEO6002). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2571-2574.
- (48) Bender, D. M.; Bao, J.; Dantzig, A. H.; Diserod, W. D.; Law, K. L. et al. Synthesis, Crystallization, and Biological Evaluation of an Orally Active Prodrug of Gemcitabine. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6958-6961.
- (49) Couvreur, P.; Stella, B.; Reddy, L. H.; Hillaireau, H.; Dubernet, C. et al. Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2544-2548.
- (50) Ourisson, G.; Rohmer, M.; Poralla, K. Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 301-333.
- (51) Bosak, T.; Losick, R. M.; Pearson, A. A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, *105*, 6725-6729.
- (52) Huang, Z. R.; Lin, Y. K.; Fang, J. Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules* **2009**, *14*, 540-554.
- (53) Gylling, H.; Miettinen, T. A. Postabsorptive metabolism of dietary squalene. *Atherosclerosis* **1994**, *106*, 169-178.
- (54) Miettinen, T. A.; Vanhanen, H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *59*, 356-363.
- (55) Ernst, J.; Sheldrick, W. S.; Fuhrhop, J. H. The crystal structure of squalene. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 778.
- (56) Van Tamelen, E. E. Bioorganic chemistry: sterols and acrylic terpene terminal epoxides. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 111-120.
- (57) Eschenmoser, A.; Ruzicka, L.; Jeger, O.; Arigoni, D. Zur Kenntnis der Triterpene. 190. Mitteilung. Eine stereochemische Interpretation der biogenetischen Isoprenregel bei den Triterpenen. *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1890-1904.
- (58) Stork, G.; Burgstahler, A. W. The Stereochemistry of Polyene Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5068-5077.
- (59) Pogliani, L.; Ceruti, M.; Ricchiardi, G.; Viterbo, D. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *70*, 21-34.
- (60) Pogliani, L.; Milanesio, M.; Ceruti, M.; Viterbo, D. Conformational and dynamical study of squalene derivatives. III: azasqualenes and solvated squalene. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *103*, 81-93.
- (61) Brown, J. M.; Martens, D. R. M. An assessment of the mobility of squalene in part-aqueous solutions from carbon magnetic resonance spin-lattice relaxation times : Comparison with squalene and 2,3-dihydroxy-2,3-dihydrosqualene. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 931-935.
- (62) Laza-Knoerr, A.; Huang, N.; Grossiord, J.-L.; Couvreur, P.; Gref, R. Interfacial rheology as a tool to study the potential of cyclodextrin polymers to stabilize oil-water interfaces. *J. Incl. Phen. Macro. Chem.* **2011**, *69*, 475-479.
- (63) Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *108-109*, 303-318.
- (64) Fox, C. B.; Anderson, R. C.; Dutill, T. S.; Goto, Y.; Reed, S. G. et al. Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *65*, 98-105.
- (65) Fox, C. B. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules* **2009**, *14*, 3286-3312.
- (66) Wang, J. J.; Sung, K. C.; Yeh, C. H.; Fang, J. Y. The delivery and antinociceptive effects of morphine and its ester prodrugs from lipid emulsions. *Int. J. Pharm.* **2008**, *353*, 95-104.
- (67) Wang, J. J.; Sung, K. C.; Hu, O. Y.; Yeh, C. H.; Fang, J. Y. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J. Control. Release* **2006**, *115*, 140-149.

- (68) Fang, J. Y.; Fang, C. L.; Liu, C. H.; Su, Y. H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 633-640.
- (69) Immordino, M. L.; Brusa, P.; Rocco, F.; Arpicco, S.; Ceruti, M. et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *J. Control. Release* **2004**, *100*, 331-346.
- (70) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505-515.
- (71) Igarashi, E. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *229*, 121-134.
- (72) Lee, H.; Fonge, H.; Hoang, B.; Reilly, R. M.; Allen, C. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1195-1208.
- (73) Couvreur, P.; Reddy, L. H.; Mangenot, S.; Poupert, J. H.; Desmaële, D. et al. Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small* **2008**, *4*, 247-253.
- (74) Reddy, L. H.; Marque, P. E.; Dubernet, C.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D. et al. Preclinical toxicology (subacute and acute) and efficacy of a new squalenoyl gemcitabine anticancer nanomedicine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 484-490.
- (75) Bildstein, L.; Dubernet, C.; Marsaud, V.; Chacun, H.; Nicolas, V. et al. Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: an original drug delivery pathway. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 163-170.
- (76) Bildstein, L.; Marsaud, V.; Chacun, H.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D. et al. Extracellular-protein-enhanced cellular uptake of squalenoyl gemcitabine from nanoassemblies. *Soft Matter* **2010**, *6*, 5570-5580.
- (77) Pili, B.; Bourgaux, C.; Amenitsch, H.; Keller, G.; Lepître-Mouelhi, S. et al. Interaction of a new anticancer prodrug, Gemcitabine-squalèneualene, with a model membrane: coupled DSC and XRD study. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1522-1532.
- (78) Reddy, L. H.; Dubernet, C.; Lepître-Mouelhi, S.; Marque, P. E.; Desmaële, D. et al. A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types. *J. Control. Release* **2007**, *124*, 20-27.
- (79) Reddy, L. H.; Renoir, J.-M.; Marsaud, V.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D. et al. Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1526-1535.
- (80) Bekkara-Aounallah, F.; Gref, R.; Othman, M.; Reddy, L. H.; Pili, B. et al. Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3715-3725.
- (81) Couvreur, P.; Desmaële, D.; Zouhiri, F. Nanoparticules de dérivés bêta-lactamine. In *PCT/IB2009/054780*: France, 2009.
- (82) Couvreur, P.; Desmaële, D.; Reddy, L. H.; Zouhiri, F. Nanoparticules de statine. In *PCT/IB2009/054781*, 2009.
- (83) Dosio, F.; Reddy, L. H.; Ferrero, A.; Stella, B.; Cattel, L. et al. Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl-Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1349-1361.
- (84) Jones, R. J.; Bischofberger, N. Minireview: nucleotide prodrugs. *Antiviral Res.* **1995**, *27*, 1-17.
- (85) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.
- (86) Schultz, C. Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885-898.
- (87) Saneyoshi, M.; Morozumi, M.; Kodama, K.; Machida, H.; Kunitaka, A. et al. Synthetic Nucleosides and Nucleotides. XVI. Synthesis and Biological Evaluations of a Series of 1-[beta]-D-Arabinofuranosylcytosine 5'-Alkyl or Arylphosphates. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2915-2923.
- (88) Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Kahn, S.; Farquhar, D. Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium: an application of the "on-line ISRP-cleaning" HPLC technique. *Antivir. Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98.

- (89) Sastry, J. K.; Nehete, P. N.; Khan, S.; Nowak, B. J.; Plunkett, W. et al. Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 441-445.
- (90) Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. Synthesis and Antitumor Evaluation of Bis[(pivaloyloxy)methyl] 2'-Deoxy-5-fluorouridine 5'-Monophosphate (FdUMP): A Strategy To Introduce Nucleotides into Cells. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3902-3909.
- (91) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J. Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 311-321.
- (92) Freil Meyers, C. L.; Hong, L.; Joswig, C.; Borch, R. F. Synthesis and Biological Activity of Novel 5-Fluoro-2'-deoxyuridine Phosphoramidate Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4313-4318.
- (93) Alexander, R. L.; Morris-Natschke, S. L.; Ishaq, K. S.; Fleming, R. A.; Kucera, G. L. Synthesis and Cytotoxic Activity of Two Novel 1-Dodecylthio-2-decyloxypropyl-3-phosphatidic Acid Conjugates with Gemcitabine and Cytosine Arabinoside. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4205-4208.
- (94) Levene, P. A.; Tipson, R. S. The Partial Synthesis of Ribose Nucleotides. *J. Biol. Chem.* **1935**, 313-323.
- (95) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1969**, *42*, 3505-3508.
- (96) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068.
- (97) Ikemoto, T.; Haze, A.; Hatano, H.; Kitamoto, Y.; Ishida, M. et al. Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorus Oxychloride in Trialkyl Phosphate. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 210-215.
- (98) Xu, L.; Chong, Y.; Hwang, I.; D'Onofrio, A.; Amore, K. et al. Structure-based design, synthesis, evaluation, and crystal structures of transition state analogue inhibitors of inosine monophosphate cyclohydrolase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 13033-13046.
- (99) Imai, K.; Fujii, S.; Takanohashi, K.; Furukawa, Y.; Masuda, T. et al. Phosphorylation. IV. Selective phosphorylation of the primary hydroxyl group in nucleosides. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1547-1550.
- (100) Brossette, T.; Klein, E.; Créminon, C.; Grassi, J.; Mioskowski, C. et al. Synthesis of haptens for the development of immunoassays for the monitoring of intracellular anti-HIV nucleosides and nucleotides. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8129-8143.
- (101) Faerber, P.; Scheit, K. H. [Synthesis of 5'-momo-, 5'-di- and 5'-triphosphates of nucleoside 2,4-dithiouridine, 2,4-dithioribothymidine, 2-thiiothymidine and 2,4-dithiothymidine]. *Chem. Ber.* **1971**, *104*, 456-460.
- (102) Hayakawa, Y.; Aso, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. Chemoselective phosphorylation of N-unblocked nucleosides. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1983**, 47-50.
- (103) Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. A convenient method for the formation of internucleotide linkage. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4003-4006.
- (104) Honjo, M.; Marumoto, R.; Kobayashi, K.; Yoshioka, Y. Phosphorylation of ribonucleosides with phosphorus trichloride. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7*, 3851-3856.
- (105) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites--A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- (106) Bannwarth, W.; Trzeciak, A. A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 175-186.
- (107) Kennedy, K. J.; Bressi, J. C.; Gelb, M. H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 95-98.
- (108) Fletcher, C. A.; Hilpert, H.; Myers, P. L.; Roberts, S. M.; Storer, R. Synthesis of compounds active against HIV: preparation of 6'-fluorocarbocyclic AZT (AZT = 3'-deoxy-3'-azidothymidine). *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1989**, 1707-1709.
- (109) Cotticelli, G.; Salvetti, R. Enzymatic Process for Preparation of 5'-monophosphate Nucleotides. **2007**, *Brevet International N° WO 2007/144168 A1*.
- (110) Wu, Y.; Fa, M.; Tae, E. L.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. Enzymatic Phosphorylation of Unnatural Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14626-14630.

- (111) Risbood, P. A.; Kane Jr., C. T.; Hossain, M. T.; Vadapalli, S.; Chadda, S. K. Synthesis of gemcitabine triphosphate (GemcitabineTP) as a tris(triethylammonium) salt. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2957-2958.
- (112) Khorana, H. G.; Turner, A. F.; Vizsolyi, J. P. Studies on Polynucleotides. IX.¹ Experiments on the Polymerization of Mononucleotides. Certain Protected Derivatives of Deoxycytidine-5' Phosphate and the Synthesis of Deoxycytidine Polynucleotides². *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 686-698.
- (113) Douglass, J. G.; Patel, R. I.; Yerxa, B. R.; Shaver, S. R.; Watson, P. S. et al. Lipophilic modifications to dinucleoside polyphosphates and nucleotides that confer antagonist properties at the platelet P2Y₁₂ receptor. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1007-1025.
- (114) van Tamelen, E. E.; Curphey, T. J. The selective oxidation of the terminal double bonds in squalene. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 121-124.
- (115) Ceruti, M.; Balliano, G.; Viola, F.; Cattel, L.; Gerst, N. et al. Synthesis and biological activity of azasqualenes, bis-azasqualenes and derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 199-208.
- (116) D'Accolti, L.; Annese, C.; Fusco, C. Direct regio- and stereoselective synthesis of squalene 2,3;22,23-dioxide using dioxiranes. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8459-8462.
- (117) Ceruti, M.; Viola, F.; Balliano, G.; Milla, P.; Roma, G. et al. Synthesis of (E)- and (Z)-29-methylidene-2,3-oxidosqualene derivatives as inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2002**, 1477-1486.
- (118) Crispino, G. A.; Sharpless, K. B. Asymmetric dihydroxylation of squalene. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4273-4274.
- (119) Williams, D. M.; Harris, V. H. *Organophosphorus Reagents*, 2004; pp 237-272.
- (120) Slotin, L. A. Current Methods of Phosphorylation of Biological Molecules. *Synthesis* **1977**, 737-752.
- (121) Corriu, R. J. P.; Lanneau, G. F.; Leclercq, D. Silicon-phosphorus analogies. nucleophilic catalysis in the alcoholysis of chlorophosphorus derivatives. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1959-1974.
- (122) Lazar, S.; Guillaumet, G. A Selective Removal of Benzyl Protecting Groups in Arylphosphate Esters with Bromotrimethylsilane. *Synth. Commun.* **1992**, *22*, 923-931.
- (123) Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R. 94. Studies on phosphorylation. Part I. Dibenzyl chlorophosphonate as a phosphorylating agent. *J. Chem. Soc.* **1945**, 382-385.
- (124) Gao, F.; Yan, X.; Shakya, T.; Baettig, O. M.; Ait-Mohand-Brunet, S. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Truncated Bisubstrate Inhibitors of Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferases. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5273-5281.
- (125) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
- (126) Sinha, N. D.; Biernat, J.; Köster, H. [beta]-Cianoethyl N,N-dialkylamino/N-morpholinomono-chloro phosphoramidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846.
- (127) Tener, G. M. 2-Cyanoethyl Phosphate and its Use in the Synthesis of Phosphate Esters¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 159-168.
- (128) Evans, D. A.; Gage, J. R.; Leighton, J. L. Asymmetric synthesis of calyculin A. 3. Assemblage of the calyculin skeleton and the introduction of a new phosphate monoester synthesis. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1964-1966.
- (129) Watanabe, Y.; Nakamura, T.; Mitsumoto, H. Protection of phosphate with the 9-fluorenylmethyl group. Synthesis of unsaturated-acyl phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7407-7410.
- (130) Bialy, L.; Waldmann, H. Total Synthesis and Biological Evaluation of the Protein Phosphatase 2A Inhibitor Cytostatin and Analogues. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2759-2780.
- (131) Watanabe, Y.; Nakatomi, M. Synthesis of natural PI(3,4,5)P₃. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1583-1586.
- (132) Gioeli, C.; Chattopadhyaya, J. *Chem. Scripta* **1982**, *19*, 235-237.
- (133) Katagiri, N.; Bahl, C. P.; Itakura, K.; Michniewicz, J.; Narang, S. A. Use of fluorene-9-methanol as a phosphate protecting group in the synthesis of deoxyribo-oligonucleotides. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1973**, 803-804.
- (134) Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. XIV. Specific Synthesis of the 3',5'-Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridyl-(3'-->5')-Uridine and Uridyl-(3'-->5')-Adenosine². *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.

- (135) Khorana, H. G. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl. Chem.* **1968**, *17*, 349-382.
- (136) Takaku, H.; Morita, K.; Sumiuchi, T. Selective removal of terminal dimethoxytrityl groups. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 1661-1664.
- (137) Puffer, B.; Kreutz, C.; Rieder, U.; Ebert, M. O.; Konrat, R. et al. 5-Fluoro pyrimidines: labels to probe DNA and RNA secondary structures by 1D 19F NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7728-7740.
- (138) Radi, M.; Spinosa, R.; Parlato, M. C.; Corelli, F.; Botta, M. Exploring the Synthesis of Masked Phosphoramido 6-Vinylcytidine Derivatives as Building Blocks for Cross-Linking Oligonucleotides. *Heterocycles* **2006**, *69*, 151-166.
- (139) Ti, G. S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Transient protection: efficient one-flask syntheses of protected deoxynucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.
- (140) Uesugi, S.; Miyashiro, H.; Tomita, K.-I.; Ikehara, M. Synthesis and Properties of d(ATACGCGTAT) and Its Derivatives Containing One and Two 5-Methylcytosine Residues. : Effect of the Methylation on Deoxyribonucleic Acid Conformation. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 51-60.
- (141) Sekine, M.; Masuda, N.; Hata, T. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides involving a rapid procedure for removal of base-protecting groups by use of the 4,4',4''-tris(benzoyloxy)trityl (TBTr) group. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1986**, *59*, 1781-1789.
- (142) Eaton, M. A. W.; Millican, T. A.; Mann, J. New methodology for C-nucleoside synthesis: preparation of 1,2-dideoxy-1-(3-pyridyl)-D-ribofuranose. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 545-547.
- (143) Zhong, M.; Strobel, S. A. Synthesis of Isotopically Labeled P-Site Substrates for the Ribosomal Peptidyl Transferase Reaction. *J. Org. Chem.* **2007**, *73*, 603-611.
- (144) Huang, Y.; Cecilia Torres, M.; Iden, C. R.; Johnson, F. Synthesis of the minor acrolein adducts of 2'-deoxyguanosine and their generation in oligomeric DNA. *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 136-148.
- (145) Stahl, P. H.; Wermuth, C. G. *Handbook of Pharmaceutical Salts : Properties, Selection, and Use*; WILEY-VCH, 2002.
- (146) Bildstein, L.; Hillaireau, H.; Desmaële, D.; Lepître-Mouelhi, S.; Dubernet, C. et al. Freeze-drying of squalenoylated nucleoside analogue nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2009**, *381*, 140-145.
- (147) Caron, J.; Reddy, L. H.; Lepître-Mouelhi, S.; Wack, S.; Clayette, P. et al. Squalenoyl nucleoside monophosphate nanoassemblies: New prodrug strategy for the delivery of nucleotide analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2761-2764.
- (148) Caron, J.; Lepeltier, E.; Reddy, L. H.; Lepître-Mouelhi, S.; Wack, S. et al. Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2615-2628.
- (149) Jordheim, L. P.; Cros, E.; Gouy, M. H.; Galmarini, C. M.; Peyrottes, S. et al. Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 5614-5621.
- (150) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- (151) Witherup, K. M.; Look, S. A.; Stasko, M. W.; Ghiorzi, T. J.; Muschik, G. M. et al. *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1249-1255.
- (152) Rao, K. V.; Hanuman, J. B.; Alvarez, C.; Stoy, M.; Juchum, J. et al. A new large-scale process for taxol and related taxanes from *Taxus brevifolia*. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1003-1010.
- (153) Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **1979**, *277*, 665-667.
- (154) Parness, J.; Horwitz, S. B. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.* **1981**, *91*, 479-487.
- (155) Schiff, P. B.; Horwitz, S. B. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3247-3452.
- (156) Hamel, E.; del Campo, A. A.; Lowe, M. C.; Lin, C. M. Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11887-11894.
- (157) Rowinsky, E. K.; Cazenave, L. A.; Donehower, R. C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1247-1259.

- (158) Kuhn, J. G. Pharmacology and pharmacokinetics of paclitaxel. *Ann. Pharmacother.* **1994**, 28, S15-17.
- (159) Rowinsky, E. K.; Donehower, R. C. Paclitaxel (taxol). *New Eng. J. Med.* **1995**, 332, 1004-1014.
- (160) Horwitz, S. B. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13, 134-136.
- (161) Spencer, C. M.; Faulds, D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* **1994**, 48, 794-847.
- (162) Alshowaier, I.; Nicholls, P. J. Management of breast cancer. *Hosp. Pharm.* **1997**, 4, 17-21.
- (163) Denis, J. N.; Greene, A. E.; Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Mangatal, L. et al. Highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5917-5919.
- (164) Gueritte-Voegelein, F.; Guenard, D.; Lavelle, F.; Le Goff, M. T.; Mangatal, L. et al. Relationships between the structure of taxol analogs and their antimitotic activity. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 992-998.
- (165) Ringel, I.; Horwitz, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 288-291.
- (166) Bissery, M. C.; Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Lavelle, F. Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res.* **1991**, 51, 4845-4852.
- (167) Feng, S.-s.; Huang, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Control. Release* **2001**, 71, 53-69.
- (168) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G. et al. Total synthesis of taxol. *Nature* **1994**, 367, 630-634.
- (169) Adams, J. D.; Flora, K. P.; Goldspiel, B. R.; Wilson, J. W.; Arbus, S. G. et al. Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* **1993**, 141-147.
- (170) Gregory, R. E.; DeLisa, A. F. Paclitaxel: a new antineoplastic agent for refractory ovarian cancer. *Clin. Pharm.* **1993**, 12, 401-415.
- (171) Friedland, D.; Gorman, G.; Treat, J. Hypersensitivity reactions from taxol and etoposide. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85, 2036.
- (172) Lilley, L. L.; Scott, H. B. What you need to know about Taxol. *Am. J. Nurs.* **1993**, 93, 46-50.
- (173) Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 7735-7738.
- (174) van Helvoort, A.; Smith, A. J.; Sprong, H.; Fritzsche, I.; Schinkel, A. H. et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **1996**, 87, 507-517.
- (175) Constantinides, P. P.; Tustian, A.; Kessler, D. R. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2004**, 56, 1243-1255.
- (176) Constantinides, P.; Han, J.; Davis, S. Advances in the Use of Tocols as Drug Delivery Vehicles. *Pharm. Res.* **2006**, 23, 243-255.
- (177) Constantinides, P. P.; Lambert, K. J.; Tustian, A. K.; Schneider, B.; Lalji, S. et al. Formulation Development and Antitumor Activity of a Filter-Sterilizable Emulsion of Paclitaxel. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 175-182.
- (178) Sharma, A.; Mayhew, E.; Straubinger, R. M. Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model. *Cancer Res.* **1993**, 53, 5877-5881.
- (179) Straubinger, R. M.; Sharma, A.; Murray, M.; Mayhew, E. Novel Taxol formulations: Taxol-containing liposomes. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* **1993**, 69-78.
- (180) Sharma, A.; Straubinger, R. M. Novel Taxol Formulations: Preparation and Characterization of Taxol-Containing Liposomes. *Pharm. Res.* **1994**, 11, 889-896.
- (181) Zhou, R.; Mazurchuk, R. V.; Tamburlin, J. H.; Harrold, J. M.; Mager, D. E. et al. Differential Pharmacodynamic Effects of Paclitaxel Formulations in an Intracranial Rat Brain Tumor Model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 332, 479-488.
- (182) Zhu, Q.; Guo, Z.; Huang, N.; Wang, M.; Chu, F. Comparative molecular field analysis of a series of paclitaxel analogues. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4319-4328.
- (183) Kingston, D. G. Recent advances in the chemistry of taxol. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 726-734.

- (184) Deutsch, H. M.; Glinski, J. A.; Hernandez, M.; Haugwitz, R. D.; Narayanan, V. L. et al. Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 788-792.
- (185) Zhao, Z.; Kingston, D. G. I.; Crosswell, A. R. Modified Taxols, 6. Preparation of Water-Soluble Prodrugs of Taxol. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1607-1611.
- (186) Mathew, A. E.; Mejillano, M. R.; Nath, J. P.; Himes, R. H.; Stella, V. J. Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 145-151.
- (187) Nicolaou, K. C.; Riemer, C.; Kerr, M. A.; Rideout, D.; Wrasidlo, W. Design, synthesis and biological activity of protaxols. *Nature* **1993**, 364, 464-466.
- (188) Tietze, L. F.; Feuerstein, T. Enzyme and proton-activated prodrugs for a selective cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 2155-2175.
- (189) Vyas, D. M.; Wong, H.; Crosswell, A. R.; Casazza, A. M.; Knipe, J. O. et al. Synthesis and antitumor evaluation of water soluble taxol phosphates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1357-1360.
- (190) Matsumoto, H.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. Controlled drug release: new water-soluble prodrugs of an HIV protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 605-609.
- (191) Paradis, R.; Page, M. New active paclitaxel glucuronide derivative with improved water solubility. *Int. J. Oncol.* **1998**, 12, 391-394.
- (192) Paradis, R.; Page, M. New active paclitaxel amino acids derivatives with improved water solubility. *Anticancer Res.* **1998**, 18, 2711-2716.
- (193) Nicolaou, K. C.; Guy, R. K.; Pitsinos, E. N.; Wrasidlo, W. A Water-Soluble Prodrug of Taxol with Self-Assembling Properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1583-1587.
- (194) Wrasidlo, W.; Gaedicke, G.; Guy, R. K.; Renaud, J.; Pitsinos, E. et al. A novel 2'-(N-methylpyridinium acetate) prodrug of paclitaxel induces superior antitumor responses in preclinical cancer models. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 1093-1099.
- (195) Damen, E. W. P.; Wiegerinck, P. H. G.; Braamer, L.; Sperling, D.; de Vos, D. et al. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 427-432.
- (196) Seligson, A. L.; Terry, R. C.; Bressi, J. C.; Douglass, J. G., 3rd; Sovak, M. A new prodrug of paclitaxel: synthesis of Protaxel. *Anticancer Drugs* **2001**, 12, 305-313.
- (197) Niethammer, A.; Gaedicke, G.; Lode, H. N.; Wrasidlo, W. Synthesis and preclinical characterization of a paclitaxel prodrug with improved antitumor activity and water solubility. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 414-420.
- (198) Wrasidlo, W.; Niethammer, A.; Deger, S.; Sehouli, J.; Kulozik, A. et al. Pilot study of hydrolytically activated paclitaxel prodrug therapy in patients with progressive malignancies. *Curr. Ther. Res.* **2002**, 63, 247-262.
- (199) Hayashi, Y.; Skwarczynski, M.; Hamada, Y.; Sohma, Y.; Kimura, T. et al. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3782-3784.
- (200) Sohma, Y.; Hayashi, Y.; Skwarczynski, M.; Hamada, Y.; Sasaki, M. et al. O-N intramolecular acyl migration reaction in the development of prodrugs and the synthesis of difficult sequence-containing bioactive peptides. *Biopolymers* **2004**, 76, 344-356.
- (201) Skwarczynski, M.; Sohma, Y.; Kimura, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T. et al. O-N Intramolecular acyl migration strategy in water-soluble prodrugs of taxoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4441-4444.
- (202) Skwarczynski, M.; Sohma, Y.; Noguchi, M.; Kimura, M.; Hayashi, Y. et al. No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reactions. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2655-2566.
- (203) de Groot, F. M.; Damen, E. W.; Scheeren, H. W. Anticancer prodrugs for application in monotherapy: targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1093-1122.
- (204) Bradley, M. O.; Webb, N. L.; Anthony, F. H.; Devanesan, P.; Witman, P. A. et al. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 3229-3238.

- (205) Sparreboom, A.; Wolff, A. C.; Verweij, J.; Zabelina, Y.; van Zomeren, D. M. et al. Disposition of docosahexaenoic acid-paclitaxel, a novel taxane, in blood: in vitro and clinical pharmacokinetic studies. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 151-159.
- (206) Wolff, A. C.; Donehower, R. C.; Carducci, M. K.; Carducci, M. A.; Brahmer, J. R. et al. Phase I study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: a taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 3589-3597.
- (207) Fracasso, P. M.; Picus, J.; Wildi, J. D.; Goodner, S. A.; Creekmore, A. N. et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel, Taxoprexin, in resistant solid tumor malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *63*, 451-458.
- (208) Harries, M.; O'Donnell, A.; Scurr, M.; Reade, S.; Cole, C. et al. Phase I/II study of DHA-paclitaxel in combination with carboplatin in patients with advanced malignant solid tumours. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 1651-1655.
- (209) Payne, M.; Ellis, P.; Dunlop, D.; Ranson, M.; Danson, S. et al. DHA-paclitaxel (Taxoprexin) as first-line treatment in patients with stage IIIB or IV non-small cell lung cancer: report of a phase II open-label multicenter trial. *J. Thor. Oncol.* **2006**, *1*, 984-990.
- (210) Jones, R. J.; Hawkins, R. E.; Eatock, M. M.; Ferry, D. R.; Eskens, F. A. et al. A phase II open-label study of DHA-paclitaxel (Taxoprexin) by 2-h intravenous infusion in previously untreated patients with locally advanced or metastatic gastric or oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *61*, 435-441.
- (211) Homsí, J.; Bedikian, A. Y.; Kim, K. B.; Papadopoulos, N. E.; Hwu, W.-J. et al. Phase 2 open-label study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel in cutaneous and mucosal metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* **2009**, *19*, 238-242.
- (212) Homsí, J.; Bedikian, A. Y.; Papadopoulos, N. E.; Kim, K. B.; Hwu, W.-J. et al. Phase 2 open-label study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res.* **2010**, *20*, 507-510.
- (213) Bedikian, A. Y.; DeConti, R. C.; Conry, R.; Agarwala, S.; Papadopoulos, N. et al. Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 787-793.
- (214) Pinner, A.; Klein, F. Umwandlung der Nitrile in Imide. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1877**, *10*, 1889-1897.
- (215) Pinner, A.; Klein, F. Umwandlung der Nitrile in Imide. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1878**, *11*, 1475-1487.
- (216) Brown, C. A.; Ahuja, V. K. "P-2 nickel" catalyst with ethylenediamine, a novel system for highly stereospecific reduction of alkynes to cis-olefins. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1973**, 553-554.
- (217) Delorme, D.; Girard, Y.; Rokach, J. Total synthesis of leukotriene E4 metabolites and precursors to radiolabeled forms of those metabolites. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3635-3640.
- (218) Lotz, B. T.; Miller, M. J. Diastereoselective synthesis of the carbacephem framework. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 618-625.
- (219) Gupta, A.; Beazley, G.; Lee, J.; Bérubé, G. Synthesis of Substituted Triarylpyran through an Unexpected Intramolecular Cyclization. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2031 - 2037.
- (220) Schow, S. R.; McMorris, T. C. Utility of the Wittig reaction for the construction of side chains of steroids starting from pregnenolone. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3760-3765.
- (221) Coxon, G. D.; Al Dulayymi, J. a. R.; Morehouse, C.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. et al. Synthesis and properties of methyl 5-(1'R,2'S)-(2-octadecylcycloprop-1-yl)pentanoate and other [omega]-19 chiral cyclopropane fatty acids and esters related to mycobacterial mycolic acids. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *127*, 35-46.
- (222) Nonaka, H.; Wang, Y.-G.; Kobayashi, Y. First total synthesis of tuberonic acid. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1745-1748.
- (223) Chaubey, N.; Date, S. M.; Ghosh, S. K. An efficient asymmetric desymmetrization of prochiral glutaric anhydrides with SuperQuat chiral oxazolidin-2-ones. *Tetrahedron-Asymmetry* **2008**, *19*, 2721-2730.
- (224) Poulain, S.; Noiret, N.; Patin, H. An easy access to symmetrical Z-olefins from phosphorus ylides. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7703-7706.

- (225) Gung, B. W.; Omollo, A. O. First Total Synthesis of the Potent Anticancer Natural Product Dideoxypetrosynol A: Preparation of the "Skipped" (Z)-Eneidyne Moiety by Oxidative Coupling of Homopropargylphosphonium Ylide. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 4790-4795.
- (226) Yadav, J. S.; Balanarsaiah, E.; Raghavendra, S.; Satyanarayana, M. Chemoselective hydrolysis of tert-butyl esters in acetonitrile using molecular iodine as a mild and efficient catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 4921-4924.
- (227) Bradley, M. O.; Swindell, C. S.; Anthony, F. H.; Witman, P. A.; Devanesan, P. et al. Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. *J. Control. Release* **2001**, 74, 233-236.
- (228) Arndt, F.; Eistert, B. A method for conversion of carboxylic acids to higher homologs of their derivatives. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1935**, 68B, 200-208.
- (229) Gademann, K.; Ernst, M.; Hoyer, D.; Seebach, D. Synthesis and Biological Evaluation of a Cyclo-[beta]-tetrapeptide as a Somatostatin Analogue. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1223-1226.
- (230) Kleschick, W. A. Stereoselective synthesis of cis-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 5429-5433.
- (231) Jäger, V.; Günther, H. J. Synthesis of [gamma]-methylene butyrolactones (4-penten-4-olides). *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 2543-2546.
- (232) Ficini, J.; d'Angelo, J. Une nouvelle voie d'accès à l'acide ($\pm$) chrysanthémique trans. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 2441-2444.
- (233) Ohkubo, A.; Kasuya, R.; Aoki, K.; Kobori, A.; Taguchi, H. et al. Efficient synthesis of functionalized oligodeoxyribonucleotides with base-labile groups using a new silyl linker. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 5345-5351.
- (234) Tan, L.; Ma, D. Total Synthesis of Salinamide A: A Potent Anti-Inflammatory Bicyclic Dipeptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3614-3617.
- (235) Deslongchamps, P.; Lamothe, S.; Lin, H.-S. A simple and direct method of cyclization for the synthesis of 10-membered rings. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 1298-1307.
- (236) Xu, Y.-C.; Roughton, A. L.; Plante, R.; Goldstein, S.; Deslongchamps, P. Stereocontrolled construction of 1,7-dimethyl A.B.C.[6.6.6] tricycles. Part I. Transannular Diels-Alder reactions of 14-membered macrocycles containing trans-dienophiles. *Can. J. Chem.* **1993**, 71, 1152-1168.
- (237) Krapcho, A. P. Synthetic Applications of Dealkoxycarbonylations of Malonate Esters, β -Keto Esters, α -Cyano Esters and Related Compounds in Dipolar Aprotic Media - Part I. *Synthesis* **1982**, 805-822.
- (238) Finkelstein, H. Preparation of Organic Iodides from the Corresponding Bromides and Chlorides. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1910**, 43, 1528-1532.
- (239) Naito, T.; Yuamoto, Y.; Ninomiya, I.; Kiguchi, T. First total synthesis of pseudodistomin tetrahydroacetate. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 4033-4036.
- (240) Wang, Y.; Ma, J.; Cheon, H.-S.; Kishi, Y. Aggregation Behavior of Tetraenoic Fatty Acids in Aqueous Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1333-1336.
- (241) Dosio, F.; Stella, B.; Arpicco, S.; Cattel, L. Macromolecules as taxane delivery systems. *Exp. Op. Drug Deliver.* **2010**, 8, 33-55.
- (242) Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, 22, 7265-7279.
- (243) Screnci, D.; McKeage, M. J.; Galettis, P.; Hambley, T. W.; Palmer, B. D. et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br. J. Cancer* **2000**, 82, 966-972.
- (244) Chaney, S. G.; Campbell, S. L.; Temple, B.; Bassett, E.; Wu, Y. et al. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1551-1559.
- (245) Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 307-320.
- (246) Ang, W. H.; Myint, M.; Lippard, S. J. Transcription Inhibition by Platinum-DNA Cross-Links in Live Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7429-7435.
- (247) El-Khateeb, M.; Appleton, T. G.; Gahan, L. R.; Charles, B. G.; Berners-Price, S. J. et al. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 77, 13-21.
- (248) Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van der Veer, J. L.; Den Hartog, J. H. J.; Lohman, P. H. M.; Reedijk, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **1985**, 24, 707-713.

- (249) Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* **1995**, 377, 649-652.
- (250) Teuben, J.-M.; Bauer, C.; Wang, A. H.-J.; Reedijk, J. Solution Structure of a DNA Duplex Containing a cis-Diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) Intrastrand Cross-Link, a Major Adduct in Cells Treated with the Anticancer Drug Carboplatine. *Biochemistry* **1999**, 38, 12305-12312.
- (251) Huang, H.; Zhu, L.; Reid, B. R.; Drobný, G. P.; Hopkins, P. B. Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link. *Science* **1995**, 270, 1842-1845.
- (252) Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 14298-14302.
- (253) Gately, D. P.; Howell, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br. J. Cancer* **1993**, 67, 1171-1176.
- (254) Holzer, A. K.; Howell, S. B. The Internalization and Degradation of Human Copper Transporter 1 following Cisplatin Exposure. *Cancer Res.* **2006**, 66, 10944-10952.
- (255) Holzer, A. K.; Manorek, G. H.; Howell, S. B. Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1390-1394.
- (256) Kelley, S. L.; Basu, A.; Teicher, B. A.; Hacker, M. P.; Hamer, D. H. et al. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* **1988**, 241, 1813-1815.
- (257) Safaei, R.; Holzer, A. K.; Katano, K.; Samimi, G.; Howell, S. B. The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1607-1613.
- (258) Wiltshaw, E. Ovarian trials at the Royal Marsden. *Cancer Treat. Rev.* **1985**, 12, 67-71.
- (259) Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A.; Roberts, J. J. Mechanism of Cytotoxicity of Anticancer Platinum Drugs: Evidence That cis-Diamminedichloroplatinum(II) and cis-Diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) Differ Only in the Kinetics of Their Interaction with DNA. *Cancer Res.* **1986**, 46, 1972-1979.
- (260) Aabo, K.; Adams, M.; Adnitt, P.; Alberts, D. S.; Athanazziou, A. et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. *Br. J. Cancer* **1998**, 78, 1479-1487.
- (261) Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes against Sarcoma-180 ascites form. *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315-1318.
- (262) Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic, E. Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 227-235.
- (263) Rixe, O.; Ortuzar, W.; Alvarez, M.; Parker, R.; Reed, E. et al. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the national cancer institute's anticancer drug screen panel. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 1855-1865.
- (264) Machover, D.; Diaz-Rubio, E.; de Gramont, A.; Schif, A.; Gastiburu, J.-J. et al. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann. Oncol.* **1996**, 7, 95-98.
- (265) Levi, F.; Misset, J. L.; Brienza, S.; Adam, R.; Metzger, G. et al. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer* **1992**, 69, 893-900.
- (266) Giacchetti, S.; Perpoint, B.; Zidani, R.; Le Bail, N.; Faggiuolo, R. et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2000**, 18, 136-147.
- (267) de Gramont, A.; Figer, A.; Seymour, M.; Homerin, M.; Hmissi, A. et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2000**, 18, 2938-2947.
- (268) Kelland, L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues. Satraplatin and picoplatin. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, 16, 1009-1021.
- (269) Holford, J.; Sharp, S. Y.; Murrer, B. A.; Abrams, M.; Kelland, L. R. In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473. *Br. J. Cancer* **1998**, 77, 366-373.

- (270) Sharp, S. Y.; O'Neill, C. F.; Rogers, P. M.; Boxall, F. E.; Kelland, L. Retention of activity by the new generation platinum agent AMD0473 in four human tumour cell lines possessing acquired resistance to oxaliplatin. *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, 2309-2315.
- (271) Raynaud, F. I.; Boxall, F. E.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Jones, M. et al. cis-Amminedichloro(2-methylpyridine) platinum(II) (AMD473), a novel sterically hindered platinum complex: in vivo activity, toxicology, and pharmacokinetics in mice. *Clin. Cancer Res.* **1997**, 3, 2063-2074.
- (272) Rogers, P.; Boxall, F. E.; Allott, C. P.; Stephens, T. C.; Kelland, L. R. Sequence-dependent synergism between the new generation platinum agent ZD0473 and paclitaxel in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, 1653-1660.
- (273) Gore, M. E.; Atkinson, R. J.; Thomas, H.; Cure, H.; Rischin, D. et al. A phase II trial of ZD0473 in platinum-pretreated ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, 2416-2420.
- (274) Akaza, H.; Togashi, M.; Nishio, Y.; Miki, T.; Kotake, T. et al. Phase II study of cis-diammine(glycolato)platinum, 254-S, in patients with advanced germ-cell testicular cancer, prostatic cancer, and transitional-cell carcinoma of the urinary tract. 254-S Urological Cancer Study Group. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, 31, 187-192.
- (275) Osawa, S.; Furuta, T.; Sugimoto, K.; Kosugi, T.; Terai, T. et al. Prospective study of daily low-dose nedaplatin and continuous 5-fluorouracil infusion combined with radiation for the treatment of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **2009**, 9, 408-418.
- (276) McKeage, M. J. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, 10, 119-128.
- (277) Choi, S.; Filotto, C.; Bisanzo, M.; Delaney, S.; Lagasee, D. et al. Reduction and Anticancer Activity of Platinum(IV) Complexes. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 2500-2504.
- (278) Hall, M. D.; Hambley, T. W. Platinum(IV) antitumour compounds: their bioinorganic chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 49-67.
- (279) Ellis, L.; Er, H.; Hambley, T. The Influence of the Axial Ligands of a Series of Platinum(IV) Anti-Cancer Complexes on Their Reduction to Platinum(II) and Reaction With DNA. *Aust. J. Chem.* **1995**, 48, 793-806.
- (280) Choy, H.; Park, C.; Yao, M. Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 1633-1638.
- (281) Sternberg, C. N.; Whelan, P.; Hetherington, J.; Paluchowska, B.; Slee, P. H. T. J. et al. Phase III Trial of Satraplatin, an Oral Platinum plus Prednisone vs. Prednisone alone in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Oncology* **2005**, 68, 2-9.
- (282) Žák, F. e.; Turánek, J.; Kroutil, A.; Sova, P.; Mistr, A. et al. Platinum(IV) Complex with Adamantylamine as Nonleaving Amine Group: Synthesis, Characterization, and in Vitro Antitumor Activity against a Panel of Cisplatin-Resistant Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 761-763.
- (283) Kozubík, A.; Horváth, V.; Sviháľková-Sindlerová, L.; Soucek, K.; Hofmanová, J. et al. High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69, 373-383.
- (284) Sova, P.; Chladek, J.; Zak, F.; Mistr, A.; Kroutil, A. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of platinum in rats following single and multiple oral doses of LA-12 [(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)]. *Int. J. Pharm.* **2005**, 288, 123-129.
- (285) Sova, P.; Mistr, A.; Kroutil, A.; Zak, F.; Pouckova, P. et al. Comparative anti-tumor efficacy of two orally administered platinum(IV) drugs in nude mice bearing human tumor xenografts. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, 17, 201-206.
- (286) Schilder, R. J.; LaCreta, F. P.; Perez, R. P.; Johnson, S. W.; Brennan, J. M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule. *Cancer Res.* **1994**, 54, 709-717.
- (287) Trask, C.; Silverstone, A.; Ash, C. M.; Earl, H.; Irwin, C. et al. A randomized trial of carboplatin versus iproplatin in untreated advanced ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **1991**, 9, 1131-1137.
- (288) Meerum Terwogt, J.; Groenewegen, G.; Pluim, D.; Maliepaard, M.; Tibben, M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of SPI-77, a liposomal encapsulated dosage form of cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 49, 201-210.

- (289) White, S. C.; Lorigan, P.; Margison, G. P.; Margison, J. M.; Martin, F. et al. Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **2006**, 95, 822-828.
- (290) Dragovich, T.; Mendelson, D.; Kurtin, S.; Richardson, K.; Von Hoff, D. et al. A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 58, 759-764.
- (291) Lu, C.; Perez-Soler, R.; Piperdi, B.; Walsh, G. L.; Swisher, S. G. et al. Phase II Study of a Liposome-Entrapped Cisplatin Analog (L-NDDP) Administered Intrapleurally and Pathologic Response Rates in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 3495-3501.
- (292) <http://www.clinicaltrials.gov/>.
- (293) Rademaker-Lakhai, J. M.; Terret, C.; Howell, S. B.; Baud, C. M.; de Boer, R. F. et al. A Phase I and Pharmacological Study of the Platinum Polymer AP5280 Given as an Intravenous Infusion Once Every 3 Weeks in Patients with Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 3386-3395.
- (294) Rice, J. R.; Gerberich, J. L.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B. Preclinical Efficacy and Pharmacokinetics of AP5346, A Novel Diaminocyclohexane-Platinum Tumor-Targeting Drug Delivery System. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 2248-2254.
- (295) Campone, M.; Rademaker-Lakhai, J.; Bennouna, J.; Howell, S.; Nowotnik, D. et al. Phase I and pharmacokinetic trial of AP5346, a DACH-platinum-polymer conjugate, administered weekly for three out of every 4 weeks to advanced solid tumor patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, 60, 523-533.
- (296) Barnes, K. R.; Kutikov, A.; Lippard, S. J. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a series of estrogen-tethered platinum(IV) complexes. *Chem. Biol.* **2004**, 11, 557-564.
- (297) He, Q.; Liang, C. H.; Lippard, S. J. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 5768-5772.
- (298) Reithofer, M. R.; Valiahdi, S. M.; Jakupiec, M. A.; Arion, V. B.; Egger, A. et al. Novel di- and tetracarboxylatoplatinum(IV) complexes. Synthesis, characterization, cytotoxic activity, and DNA platination. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6692-6699.
- (299) Feazell, R. P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Lippard, S. J. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8438-8439.
- (300) Dhar, S.; Liu, Z.; Thomale, J.; Dai, H.; Lippard, S. J. Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11467-11476.
- (301) Dhar, S.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A.; Lippard, S. J. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14652-14653.
- (302) Burger, A.; Bennet, W. B. Amino Derivatives of 2,2-Diphenylcyclohexanone. II. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 5414-5415.
- (303) Smith, D. R.; Maienthal, M.; Tipton, J. Reduction of oximes with lithium aluminium hydride. *J. Org. Chem.* **1952**, 17, 294-297.
- (304) Walter, C. R. Preparation of Primary Amines by Reduction of Oximes with Lithium Aluminum Hydride and by the Leuckart Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 5185-5187.
- (305) Babaeva, A. V. Oxidation of complex compounds of bivalent platinum with hydrogen peroxide. *Doklady Akademii Nauk SSR* **1939**, 23, 653-657.
- (306) Rieter, W. J.; Pott, K. M.; Taylor, K. M.; Lin, W. Nanoscale coordination polymers for platinum-based anticancer drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11584-11585.
- (307) Liang, J.; Huang, M.; Duan, W.; Yu, X. Q.; Zhou, S. Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. *Chem. Pharm. Des.* **2007**, 13, 963-978.
- (308) Sladek, N. E. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol. Ther.* **1988**, 37, 301-355.
- (309) Storme, T.; Deroussent, A.; Mercier, L.; Prost, E.; Re, M. et al. New Ifosfamide Analogs Designed for Lower Associated Neurotoxicity and Nephrotoxicity with Modified Alkylating Kinetics Leading to Enhanced in Vitro Anticancer Activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 328, 598-609.
- (310) Zhang, J.; Tian, Q.; Chan, S. Y.; Duan, W.; Zhou, S. Insights into oxazaphosphorine resistance and possible approaches to its circumvention. *Drug Resist. Updatdes* **2005**, 8, 271-297.

- (311) Chen, G.; Teicher, B. A.; Frei, E., 3rd Biochemical characterization of in vivo alkylating agent resistance of a murine EMT-6 mammary carcinoma. Implication for systemic involvement in the resistance phenotype. *Cancer Biochem. Biophys.* **1998**, *16*, 139-155.
- (312) Kerbusch, T.; de Kraker, J.; Keizer, H. J.; van Putten, J. W. G.; Groen, H. J. M. et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ifosfamide and its Metabolites. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, *40*, 41-62.
- (313) Siu, L. L.; Moore, M. J. Use of mesna to prevent ifosfamide-induced urotoxicity. *Support. Care Cancer* **1998**, *6*, 144-154.
- (314) Kupfer, A.; Aeschlimann, C.; Cerny, T. Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *50*, 249-252.
- (315) Scripture, C. D.; Sparreboom, A.; Figg, W. D. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 780-789.
- (316) Paci, A.; Guillaume, D.; Husson, H.-P. Synthesis of Side-chain-substituted Ifosfamide Analogs. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38*, 1131-1134.
- (317) Deroussent, A.; Rodriguez, S.; Martelli, S.; Seck, A.; Dubus-Daudigeos, E. et al. Quantification of dimethyl-ifosfamide and its N-deschloropropylated metabolites in mouse plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 743-750.
- (318) Hohorst, H. J.; Peter, G.; Struck, R. F. Synthesis of 4-hydroperoxy derivatives of ifosfamide and trofosfamide by direct ozonation and preliminary antitumor evaluation in vivo. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2278-2281.
- (319) Takamizawa, A.; Matsumoto, S.; Iwata, T.; Makino, I. Synthesis, Stereochemistry and Antitumor Activity of 4-Hydroperoxyisophosphamide (NSC-227114) and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 1877-1891.
- (320) Paci, A.; Martens, T.; Royer, J. Anodic oxidation of ifosfamide and cyclophosphamide: a biomimetic metabolism model of the oxazaphosphorinane anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1347-1349.
- (321) Storme, T. Résultats non publiés.
- (322) Fuhrhop, J. r.-H.; Wang, T. Bolaamphiphiles. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2901-2938.
- (323) Gambacorta, A.; Gliozzi, A.; Rosa, M. Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *11*, 115-131.
- (324) Sprott, G. Structures of archaebacterial membrane lipids. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; Springer New York, 1992; pp 555-566.
- (325) Muzzalupo, R.; Trombino, S.; Iemma, F.; Puoci, F.; La Mesa, C. et al. Preparation and characterization of bolaform surfactant vesicles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, *46*, 78-83.
- (326) Weissig, V.; Torchilin, V. P. Cationic bolasomes with delocalized charge centers as mitochondria-specific DNA delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *49*, 127-149.
- (327) Prata, C.; Mora, N.; Polidori, A.; Lacombe, J.-M.; Pucci, B. Synthesis and molecular aggregation of new sugar bola-amphiphiles. *Carbohydr. Res.* **1999**, *321*, 15-23.
- (328) Soussan, E.; Pasc-Banu, A.; Consola, S.; Labrot, T.; Perez, E. et al. New Catanionic Triblock Amphiphiles: Supramolecular Organization of a Sugar-Derived Bolaamphiphile Associated with Dicarboxylates. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2492-2494.
- (329) Ambrosi, M.; Fratini, E.; Alfredsson, V.; Ninham, B. W.; Giorgi, R. et al. Nanotubes from a Vitamin C-Based Bolaamphiphile. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7209-7214.
- (330) Jin, Y.; Ai, P.; Xin, R.; Tian, Y.; Dong, J. et al. Self-assembled drug delivery systems: Part 3. In vitro/in vivo studies of the self-assembled nanoparticulates of cholesteryl acyl didanosine. *Int. J. Pharm.* **2009**, *368*, 207-214.
- (331) Jin, Y.; Qi, N.; Tong, L.; Chen, D. Self-assembled drug delivery systems. Part 5: Self-assemblies of a bolaamphiphilic prodrug containing dual zidovudine. *Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 268-274.
- (332) Jin, Y.; Xin, R.; Ai, P.; Chen, D. Self-assembled drug delivery systems: 2. Cholesteryl derivatives of antiviral nucleoside analogues: Synthesis, properties and the vesicle formation. *Int. J. Pharm.* **2008**, *350*, 330-337.
- (333) Jin, Y.; Xin, R.; Tong, L.; Du, L.; Li, M. Combination Anti-HIV Therapy with the Self-Assemblies of an Asymmetric Bolaamphiphilic Zidovudine/Didanosine Prodrug. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 867-876.

- (334) Jin, Y.; Xing, L.; Tian, Y.; Li, M.; Gao, C. et al. Self-assembled drug delivery systems. Part 4. In vitro/in vivo studies of the self-assemblies of cholesteryl-phosphonyl zidovudine. *Int. J. Pharm.* **2009**, *381*, 40-48.
- (335) Hoshino, T.; Nakano, S.-i.; Kondo, T.; Sato, T.; Miyoshi, A. Squalene-hopene cyclase: final deprotonation reaction, conformational analysis for the cyclization of (3R,S)-2,3-oxidosqualene and further evidence for the requirement of an isopropylidene moiety both for initiation of the polycyclization cascade and for the formation of the 5-membered E-ring. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1456-1470.
- (336) Tian, J.; Stella, V. J. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: Epimerization. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 1224-1235.