



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation de prodrogues à espaceurs clivables : application à la chimiothérapie vectorisée du mélanome

Mathieu André

► **To cite this version:**

Mathieu André. Conception, synthèse et évaluation de prodrogues à espaceurs clivables : application à la chimiothérapie vectorisée du mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1MM13 . tel-01167790

HAL Id: tel-01167790

<https://theses.hal.science/tel-01167790>

Submitted on 24 Jun 2015

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.

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES FONDAMENTALES***

13-DOC

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité
Pharmacochimie

Soutenue le 23 Octobre 2012

ANDRE Mathieu

**Conception, synthèse et évaluation de prodrogues à espaceurs clivables :
application à la chimiothérapie vectorisée du mélanome**

Membres :

J.-M. Chezal, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

E. Mounetou, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

P. Chalard, Maître de Conférences, ENSCCF, Clermont-Ferrand.

Rapporteurs :

A. Boumendjel, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble.

I. Gillaizeau, Professeur, Université d'Orléans.

Laboratoire :

UMR 990 INSERM « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée »

Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand I

58, rue Montalembert, BP184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES FONDAMENTALES***

13-DOC

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité
Pharmacochimie

Soutenue le 23 Octobre 2012

ANDRE Mathieu

**Conception, synthèse et évaluation de prodrogues à espaceurs clivables :
application à la chimiothérapie vectorisée du mélanome**

Membres :

J.-M. Chezal, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

E. Mounetou, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

P. Chalard, Maître de Conférences, ENSCCF, Clermont-Ferrand.

Rapporteurs :

A. Boumendjel, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble.

I. Gillaizeau, Professeur, Université d'Orléans.

Laboratoire :

UMR 990 INSERM « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée »

Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand I

58, rue Montalembert, BP184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à M. Jean-Michel Chezal, Professeur à l'Université d'Auvergne et directeur de l'UMR 990, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire, ainsi que pour avoir codirigé ce travail durant ces quatre années. Je lui témoigne ici mon profond respect pour son investissement pour le laboratoire et sa passion pour la chimie organique.

Je remercie Mlle Emmanuelle Mounetou, Professeur à l'Université d'Auvergne, pour m'avoir encadré et pour son investissement, tout spécialement lors de la phase « terminale ».

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à M. Ahcène Boumendjel, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble et Mme Isabelle Gillaizeau, Professeur à l'Université d'Orléans pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également M. Pierre Chalard, enseignant-chercheur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, qui me fait l'honneur de siéger parmi les membres du jury de cette thèse, qui m'a toujours encouragé dans les moments de doute et qui m'a permis de m'engager sereinement dans cette thèse, très sincèrement merci. Trouvez ici le témoignage de mon plus profond respect.

Merci à l'ensemble des membres du Laboratoire de Chimie Analytique, dirigé par Madame Claire Lartigue, Professeur à l'Université d'Auvergne puis par Madame Bernadette Bouchon, Professeur à l'Université d'Auvergne, pour de nombreuses choses : (i) pour m'avoir accueilli avec une grande gentillesse dans la fonction d'ATER que j'ai occupée lors de cette dernière année, c'était un réel plaisir de travailler avec vous tous en tant qu'enseignant, dans la bonne humeur permanente, (ii) pour l'ensemble des évaluations (qui s'apparentaient plus à une course d'obstacles) réalisées au sein de leur laboratoire, un grand merci notamment aux deux Marie-Joe, Galmier et Couret, pour leur gentillesse permanente et leur investissement dans la thématique de mon sujet de thèse, (iii) pour les discussions passionnées et passionnantes, sur la science et sur le reste : un grand merci à toi, ô Grand Chamballah de la Chimie Analytique M. Sébastien Tarrit, pour ta patience, ta passion et ton expertise.

Sans biologistes, pas de biologie. Merci à Sophie Besse pour avoir réalisé les évaluations *in vivo* présentées dans ce manuscrit malgré un emploi du temps toujours plus chargé et à M. Eric Debiton, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, pour son implication, très bénéfique pour mon sujet nonobstant une sollicitation tardive.

Ma gratitude va également vers MM. Jean-Claude Teulade, chef de service du Laboratoire de Chimie Organique et Jacques Métin, chef de service du Laboratoire de Chimie Physique et Minérale, qui m'ont initié à l'enseignement lors de ma deuxième année de thèse.

Un grand merci aux « personnels de l'ombre » de l'unité pour leur gentillesse et leur bonne volonté permanente : Jacqueline Lefrançois pour l'administratif, Martine Bayle pour l'aide technique et Laurent Audin, plombier/électricien/informaticien/bricoleur en tout genre pour les nombreux services rendus.

A Yves Troin, professeur de l'ENSCCF, pour avoir été l'un des enseignants passionnés de l'ENSCCF qui m'ont donné la foi en la chimie organique.

Je remercie également très chaleureusement la famille Vidal, Aurélien et Latifa, Antoine Bussière, Zied Boudhra, Claire Denis et particulièrement Emilie Billaud, pour leur amitié qui m'a permis de surmonter les moments particulièrement difficiles. Merci encore, pour avoir été là quand il n'y avait personne d'autre et pour m'avoir rejoint sur ma planète.

Special thought for Tiffany, Californian girl for now, not geographically by my side at the moment but in my heart for a long time. See you soon babe, and give Flocky an itch for me !

Merci à la famille, pour le soutien indéfectible depuis ma naissance.

Une pensée aussi à ceux qui sont maintenant loin des yeux et même parfois loin des mots mais qui font partie de ma vie : dans le désordre, mon copain Manu, Angélique, Boris, Bastien, Pierre-Yves.

*« Mieux vaut mobiliser son intelligence sur des c***eries que mobiliser sa
c***erie sur des choses intelligentes »
— Devise Shadok*

*« Peu importe que le chat soit noir ou gris, l'important c'est qu'il attrape
les souris »
— Proverbe chinois*

*« L'imagination est plus importante que le savoir »
— Albert Einstein*

LISTE

DES

ABREVIATIONS

Liste des abréviations

5-FU : 5-fluorouracile	LDH : enzyme lactate déshydrogénase
Ac : acétyle	LG : leaving group
ACS : acide camphorsulfonique	ls : large singulet (spectral)
ADC : antibody-drug conjugate	m : multiplet (spectral)
ADEPT : antibody-directed enzyme prodrug therapy	MC1R : melanocortin-1 receptor
ADN : acide déoxyribonucléique	MDEPT : melanocyte-directed enzyme prodrug therapy
AG : activating group	MEM : minimum essential medium
AIC : 5-aminoimidazole-4-carboxamide	Ms : méthanesulfonyle
Bn : benzyle	α -MSH : melanocyte stimulating hormone α
Boc : <i>tert</i> -butoxycarbonyle	MTIC : 5-(3-méthyl-1-triazéno)imidazole-4-carboxamide
Bz : benzoyle	NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
CAT : chloramine T monohydratée	OEG : oligoéthylène glycol
CCM : chromatographie sur couche mince	PBS : phosphate buffer saline
CLHP : chromatographie liquide à haute performance	PEG : polyéthylène glycol
COSY : Correlation Spectroscopy	PEG ₄ : tétraéthylène glycol
d : doublet (spectral)	PEG ₆ : hexaéthylène glycol
Da : dalton	PEG ₈ : octaéthylène glycol
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	PEG ₁₀ : décaéthylène glycol
DCC : <i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide	PG : protecting group
dd : doublet dédoublé (spectral)	ppm : partie par million (déplacement chimique)
DIPEA : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	q : quadruplet (spectral)
DMAP : <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine	Q : quintuplet (spectral)
DMF : <i>N,N</i> -diméthylformamide	R _f : rapport frontal
DMSO : diméthylsulfoxyde	RMN : résonance magnétique nucléaire
DTIC : diméthyl-1-triazénoimidazole-4-carboxamide	s : singulet (spectral)
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	SE _{ar} : substitution électrophile aromatique
EMA : European Medicines Agency	SN : substitution nucléophile
EPR : enhanced permeability and retention	SVF : sérum de veau fœtal
ESI-SM : electrospray ionization mass spectrometry	t : triplet (spectral)
FDA : Food and Drug Administration	TA : température ambiante
FDG : 2-fluoro-2-déoxyglucose	TBAF : tetrabutylammonium fluoride
GSM : glandes sous-maxillaires	TBDMS : <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation	TBDPS : <i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
HMPA : poly- <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)méthacrylamide	td : triplet dédoublé (spectral)
HOBt : <i>N</i> -hydroxybenzotriazole	TDM : tomodensitomètre
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation	TEMP : tomographie par émission monophotonique
Hz : hertz	TEP : tomographie par émission de positons
IL-2 : interleukine-2	TFA : trifluoroacetic acid
IR : infrarouge	THF : tétrahydrofurane
IRM : imagerie par résonance magnétique	TIPS : triisopropylsilyle
IUdR : (+)-5-iodo-2'-déoxyuridine	Ts : <i>p</i> -toluènesulfonyle
JDE : jonction dermo-épidermique	UV : ultraviolet
JMOD : J -Modulated spin-echo	VEGF : vascular endothelial growth factor

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	3
BIBLIOGRAPHIE	5
CHAPITRE 1 - Le mélanome cutané	7
I. Cancer et mélanome, généralités	9
II. Epidémiologie	9
III. Facteurs de risque	10
CHAPITRE 2 - De la peau au mélanome	13
I. La peau	15
II. Mélanines et mélanogénèse	17
II.1. Tyrosinase et initiation de la biosynthèse des mélanines.....	17
II.2. Biosynthèse.....	18
II.3. Régulation de la mélanogénèse.....	19
II.4. Propriétés des mélanines.....	19
II.4.1. Photoprotection.....	19
II.4.2. Propriétés anti-oxydantes.....	20
II.4.3. Autres propriétés.....	20
II.4.4. Propriétés de détoxification.....	20
II.5. Mélanines et mélanogénèse, conclusions.....	21
III. Initiation et évolution de la pathologie	21
CHAPITRE 3 - Diagnostic, bilan d'extension et pronostic du mélanome	23
I. Examen dermatologique	25
II. Marqueurs biochimiques	25
III. Ganglion sentinelle	25
IV. Imagerie médicale	25
V. Analyse histologique, stadification et pronostic	26
VI. Diagnostic du mélanome : conclusions	27
CHAPITRE 4 - Thérapies du mélanome	29
I. Les traitements conventionnels	31
I.1. Exérèse chirurgicale.....	31
I.2. Radiothérapie.....	31
I.2.1. Radiothérapie interne.....	31
I.2.2. Brachythérapie.....	31
I.2.3. Radiothérapie externe.....	32
I.3. Thérapie adjuvante et immunothérapie.....	32
I.4. Chimiothérapie.....	33
I.4.1. Dacarbazine et témolozomide.....	33
I.4.2. Nitrosourées.....	34
I.4.3. Autres agents thérapeutiques.....	34
I.4.4. Polychimiothérapies.....	34
I.5. Immunochimiothérapies et biochimiothérapies.....	35
II. Les approches récentes	35
II.1. Anticorps et immunothérapie.....	35
II.2. Thérapies ciblées et inhibiteurs de kinases.....	36
II.2.1. Inhibiteurs de kinases.....	36
II.2.2. Autres approches.....	36
III. La thérapie du mélanome : conclusions	36

CHAPITRE 5 - Cibles et traceurs du mélanome	39
I. Définitions	41
II. Cible : les récepteurs sigma (σ)	41
III. Cible : les récepteurs MC1R	41
IV. Cible : les mélanines	42
IV.1. Benzamides et analogues : historique.....	43
IV.2. Benzamides et analogues : applications en chimiothérapie vectorisée.....	45
CHAPITRE 6 - Prodrogues et espaceurs clivables	47
I. Métabolisme des drogues	49
II. Les prodrogues	49
II.1. Amélioration de la solubilité	49
II.2. Amélioration de la stabilité	51
II.3. Amélioration du ciblage : prodrogues vectorisées	51
II.3.1. Vectorisation passive.....	51
II.3.2. Ciblage actif	52
II.4. Prodrogues à libération sélective.....	54
II.4.1. Libération enzymatique.....	54
II.4.2. Clivages fondés sur des paramètres physico-chimiques	55
II.5. Doubles prodrogues.....	57
III. Prodrogues et mélanome	59
RESULTATS ET DISCUSSIONS	61
CHAPITRE 1 - Objectifs de recherche	63
I. Objectifs généraux	65
II. Choix du vecteur	65
III. Choix du principe actif	65
III.1. Pré-requis	66
III.2. L'IUdR.....	66
III.3. Radioiodation de l'IUdR.....	67
III.3.1. Radioisotopes de l'iode.....	68
III.3.2. Radioiodation à l'iode 125	68
IV. L'espaceur clivable	69
IV.1. Espaceurs « classiques »	69
IV.2. Espaceurs auto-clivables.....	70
V. Démarches générales	70
CHAPITRE 2 - Prodrogues à espaceurs « classiques », première génération	73
I. Synthèses de la première génération de prodrogues	76
I.1. Synthèse des précurseurs communs.....	76
I.1.1. Protection de l'IUdR.....	76
I.1.2. Synthèse de l'amine secondaire 13 du vecteur ICF01012.....	81
I.2. Prodrogue « ester » 1	84
I.2.1. Rétrosynthèse.....	84
I.3. Prodrogue « acétal » 2	87
I.3.1. Rétrosynthèse.....	87
I.3.2. Synthèse de la prodrogue « acétal » 2	88
I.4. Prodrogues « carbamate » 3 et « carbonate » 4	90
I.4.1. Rétrosynthèse.....	90
I.4.2. Synthèse des prodrogues « carbamate » 3 et « carbonate » 4	90
I.5. Conclusions.....	93

II. Evaluation in vitro de la première génération de prodrogues	93
II.1. Stabilité physico-chimique	93
II.2. Stabilité métabolique	98
II.2.1. Prodrogue « acétal » 2	99
II.2.2. Prodrogue « carbamate » 3	100
II.2.3. Conclusions	101
III. Synthèse des précurseurs stannylés et radioiodations	101
III.1. Synthèse des précurseurs stannylés.....	102
III.1.1. « Acétal tributylstannyle » 30	102
III.1.2. « Carbamate tributylstannyle » 31	104
III.2. Radioiodations	105
III.2.1. Mise au point de la radioiodation.....	105
III.2.2. Synthèse de la prodrogue « acétal » [¹²⁵ I] 2	108
III.2.3. Synthèse de la prodrogue « carbamate » [¹²⁵ I] 3	108
IV. Evaluation in vivo	108
IV.1. Prodrogue « acétal » [¹²⁵ I] 2	109
IV.2. Prodrogue « carbamate » [¹²⁵ I] 3	110
IV.3. Discussion et conclusions	111
 CHAPITRE 3 - Prodrogues à espaceurs « classiques », deuxième génération	113
I. Synthèses de la deuxième génération de prodrogues	115
I.1. Prodrogues « ester diméthyle ».....	116
I.1.1. Rétrosynthèse.....	116
I.1.2. Synthèse.....	116
I.2. Prodrogue « cétal » 40	122
I.2.1. Rétrosynthèse.....	122
I.2.2. Synthèse du précurseur vinylique.....	123
I.2.3. Méthodologie.....	124
I.2.4. Synthèse de la prodrogue « cétal » 40	128
I.3. Prodrogues « acétal pegylé » 41 et 42	129
I.3.1. Rétrosynthèse.....	129
I.3.2. Synthèse des OEG - éther de vinyle	130
I.3.3. Synthèse des prodrogues « acétal pegylé » 41 et 42	132
I.4. Conclusions.....	134
II. Evaluations in vitro de la deuxième génération de prodrogues	135
II.1. Stabilité physico-chimique	135
II.2. Stabilité métabolique	136
II.2.1. Prodrogue « acétal PEG ₆ » 41	136
II.2.2. Prodrogue « acétal PEG ₁₀ » 42	138
II.2.3. Conclusions	138
III. Synthèse des précurseurs stannylés et radioiodations	139
III.1. Synthèse des précurseurs stannylés.....	139
III.2. Radioiodations	142
III.2.1. Synthèse de la prodrogue « acétal PEG ₆ » [¹²⁵ I] 41	142
III.2.2. Synthèse de la prodrogue « acétal PEG ₁₀ » [¹²⁵ I] 42	142
IV. Evaluations in vivo	142
IV.1. Prodrogue « acétal PEG ₆ » [¹²⁵ I] 41	143
IV.2. Prodrogue « acétal PEG ₁₀ » [¹²⁵ I] 42	144
IV.3. Discussion.....	146

CHAPITRE 4 - Prodrogues activées par la tyrosinase et espaceurs auto-clivables	147
I. Synthèse des précurseurs communs	151
I.1. Partie substrat de la tyrosinase.....	151
I.2. Partie sonde.....	152
I.3. Partie espaceur	152
I.3.1. Espaceur aliphatique (libération par cyclisation intramoléculaire)	153
I.3.2. Espaceurs benzyliques (libération par éliminations 1,4 et 1,6)	153
I.3.3. Espaceur cinnamique (libération par élimination 1,8).....	154
II. Synthèse des prosondes	155
II.1. Prosondes 114 et 115 comportant un espaceur aliphatique.....	156
II.2. Prosondes 122 et 123 comportant un espaceur benzylique (élimination 1,4).....	157
II.3. Prosondes 130 et 131 comportant un espaceur benzylique (élimination 1,6).....	158
II.4. Prosondes 138 et 139 comportant un espaceur cinnamique.....	159
II.5. Synthèse de la prosonde couplée au vecteur	160
II.5.1. Rétrosynthèse	160
II.5.2. Synthèse.....	161
II.6. Conclusions sur la synthèse des prosondes	165
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	167
PARTIE EXPERIMENTALE	173
MATERIELS ET METHODES	175
MODES OPERATOIRES	183
BIBLIOGRAPHIE	271

INTRODUCTION

Les cancers représentent depuis 2004 la première cause de mortalité dans le monde, dépassant même les maladies cardio-vasculaires. Depuis une dizaine d'années, la plupart de ces pathologies voient leur incidence et leur mortalité en stabilisation voire en baisse, grâce à des détections plus précoces et des traitements plus efficaces. Le mélanome, responsable à lui seul de la plus grande part de la mortalité due aux cancers cutanés, échappe à cette tendance. Son incidence reste en constante augmentation dans les pays industrialisés, où les populations sont essentiellement de race caucasienne.

Cette pathologie se développant à partir des mélanocytes présente un important pouvoir invasif. Pour les stades avancés, la médiane de survie est très basse, et la découverte de nouveaux traitements efficaces s'est longtemps faite attendre avant la mise sur le marché du Vemurafenib et de l'Ipilimumab (respectivement inhibiteur de kinase BRAf mutée et anticorps monoclonal anti-CTLA4), la chimiothérapie à base de dacarbazine était le seul traitement validé depuis plus de trente ans et souffrait d'un large manque de spécificité.

Depuis des années, les travaux des équipes de l'Unité Mixte de Recherche 990 INSERM / Université d'Auvergne se focalisent sur le diagnostic et le traitement des pathologies articulaires et du mélanome. Ainsi, des molécules de type iodobenzamide (présentant une fixation et une affinité spécifique aux mélanines, macromolécules pigmentées) ont été découvertes et développées comme radiotraceurs pour l'imagerie scintigraphique de patients atteints du mélanome.

Dans le but de développer des stratégies thérapeutiques efficaces pour lutter contre cette pathologie, le laboratoire a initié une étude basée sur l'utilisation de ces traceurs afin d'adresser de manière plus spécifique des principes actifs anticancéreux et ainsi d'améliorer leur index thérapeutique. Distribuer sélectivement un principe actif au niveau tumoral permettrait de réduire les effets secondaires en épargnant au maximum les tissus non cibles, permettant ainsi de diminuer les doses délivrées tout en augmentant leur efficacité. Cette approche est basée sur la conception de prodrogues vectorisées vers le mélanome comportant un espaceur clivable susceptible de libérer un principe actif une fois la cible tumorale atteinte. Ces prodrogues sont constituées par une structure vectrice, un principe actif anticancéreux et un espaceur clivable. L'activation de la prodrogue est envisagée selon différents modes : effet du pH intramélanosomal acide ou encore action d'enzymes ubiquitaires, et également spécifiques telles que la tyrosinase, enzyme-clé de la mélanogénèse.

La première partie de ce manuscrit présente une synthèse bibliographique de l'état des connaissances biomédicales sur le mélanome et principalement sur les aspects épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques. Ce chapitre est suivi par un aperçu de quelques découvertes représentatives en matière de conception et d'utilisation de prodrogues vectorisées.

La deuxième partie est consacrée à la description des travaux réalisés pendant ma thèse avec, d'une part, la synthèse de prodrogues vectorisées à espaceurs « classiques » suivie de leurs évaluations *in vitro* et *in vivo*, et d'autre part, la synthèse d'espaceurs auto-clivables originaux susceptibles d'être activés par la tyrosinase.

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 1

Le mélanome cutané

I. Cancer et mélanome, généralités

Tel qu'annoncé en introduction, le cancer est une maladie constituant l'une des principales causes de décès dans le monde, dépassant même depuis le début des années 2000 les maladies cardiovasculaires ^[1]. Ces données ne doivent pas masquer les importants progrès réalisés (campagnes de prévention, diagnostics précoces, thérapies ciblées,...) qui ont permis de diminuer de façon notable le taux de mortalité global des cancers. Cependant, quelques cancers, dont le mélanome cutané, font cependant exception à cette tendance générale.

Le mélanome est un des trois principaux cancers de la peau avec le carcinome basocellulaire et le carcinome spinocellulaire. Les carcinomes basocellulaires (kératinocytes basaux), quatre fois plus fréquents que les carcinomes spinocellulaires (cellules squameuses), présentent un faible pouvoir invasif et sont donc en règle générale traités avec succès. La dissémination des carcinomes spinocellulaires peut survenir, mais de manière très modérée : de 1 à 10 % des cas seraient concernés ^[2]. Les carcinomes cutanés sont donc en général très bien traités par exérèse chirurgicale et ne sont responsables que d'une faible mortalité.

Le mélanome quant à lui est un cancer se développant à partir des mélanocytes, cellules de la peau responsables de la synthèse de la mélanine. Il se propage donc très majoritairement à partir de la peau mais peut se rencontrer dans d'autres organes pigmentés contenant des mélanocytes, tels les yeux et les muqueuses. Son occurrence est relativement faible : il ne représente en effet que 4 % des cancers cutanés, mais son très fort caractère invasif conduit à une mortalité beaucoup plus importante que les autres pathologies de la peau (80 % des décès) ^[3].

L'objet du travail bibliographique qui suit est de mieux comprendre ce dernier chiffre. Qui est touché par le mélanome ? Pourquoi ? Comment cette maladie se développe t-elle et quelles sont les options diagnostiques et thérapeutiques à disposition des cliniciens ?

II. Épidémiologie

Le mélanome est l'un des cancers dont l'incidence a le plus augmenté lors des dernières décennies. Dans le monde, les plus fortes incidences sont relevées en Australie et en Nouvelle-Zélande : de 30 cas / 10⁵ / an en Australie et d'environ 33 cas / 10⁵ / an en Nouvelle-Zélande, avec un pic à 55,8 / 10⁵ / an chez l'homme, 41,1 / 10⁵ / an chez la femme sur la période 1998-2002 dans la province du Queensland (Australie). Aux Etats-Unis, cette pathologie représente le 6e cancer le plus diagnostiqué ^[4] : 68130 nouveaux cas ont été détectés en 2010 ^[1] alors qu'une estimation sur l'année 2012 en prévoit 76250 ^[5], ce qui représenterait une augmentation de près de 12 % en deux ans. Elle est également forte pour les populations d'Europe du Nord, notamment scandinaves, avec environ 12 cas / 10⁵ / an de 1998 à 2002 ^[6]. Sur la France entière, l'incidence standardisée a évolué de 2,4 / 10⁵ en 1980 à 7,6 / 10⁵ / an en 2005 ^[7], la région la plus touchée étant l'Alsace : de 4,2 / 10⁵ / an en 1980 à 13 / 10⁵ / an en 2001 dans le Haut-Rhin ^[8].

[1] Jemal A. *et al.*, Cancer statistics, 2010. *Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 277-300

[2] Madan V. *et al.*, Non-melanoma skin cancer. *Lancet* **2010**, *375*, 673-685

[3] Miller A. J. *et al.*, Melanoma. *New Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 51-65

[4] Macdonald J. B., Malignant melanoma in the elderly: different regional disease and poorer prognosis. *J. Cancer* **2011**, *2*, 538-543

[5] *Cancer Facts and Figures 2012*

[6] MacKie R. M. *et al.*, Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, vi1-vi7

[7] Belot A. *et al.*, Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epidemiol. Sante* **2008**, *56*, 159-175

[8] Lipsker D. *et al.*, Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *157*, 338-343

Bien qu'en constante augmentation depuis plusieurs décennies, l'évolution du taux de mortalité ne suit cependant pas la même tendance que l'incidence. Par exemple, celle-ci a été multipliée par 5 aux Etats-Unis entre 1950 et 1990 tandis que la mortalité durant la même période a à peine doublé [9]. Des observations similaires ont été relevées en Europe [10]. Cette différence peut être mise au crédit des campagnes de sensibilisation qui ont permis d'améliorer la prise en charge précoce du mélanome. En effet, la survie à 5 ans pour le stade I (les différents stades du mélanome seront explicités plus loin dans ce manuscrit) de la maladie est de 98 %, 61 % au stade II tandis qu'au stade disséminé elle chute à moins de 15 % [5]. La mortalité est donc corrélée à l'absence de thérapies efficaces face à la maladie disséminée, principal facteur de mortalité, et ce malgré les efforts consentis par les chercheurs de toutes disciplines depuis 40 ans dans le développement de nouvelles prises en charge thérapeutiques du mélanome métastasé.

III. Facteurs de risque

Une étude récente estime que le risque moyen sur une vie pour un Nord-Américain de contracter un mélanome invasif était de 1/58 en 2009, projeté à 1/50 en 2015 alors qu'il était de 1/600 en 1950 [11]. Ce risque considérablement accru semble principalement dû au changement de mode de vie des populations caucasiennes concentrées majoritairement dans les pays développés. En effet, au cours du XXe siècle, l'instauration des congés payés et l'évolution technologique rapide des moyens de transport ont permis une exposition au soleil récréative beaucoup plus importante. Cependant, les mécanismes plurifactoriels conduisant au développement des mélanomes restent aujourd'hui encore objets de débat.

Il est reconnu que l'exposition intense et répétée aux rayonnements UV (incluant les irradiations en cabine) est l'un des facteurs de risque majeurs [12]. En effet, ces rayonnements causent des dommages cellulaires ou des mutations pouvant mener au processus d'apoptose (mort cellulaire programmée) mais dans certains cas, les mutations induites conduisent à une multiplication anarchique et incontrôlable des cellules endommagées, qui forment ensuite des tumeurs. De ce fait, la modification des modes de vie occidentaux au cours du XXe siècle et l'installation de la mode du bronzage pourraient expliquer l'envolée de l'incidence au cours du siècle dernier. Si plusieurs études épidémiologiques semblent effectivement indiquer une corrélation de la durée totale d'exposition et du nombre de coups de soleil (notamment durant l'enfance) avec l'augmentation du risque de contracter un mélanome [13], cette hypothèse reste sujet à débats. En effet, la distribution anatomique des mélanomes n'est que partiellement corrélée aux zones les plus exposées (seulement 10 à 15 % au niveau de la nuque et du visage) et l'âge moyen des cas déclarés se situe au milieu de l'espérance de vie, et non à la fin, moment où l'exposition cumulée au soleil est la plus importante [14].

[9] Whiteman D. *et al.*, Epidemiology of malignant melanoma. *Skin Cancer - A World-Wide Perspective* **2011**, 13-26

[10] Jemal A. *et al.*, Cancer surveillance series: changing patterns of cutaneous malignant melanoma mortality rates among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 811-818

[11] Darrell S. R., Epidemiology of melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2010**, *29*, 204-209

[12] Gandini S. *et al.*, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 45-60

[13] Margaret A. T., Melanoma epidemiology. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2009**, *23*, 383-395

[14] Garbe C. *et al.*, Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 3-9

Le phototype qui définit les différentes caractéristiques de la peau (couleur, sensibilité au soleil) joue également un rôle essentiel : les individus caucasiens à peau claire ou très claire, blond ou roux (phototype I) et qui présentent des taches de rousseur constituent l'essentiel des populations touchées ^[15]. Certaines variations du gène MC1R (responsable notamment de la diversité pigmentaire et qui définit en partie les phototypes) associées à d'autres mutations semblent également avoir une influence sur le risque ^[16], tout comme la présence d'un nombre important de *nævi* ^[17].

Des récurrences familiales ayant également été observées pour environ 10 % des cas ^[18], différents facteurs génétiques ont été étudiés. Ces travaux ont conduit à l'identification de deux gènes dont les mutations sembleraient jouer un rôle important dans le développement du mélanome : CDKN2A et CDK4 (dont la fréquence de mutations est beaucoup plus faible).

D'autres facteurs plus marginaux, environnementaux principalement, ont également été soutenus : les expositions chroniques aux pesticides ^[19], à l'arsenic ^[20], aux composés aromatiques polychlorés ^[21] ou encore à certains champs électromagnétiques ^[22] ont ainsi été reliées à l'incidence.

Comme nous venons de le voir, les populations dites « à risque » sont clairement identifiées. Ceci répond à la question « qui ? » posée en introduction de ce chapitre. En revanche, le « pourquoi ? » est une question qui reste en suspens. Des pistes existent mais de nombreuses incertitudes demeurent, probablement en raison du caractère multifactoriel à l'origine de la plupart des cancers. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons au développement de la maladie, en nous focalisant sur les mélanomes cutanés afin de tenter d'apporter une réponse à la question « comment le mélanome se développe-t-il ? ».

[15] Gandini S. *et al.*, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2040-2059

[16] Fargnoli M. C. *et al.*, MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1413-1420

[17] Berwick M., Melanoma epidemiology. *Melanoma Development* **2011**, 35-55

[18] Sekulic A. *et al.*, Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83*, 825-846

[19] Dennis L. K. *et al.*, Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 812-817

[20] Beane Freeman L. E. *et al.*, Toenail arsenic content and cutaneous melanoma in Iowa. *Am. J. Epidemiol.* **2004**, *160*, 679-687

[21] Gallagher R. P. *et al.*, Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 1872-1880

[22] Hallberg Ö. *et al.*, Malignant melanoma of the skin – not a sunshine story ! *Med. Sci. Monit.* **2004**, *10*, 336-340

CHAPITRE 2

De la peau au mélanome

Depuis quelques années, la compréhension des mécanismes conduisant au développement d'un mélanome cutané a grandement été améliorée. Des études méta-analytiques reliant divers paramètres tels que les variations de l'incidence, les distributions anatomiques, l'évolution des pathologies, les différentes mutations et variations génétiques, le type de mélanocytes anormaux (épithéliaux ou non), l'âge des individus lors de la déclaration de la pathologie ou bien encore les radiations UV, ont permis d'établir plusieurs sous-catégories de mélanome [8],[23]. Parmi celles-ci, les deux plus importantes proviennent d'une prolifération aberrante de mélanocytes épithéliaux d'origine cutanée.

I. La peau

Il s'agit de l'organe le plus étendu du corps humain et en constitue la surface externe. La peau possède de nombreuses fonctions indispensables au bon fonctionnement de l'organisme, agissant notamment comme une barrière protectrice contre toutes sortes d'agressions (espèces chimiques, rayonnements, virus, bactéries,...) et comme récepteur sensoriel. Elle joue également un rôle dans la régulation de la température interne et dans la synthèse de la vitamine D.

Sa structure se compose de trois couches successives : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**).

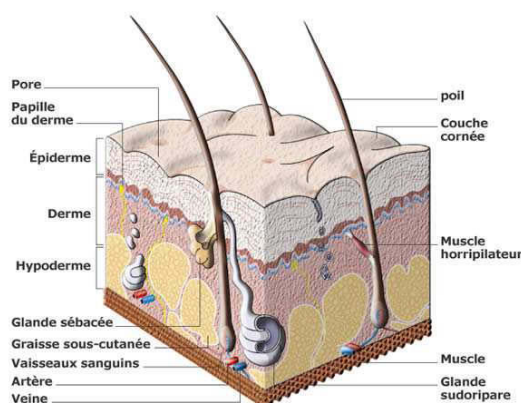


Figure 1 : Représentation schématique en coupe de la peau [24]

➤ L'hypoderme est la couche profonde, c'est un tissu adipeux fortement vascularisé, majoritairement impliqué dans la régulation de la température du corps et dans la protection des autres couches de la peau.

➤ Le derme est un tissu conjonctif qui constitue une couche de soutien de l'épiderme et accueille la base des systèmes pileux et les glandes sudoripares. Il est formé par un réseau composé notamment de collagène, de fibres élastiques, de fibroblastes et de vaisseaux sanguins. Le derme et l'épiderme sont reliés par une lame basale appelée jonction dermoépidermique (JDE) constituée d'un mélange de protéoglycanes, de collagène et de glycoprotéines synthétisés par les kératinocytes de la couche basale et les fibroblastes de la couche supérieure du derme. Elle est indispensable à l'association entre les deux couches, les maintenant solidaires et permettant les différents échanges entre derme et épiderme.

➤ L'épiderme constitue la surface externe de la peau. Elle est constituée principalement de kératinocytes (à 90 %), mais aussi de mélanocytes et de cellules de Langerhans (**Figure 2**).

[23] Raposo G. *et al.*, Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, 786-797

[24] http://arts-plastiques.ac-rouen.fr/rue_evreux/seconde_peau/seconde_peau.html

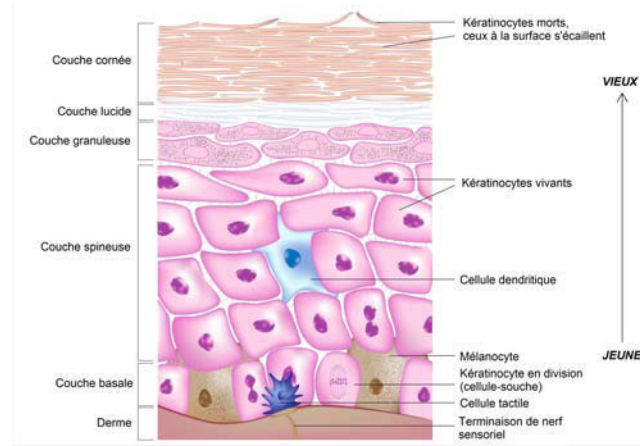


Figure 2 : Structure de l'épiderme [25]

- Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont répartis uniformément le long de la JDE et se multiplient verticalement pour constituer une couche. Ils se différencient ensuite au cours du temps pour former la couche spinuse puis la couche granuleuse et au final la couche cornée, constituée de kératinocytes morts (cornéocytes) qui se détachent en atteignant la surface externe. Le renouvellement complet des kératinocytes et donc de l'épiderme dure en moyenne quatre semaines chez l'homme.

- Les mélanocytes sont répartis régulièrement au sein de la couche basale et sont en contact par leurs prolongements (dendrites) avec les kératinocytes, formant une unité épidermique de mélanisation. Les mélanocytes produisent la mélanine, principal pigment naturel de la peau. Elle est synthétisée et stockée dans des organelles appelés mélanosomes, probablement dérivés des lysosomes, qui présentent une évolution selon quatre stades de maturation distincts (Figure 3) :

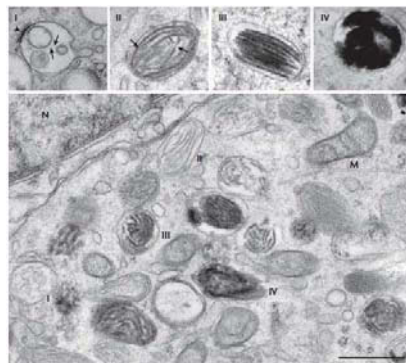


Figure 3 : Les quatre stades de développement des mélanosomes vus par microscopie électronique [23]

Lors des deux premiers stades, aucun pigment n'est présent mais l'organelle se transforme avec l'apparition de fibrilles. La géométrie du mélanosome devient alors ellipsoïdale. Lorsque les fibrilles sont complètement formés, la synthèse de la mélanine débute. Les fibrilles accueillent la mélanine synthétisée, épaississant et assombrissant les mélanosomes en stade III, jusqu'à maturation complète en stade IV pour lequel la structure interne est masquée par les amas sombres de mélanine. Le pH intramélanosomal varie au cours du temps et joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des mélanines et la maturation des organelles, que nous détaillerons plus loin. Les dendrites se développent verticalement vers la surface externe de la peau et horizontalement afin d'entrer en contact avec les kératinocytes voisins. Ils stockent les mélanosomes matures dans

[25] <http://www.dreamstime.com/stock-photos-anatomy-of-the-epidermis-of-the-skin-image18337183>.

leurs extrémités puis les transfèrent aux kératinocytes pour entourer le noyau cellulaire et jouer leur rôle photoprotecteur [26]. Ce transfert s'opère par différents mécanismes en grande partie non totalement résolus [27],[28]. Le processus de synthèse de la mélanine et de transfert des mélanosomes aux kératinocytes est appelé mélanogénèse.

II. Mélanines et mélanogénèse

On distingue trois types de mélanines différentes : les eumélanines, les phæomélanines et les neuromélanines. Les neuromélanines sont rencontrées dans la substance noire du cerveau, mais leur synthèse et leur rôle sont encore très mal compris [29],[30].

➤ Les eumélanines (pigments brun-noir) et les phæomélanines (pigments jaune-rouge) sont les pigments produits par les mélanocytes. Cette production se déroule au sein des mélanosomes afin de prévenir toute action néfaste des intermédiaires toxiques de la biosynthèse sur le cytoplasme ou l'appareil génétique des mélanocytes. Cette phase appelée mélanogénèse met en jeu un grand nombre d'enzymes, dont trois ont été identifiées en tant qu'enzymes clés pour son initiation : la phénylalanine hydroxylase, la tyrosine hydroxylase et la tyrosinase [31].

II.1. Tyrosinase et initiation de la biosynthèse des mélanines

La première étape de la biosynthèse des mélanines repose sur l'oxydation de la L-tyrosine en L-dopa (3,4-dihydroxyphénylalanine) puis en dopaquinone (**Schéma 1**).

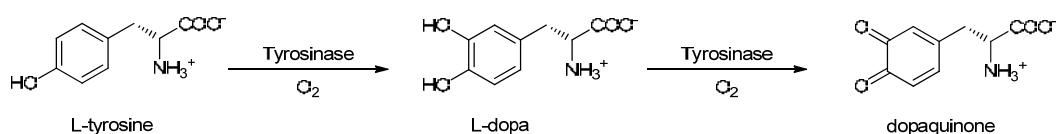


Schéma 1 : Actions de la tyrosinase sur son substrat naturel

Cette étape est commune pour tous les types de mélanine et l'enzyme réalisant cette réaction est la tyrosinase. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire des mélanosomes présentant un site actif intramélanosomal binucléaire comprenant deux atomes de cuivre chélatés par les atomes d'azote de six résidus histidine [32]. Elle existe sous trois formes : *met*-tyrosinase (forme inactive), *deoxy*-tyrosinase et *oxy*-tyrosinase (**Schéma 2**). C'est cette dernière forme, de complexée par du dioxygène qui est capable d'oxyder les phénols en catéchols puis les catéchols en *o*-quinones.

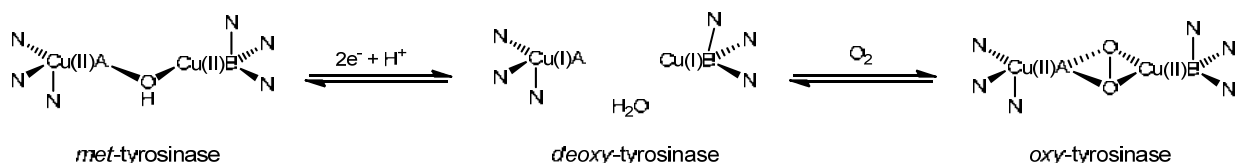


Schéma 2 : Equilibres entre les différentes formes de la tyrosinase

[26] Lin J. Y. *et al.*, Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **2007**, *445*, 843-850

[27] Bahadoran P. *et al.*, Que trafiquent les mélanosomes ? *Medecine / Sciences* **2002**, *18*, 205-209

[28] Wasmeier C. *et al.*, Melanosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3995-3999

[29] Slipicevic A. *et al.*, Narrowing the knowledge gaps for melanoma. *Uppsala J. Med. Sci.* **2012**, *0*, 1-7

[30] Zecca L. *et al.*, Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol. Pathol.* **2001**, *54*, 414-418

[31] Bruno J.R.N., A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory. *Med. Hypotheses* **2005**, *65*, 791-796

[32] Schallreuter K. U. *et al.*, Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 395-404

Les trois espèces chimiques décrites plus haut doivent être présentes pour initier le cycle catalytique de la tyrosinase : les atomes de cuivre de la forme native (la *met*-tyrosinase) doivent être réduits pour générer la *deoxy*-tyrosinase qui capte rapidement une molécule de dioxygène. La forme *oxy* ainsi générée, la L-tyrosine peut être oxydée en L-dopa puis en dopaquinone. Cependant, la réduction de la *met*-tyrosinase en *deoxy*-tyrosinase nécessite la présence d'un activateur tel que la L-dopa^[33]. Celle-ci ne pouvant provenir de l'action de la tyrosinase encore inactive, c'est une autre enzyme (la tyrosinase hydroxylase) qui intervient afin de produire de petites quantités de L-dopa, suffisantes pour activer la *met*-tyrosinase en *deoxy*-tyrosinase.

II.2. Biosynthèse

Les mélanines résultent ensuite d'une série de réactions, principalement non enzymatiques, basées sur la réactivité de la dopaquinone, sensible aux attaques nucléophiles : c'est un accepteur de Michael (**Schéma 3**).

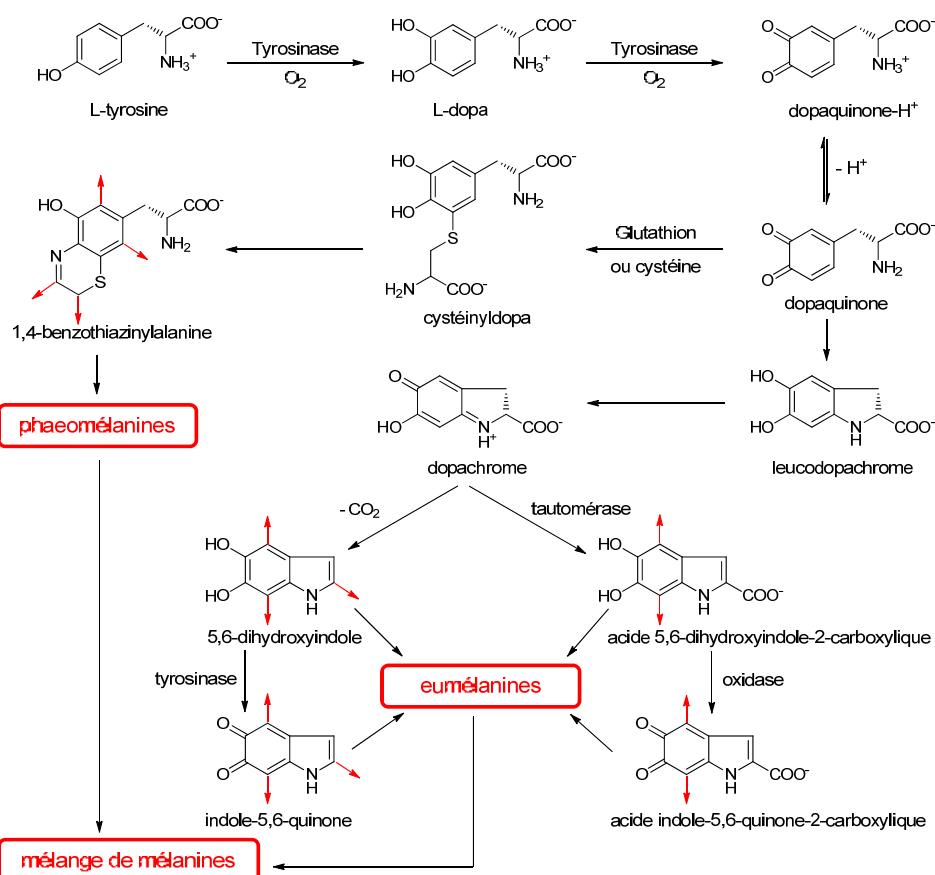


Schéma 3 : Biosynthèse des mélanines

La voie conduisant aux phaeomélanines fait intervenir un résidu sulfuré (glutathion ou cystéine) puis une cyclisation intramoléculaire qui génère une sous-unité de type benzothiazyle. Les eumélanines, proviennent de la cyclisation intramoléculaire de la dopaquinone en leucodopachrome qui se réarrange spontanément par tautomérisation en dopachrome. La décarboxylation de ce dernier conduit à une sous-unité dihydroxyindole, qui peut polymériser mais également subir une oxydation supplémentaire et former les sous-unités de type indole-quinone. Le dopachrome peut également subir l'action d'une tautomérisation et être ainsi transformé en sous-unité de type acide dihydroxyindole-2-carboxylique pouvant conduire à une sous-unité acide indole-quinone-2-carboxylique.

[33] Land E. J. *et al.*, Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 300-308

Les flèches rouges symbolisent les différentes positions de polymérisation sur lesquelles peuvent se greffer d'autres monomères. Cinq sous-unités différentes sont disponibles et chacune dispose de plusieurs sites de polymérisation. Les polymères formés sont donc irréguliers, non linéaires et de compositions complexes. Selon la concentration en composés soufrés (principalement la cystéine), la synthèse sera orientée vers la production d'eumélanine ou de phæomélanine. Aux faibles concentrations, l'équilibre est orienté vers la voie intramoléculaire et donc vers la synthèse d'eumélanines. Si un apport de cystéine est fait durant la synthèse, une co-polymérisation peut être observée^[34], de même qu'après la synthèse.

II.3. Régulation de la mélanogénèse

Ce n'est pas la quantité totale de mélanines, mais la proportion des deux types de mélanines et des différents co-polymères qui est responsable de la pigmentation propre à un individu. La gestion du ratio eumélanines / phæomélanines est très complexe et fait intervenir différentes entités : récepteurs, facteurs de transcription, pH intramélanosomal,... L'un des principaux régulateurs est l'hormone α -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone α), agoniste du récepteur MC1R^[35]. Il a également été montré que le cofacteur 6BH₄ joue un rôle précoce puisque associé à l'activité des enzymes tyrosine hydroxylase et phénylalanine hydroxylase^[36]. La concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène semble également avoir une importance capitale sur la biologie des mélanocytes donc sur la biosynthèse des mélanines^[31].

L'augmentation progressive du pH intramélanosomal semblerait être reliée à l'initiation de la biosynthèse : il a été constaté qu'au stade prémélanosomal, le pH se situe aux alentours de 5 pour atteindre une valeur de 6,8 au stade IV et il a été démontré que le pH optimal pour l'activité de la tyrosinase se situe vers la neutralité^[37]. Une étude portant sur tous les phototypes de peau a montré une différence entre les mélanocytes caucasiens et noirs confirme cette influence : le pH des mélanocytes noirs est plus proche de la neutralité que celui des caucasiens, favorisant ainsi la mélanogénèse et accélérant la maturation des mélanosomes^[38].

II.4. Propriétés des mélanines

Nous avons vu que la structure et la composition des mélanines, ainsi que la teneur du mélange entre eumélanines et phæomélanines conduisent à la pigmentation propre à un individu. Le hasard n'ayant pas sa place dans la nature, la grande hétérogénéité des polymères amorphes de mélanines semblant *a priori* anarchique et désordonnée confère en fait à l'ensemble du système robustesse et stabilité^[39], et est à l'origine de propriétés remarquables au-delà des propriétés optiques reconnues.

II.4.1. Photoprotection

Comme il a été écrit précédemment, le rôle principal des mélanines est de protéger le noyau des kératinocytes des rayonnements ultraviolets. Le grand nombre d'unités aromatiques lui confèrent une absorption sur l'ensemble du domaine UV, et la polyconjugaison ainsi que les phénomènes d'empilement

[34] Olivares C. *et al.*, Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* **2002**, *41*, 679-686

[35] Furumura M. *et al.*, Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7374-7378

[36] Ito S. *et al.*, Chemistry of mixed melanogenesis - pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582-592

[37] Karin U. S., Advances in melanocyte basic science research. *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 283-291

[38] Schallreuter K. U. *et al.*, Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **1994**, *263*, 1444-1446

[39] Ancans J. *et al.*, Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phæomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **2001**, *268*, 26-35

π - π étendent l'absorption dans les gammes du visible et du proche infrarouge. Il est à noter que l'énergie des photons absorbés par les eumélanines est libérée de manière non radiative par conversion en chaleur^[40].

En revanche, l'irradiation des phæomélanines conduit à leur destruction et à la production d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène. Ces derniers peuvent induire l'apoptose et pourraient même contribuer au vieillissement et à la carcinogenèse^[41]. Ces propriétés sont à l'origine des nombreux problèmes cutanés rencontrés par les individus roux, pour lesquels le taux de phæomélanines est plus élevé.

II.4.2. Propriétés anti-oxydantes

Les propriétés anti-oxydantes des eumélanines leurs sont conférées par les réactivités d'oxydoréduction propres aux quinones. La conjugaison confère une grande stabilité aux oligomères de quinones et d'hydroquinones par rapport aux sous-unités libres. Ainsi, un grand nombre d'espèces oxydantes (radicaux hydroxyles, radicaux libres, oxygène singulet) peuvent être réduites ou piégées par les eumélanines. L'équilibre entre les formes quinones et catéchols permet également de piéger des ions métalliques multivalents.

La dégradation des phæomélanines et la production de peroxyde d'hydrogène qui en découle sont en revanche à l'origine de propriétés pro-oxydantes, comme décrit précédemment.

II.4.3. Autres propriétés

Au-delà des caractéristiques majeures précédemment décrites, il a été montré que les mélanines se comportent comme des échangeurs d'ions. Elles possèdent également des propriétés électromagnétiques : paramagnétisme, conductivité électrique (l'eumélanine a été décrite comme un semi-conducteur amorphe) ou encore photoconductivité^[42].

II.4.4. Propriétés de détoxification

De par leurs structures, de nombreux composés : aromatiques, polyaromatiques, aminés ou bien encore métalliques possèdent une affinité pour les mélanines.

Parmi ceux-ci, divers agents thérapeutiques (quinine, chlorpromazine, halopéridol,...) sont connus pour se lier fortement avec la mélanine^[43]. Un grand nombre de composés tels que les pesticides, les alcaloïdes ou les colorants peuvent également être retenus durablement par les pigments mélaniques. Comme évoqué précédemment, les amines et polyamines aliphatiques présentent une affinité pour la mélanine : elles sont protonées à pH physiologique et peuvent ainsi partager des liaisons ioniques fortes avec les groupements carboxylates présents dans la structure polymérique.

Ces propriétés sont à double tranchant : on peut effectivement considérer que la mélanine joue un rôle de filtre chimique, protégeant ainsi les cellules de la peau d'agressions exogènes, mais il a également été montré que certains composés cytotoxiques pouvaient conduire à la carcinogenèse du fait de leur rétention longue au niveau des mélanocytes^[44]. Ce phénomène de séquestration peut être cependant mis à profit dans le cadre d'une vectorisation, tant dans un but diagnostique que thérapeutique. Cette application est abordée au sein du chapitre 5.

[40] Fuller B. B. *et al.*, Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp. Cell Res.* **2001**, *262*, 197-208

[41] Meredith P. *et al.*, Towards structure-property-function relationships for eumelanin. *Soft Matter* **2006**, *2*, 37-44

[42] Meredith P. *et al.*, The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigm. Cell Res.* **2006**, *19*, 572-594

[43] Ings R. M. J., The melanin binding of drugs and its implications. *Drug Metab. Rev.* **1984**, *15*, 1183-1212

[44] Larsson B. S., Interaction between chemicals and melanin. *Pigm. Cell Res.* **1993**, *6*, 127-133

II.5. Mélanines et mélanogenèse, conclusions

La biosynthèse des mélanines est un phénomène hautement complexe dont les mécanismes n'ont pas encore été totalement élucidés. Les pigments qui en résultent sont des polymères amorphes, hétérogènes, partiellement oxydés et variables d'un individu à l'autre.

On comprend alors aisément qu'il est extrêmement difficile de produire une mélanine synthétique mimant parfaitement les propriétés des pigments naturels afin d'élaborer un modèle satisfaisant pour le développement et l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques. A l'heure actuelle, le modèle le plus étudié résulte de la polymérisation de l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique, qui mime partiellement les eumélanines.

III. Initiation et évolution de la pathologie

Le mélanome provient de la transformation de mélanocytes normaux en cellules malignes. Cette transformation, décrite selon le modèle de Clark (**Figure 4**), est le résultat de différentes mutations génétiques^[3] affectant notamment la signalisation moléculaire.

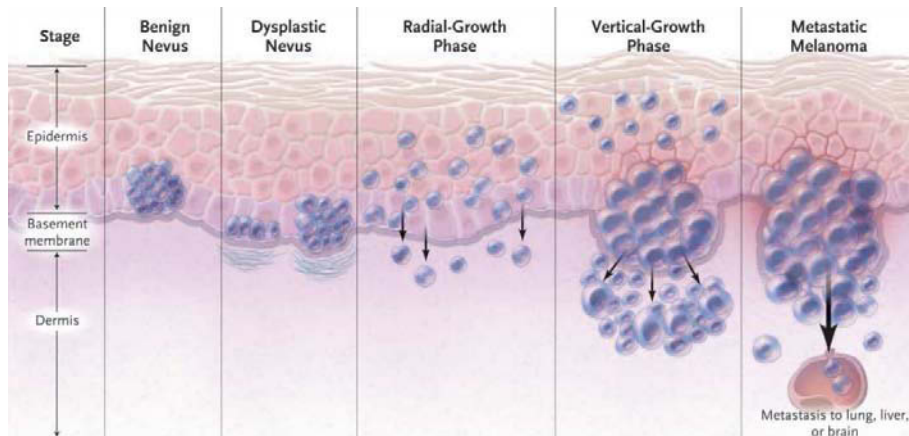


Figure 4 : Le modèle de Clark^[3]

La première étape est la constitution de *naevi* bénins ou dysplasiques, issus de la prolifération de mélanocytes normaux ayant acquis diverses mutations génétiques (dont la mutation BRAF, identifiée dans 40 à 60 % des cas). Cette prolifération reste en général très lente : un grain de beauté peut ne jamais évoluer. Cependant, une combinaison de mutations peut mener à l'expression de gènes conférant aux mélanocytes une capacité de prolifération. Initialement, cette croissance reste limitée à la couche épidermique (croissance radiale) car à ce stade les mélanocytes demeurent sous contrôle des kératinocytes. L'addition de nouvelles altérations génétiques^[45] augmente les propriétés de migration, d'invasion et de survie dans un environnement hostile des cellules mélaniques. La tumeur en développement peut alors envahir le derme (croissance verticale). La peau étant très vascularisée, ces tumeurs primitives peuvent ensuite se disséminer et former des métastases, en premier lieu au niveau de la peau, et par la suite dans tout l'organisme (ganglions lymphatiques, foie, poumons, cerveau,...).

[45] Slipicevic A. *et al.*, Narrowing the knowledge gaps for melanoma. *Upsala J. Med. Sci.* 2012, 0, 1-7

Dans au moins 90 % des mélanomes primitifs ^[46], la mélanine est détectée dans les cellules tumorales et les espaces extracellulaires. Il faut également noter que le ratio eumélanine / phæomélanine est généralement diminué dans les tumeurs, et qu'environ 5 % de celles-ci sont amélaniques. Les enzymes clés de la mélanogénèse (tyrosinase, TRP-1, TRP-2,...) sont également retrouvées voire surexprimées dans ces tumeurs ^[47].

« Qui ? », « pourquoi ? » et « comment ? » : à la lumière des éléments développés jusqu'ici, ces questions ont trouvé des éléments de réponses, en gardant à l'esprit la complexité des facteurs susceptibles d'induire la formation d'un cancer.

[46] Koch S.E., Lange J.R., Amelanotic Melanoma : The great masquerader. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *42*, 731-734

[47] Huang S. K. S. *et al.*, Antibody Responses to Melanoma/Melanocyte Autoantigens in Melanoma Patients. **1998**, *111*, 662-667

CHAPITRE 3

*Diagnostic, bilan d'extension et pronostic du
mélanome*

Le diagnostic précoce du mélanome et l'identification des sites de métastases sont des facteurs clés pour espérer diminuer la mortalité liée à cette pathologie.

I. Examen dermatologique

Il y a 25 ans, une signalisation mnémotechnique ^[48] a été mise en place pour faciliter une démarche autodiagnostique : le système ABCD, devenu ABCDE. Les lésions primaires du mélanome cutané sont en général définies par leur Asymétrie, des Bords irréguliers, des Couleurs multiples, un Diamètre supérieur à 6 mm et une Evolution dans le temps. Dans le cas de la détection d'une lésion suspecte, une biopsie est pratiquée et au-delà d'une certaine valeur de l'indice de Breslow (épaisseur maximale de la lésion), la biopsie du ganglion sentinelle et l'analyse de marqueurs sériques peuvent être réalisées séquentiellement ou parallèlement.

II. Marqueurs biochimiques

Comme pour tout cancer, un des entités biochimiques sont surexprimés dans le mélanome. Leur identification a permis d'évaluer la possibilité de les utiliser comme marqueurs (Protéine S100, Galectine 3, facteurs de croissance VEGF,...) ^[49]. Cependant, seul un biomarqueur sérique est actuellement utilisé lors d'exams routiniers, l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Sa concentration dans le sérum sanguin est à ce jour le meilleur facteur prédictif de la dissémination ^[50] mais de nombreux faux positifs peuvent être diagnostiqués, des niveaux élevés de LDH pouvant survenir pour d'autres cancers et certaines inflammations hépatiques. En cas de résultat positif, le bilan est poursuivi par la biopsie du ganglion sentinelle, indicateur de la dissémination.

III. Ganglion sentinelle ^[51]

La suspicion d'une dissémination peut être levée ou confirmée par la technique de lymphoscintigraphie et de biopsie du ganglion sentinelle (*i.e.* premier ganglion recevant le drainage lymphatique d'une tumeur). L'injection d'un colorant et/ou d'un émetteur de rayonnements γ autour de la lésion permet par scintigraphie et/ou contrôle visuel l'identification du ganglion sentinelle, prélevé afin de déterminer la présence ou l'absence de métastases par analyse histologique ^[52]. Si la dissémination est avérée, le bilan est poursuivi par des techniques d'imagerie.

IV. Imagerie médicale

Comme cela a déjà été évoqué, la propension du mélanome à se disséminer est très marquée et difficilement prévisible. De surcroît, tous les organes peuvent être touchés ; ainsi, un bilan du corps entier est nécessaire pour l'identification des lésions et permettre ainsi la stadification. Les innovations techniques des dernières décennies ont fourni aux oncologues des outils d'imagerie fonctionnelle et anatomique de plus en plus perfectionnés : imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou de positons (TEP) couplées ou non à un tomodensitomètre (TDM), qui améliorent grandement la sensibilité et la résolution, permettant l'identification de lésions de tailles millimétriques ^[53]. La méthode actuelle la plus fiable pour réaliser le bilan d'extension du mélanome est l'imagerie TEP utilisant le 2-fluoro-2-déoxy-D-glucose radiomarqué au fluor 18 (¹⁸F]FDG), analogue du D-glucose ^[54].

[48] Rigel D. S. *et al.*, The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 301-316

[49] Gould Rothberg B. E. *et al.*, Biomarkers: the useful and the not so useful - An assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 1971-1987

[50] Vereecken P., A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol. Res. Pract.* **2012**, *ePub*, 7 pages

[51] Gershenwald J. E. *et al.*, Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *New Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1738-1745

[52] Merrick I R., Sentinel node biopsy for melanoma: an update after two decades of experience. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2010**, *29*, 238-248

[53] Garbe C. *et al.*, Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res.* **2007**, *17*, 117-127

[54] Fletcher J. W. *et al.*, Recommendations on the use of ¹⁸F-FDG PET in oncology. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 480-508

Il faut néanmoins noter qu'en corollaire de ces progrès technologiques, une augmentation du nombre de faux-positifs liée à la détection de très petites structures (quelques mm) pouvant être interprétées à tort comme des métastases est observée.

V. Analyse histologique, stadification et pronostic

Les différents outils diagnostiques qui viennent d'être décrits permettent d'établir une classification du mélanome incluant quatre stades et seize sous-stades (**Figure 5**).

Stage	Primary tumour (pT)	Regional lymph node metastases (N)	Distant metastases (M)
0	In situ tumour	None	None
IA	<1.0 mm, no ulceration	None	None
IB	<1.0 mm with ulceration or Clark Level IV or V	None	None
IIA	1.01-2.0 mm, no ulceration	None	None
IIB	1.01-2.0 mm with ulceration	None	None
IIIA	2.01-4.0 mm, no ulceration	None	None
IIIB	2.01-4.0 mm with ulceration	None	None
IIIC	>4.0 mm, no ulceration	None	None
IIIC	>4.0 mm with ulceration	None	None
IIIA	Any tumour thickness, no ulceration	Micrometastases	None
IIIB	Any tumour thickness with ulceration	Micrometastases	None
IIIC	Any tumour thickness, no ulceration	Up to three macrometastases	None
IIIC	Any tumour thickness ± ulceration	None but satellite and/or in-transit metastases	None
IIIC	Any tumour thickness with ulceration	Up to three macrometastases	None
IIIC	Any tumour thickness ± ulceration	Four or more macrometastases, or lymph node involvement extending beyond capsule, or satellite and/or in-transit metastases with lymph node involvement	None
IV			Distant metastases

Figure 5 : Classification des différents stades de mélanome ^[55]

Les critères sont les suivants : indice de Breslow (épaisseur maximum de la lésion, de la surface à la plus profonde cellule cancéreuse), ulcération et bilan d'extension (localisation de métastases dans les ganglions sentinelles et dans les organes distants). Cette stadification permet d'évaluer par la suite le pronostic, qui diminue de façon critique avec l'avancement de la pathologie (**Figure 6**).

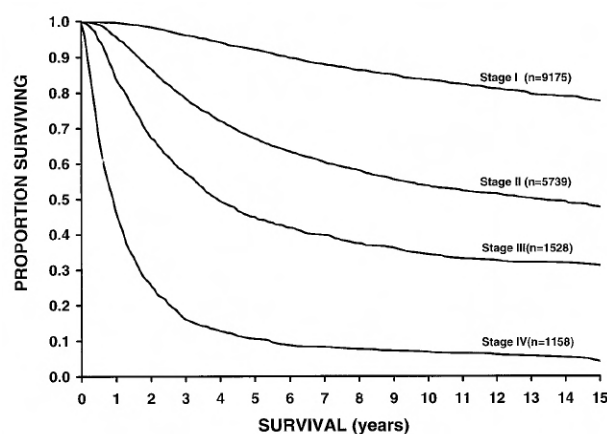


Figure 6 : Evolution de la survie en fonctions des différents stades du mélanome ^[56]

On constate en effet que la survie à 5 ans est divisée par deux entre une lésion initiale inférieure à 2 mm (stade IA et IB) et une lésion supérieure à 4 mm avec ulcération (stade IIC). Lorsque la maladie tend à se disséminer (stades III et IV), le facteur pronostic devient très pessimiste. On notera en particulier que pour le stade III, l'ulcération de la tumeur primaire, le nombre et la taille des métastases au niveau des ganglions lymphatiques a une grande influence sur le pronostic ^[57].

[55] Garbe C. *et al.*, Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 270-283

[56] Balch C. M. *et al.*, Final version of the American Joint Committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3635-3648

[57] Eigentler T. K. *et al.*, Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on cancer staging system: an analysis of the German central malignant melanoma registry. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4376-4383

VI. Diagnostic du mélanome : conclusions

Nous venons de voir que les techniques de référence pour le diagnostic et le bilan d'extension du mélanome sont l'examen dermatologique (mesure de l'indice de Breslow des lésions) et la biopsie du ganglion sentinelle pour les mélanomes de stade I à III. Pour le stade IV, un bilan d'extension faisant appel à des techniques d'imagerie est nécessaire, notamment *via* la [¹⁸F]FDG/TEP. Malgré l'apport indéniable de cette technique, le développement de traceurs plus spécifiques que le [¹⁸F]FDG reste d'actualité tant pour la détection plus précoce et plus efficace des lésions que pour le suivi thérapeutique des patients.

Si l'incidence de la pathologie est toujours en nette et constante augmentation, la mortalité semble suivre une évolution plus lente grâce notamment à la mise en place campagnes de dépistage et de sensibilisation du grand public. En effet, la moyenne des indices de Breslow reportées lors des diagnostics de nouveaux cas est passée de 1.8 mm à 0.7 mm entre 1975 et 1986 ^[58], permettant un traitement chirurgical précoce et efficace au stade primitif. Cependant, et comme exposé dans le chapitre suivant, les solutions thérapeutiques sont très limitées face à la maladie disséminée.

[58] Garbe C. *et al.*, Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* **2000**, *89*, 1269-1278

CHAPITRE 4

Thérapies du mélanome

Comme évoqué précédemment, les chances de survie des patients atteints de mélanome métastasé sont très faibles, ceci s'expliquant principalement par le manque d'efficacité des traitements actuels face à la maladie disséminée. Si la chimiothérapie (principalement par les agents alkylants) occupe encore aujourd'hui une place prépondérante, celle-ci pourrait être détrônée par l'émergence de nouvelles thérapies ciblées.

I. Les traitements conventionnels

Nous allons voir que les outils du clinicien vont différer selon le stade d'avancement de la maladie.

I.1. Exérèse chirurgicale

En cas de suspicion de lésion cancéreuse, une exérèse chirurgicale est pratiquée avec une marge de sécurité dépendante de l'indice de Breslow ^[53]. Cette intervention est limitée aux stades I et II, pour lesquels on observe une moyenne de 80 % de rémission. Dans le cas d'une lésion primitive importante (>1 mm), la biopsie du ganglion sentinelle est réalisée et en cas de résultat positif l'ablation de la chaîne ganglionnaire correspondant à la région de la tumeur est réalisée. Toutefois, cette pratique permet seulement de diminuer le risque de récurrence locale sans améliorer la survie globale ^[59]. Dans le cas des stades plus avancés, une intervention chirurgicale d'ablation des métastases isolées et accessibles révélées par le bilan d'extension peut être réalisée, sans grand effet sur la survie globale.

I.2. Radiothérapie

La radiothérapie consiste à traiter une lésion interne par des rayonnements ionisants de haute énergie. On distingue la radiothérapie externe et interne.

I.2.1. Radiothérapie interne

L'irradiation est émise par un médicament radioactif (appelé radiopharmaceutique) préalablement administré au patient. Trois rayonnements sont utilisés dans cette stratégie, tous provoquant des dommages létaux au niveau de l'ADN par ionisation directe et/ou par la production de radicaux libres : la particule α (constituée de deux neutrons et deux protons), le rayonnement β^- (électron à grande vitesse provenant de la désintégration d'un neutron) et les électrons Auger (issus d'une cascade de transitions électroniques au sein du radioélément, provoquant l'émission d'un rayonnement X qui peut arracher un électron des couches externes). Dans le cas du mélanome cutané, ces stratégies restent à ce jour exploratoires ^[60].

I.2.2. Brachythérapie

La brachythérapie consiste à apposer une source scellée contenant un radioélément au plus près des tumeurs. Cette technique est principalement réservée au traitement du mélanome oculaire, pour lequel la survie à 5 ans approche les 90 % pour un taux de rémission totale d'environ 40 % ^[61].

[59] Morton D. L. *et al.*, Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *New Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1307-1317

[60] Testori A. *et al.*, Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, vi22-vi29

[61] Khan N. *et al.*, The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2011**, *80*, 645-654

1.2.3. Radiothérapie externe

Deux types de rayonnements sont utilisés : électromagnétiques (photons X ou γ) et particuliers (e.g. protons, neutrons). Ces rayonnements sont générés par une source externe, placée à proximité des lésions à traiter. Le mélanome étant principalement décrit comme radorésistant [62], la radiothérapie externe n'est essentiellement utilisée qu'à titre palliatif. Elle peut cependant montrer une efficacité après exérèse ou pour limiter le risque de récurrence dans les stades peu avancés [63].

1.3. Thérapie adjuvante et immunothérapie

Le seul traitement adjuvant (surtout utilisé en post-traitement chimiothérapeutique) approuvé est l'interféron- α 2b qui possède des propriétés anti-prolifératives et immunomodulatrices [64]. De fortes doses sont injectées par voie intraveineuse ou sous-cutanée à des patients ayant subi une exérèse chirurgicale ou présentant une réponse positive de la biopsie du ganglion sentinelle. La survie globale à 5 ans n'est augmentée que d'environ 3 % alors que d'importants effets secondaires sont observés (fièvre, fatigue, diarrhées, infections dues à l'immunosuppression induite,...) [65]. L'usage de cet interféron en tant qu'adjuvant pour des mélanomes à haut risque de récurrence (stades II et III) reste très débattu en raison notamment d'une morbidité importante due aux fortes doses employées.

Dans le but d'améliorer la reconnaissance et la réponse antitumorale immunitaires, le développement de vaccins est étudié depuis une vingtaine d'années. Ces derniers à base d'antigènes variés combinés à différents adjuvants ont fait l'objet d'essais cliniques sans jamais démontrer d'amélioration de la survie [66].

L'unique traitement d'immunothérapie approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) jusqu'à 2010 était l'interleukine-2 (IL-2). Cette protéine de la famille des cytokines est connue principalement pour son rôle de facteur de croissance des cellules T et est également impliquée dans d'autres processus tels que la phosphorylation de tyrosine kinases ou l'induction de l'expression de protéines anti-apoptiques [67]. Le traitement impliquant l'injection de fortes doses induit un taux de réponse de 16 %, mais seulement 5 % des patients montrent une réponse totale et durable, sans toutefois améliorer la survie globale. De plus, les fortes doses administrées génèrent une importante toxicité systémique (hypotension, oedème, diminution de l'activité rénale,...).

Toutefois, une récente étude multicentrique a montré que l'association d'IL-2 avec un vaccin peptidique vs. IL-2 seul présente un potentiel intéressant [68] : le taux de réponse est amélioré (22,1 % contre 9,7 %) ainsi que la survie globale (17,6 contre 12,8 mois). D'autres associations du même type sont actuellement à l'étude.

[62] Doss L. L. *et al.*, The radioresponsiveness of melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1982**, *8*, 1131-1134

[63] Schild S. E., Role of radiation therapy in the treatment of melanoma. *Expert Rev. Anticanc.* **2009**, *9*, 583-586

[64] Pestka S. *et al.*, Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **2004**, *202*, 8-32

[65] Petrella T. *et al.*, Adjuvant interferon therapy for patients at high risk for recurrent melanoma: an updated systematic review and practice guideline. *Clin. Oncol.* **2012**, *24*, 413-423

[66] Davar D. *et al.*, Adjuvant Therapy: Melanoma. *J. Skin Cancer* **2011**, *ePub*, Article ID 274382, 19 pages

[67] Waldmann T. A., The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 595-601

[68] Schwartzenuber D. J., A phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100 peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, Abstract CRA9011

1.4. Chimiothérapie

Relativement peu de traitements de chimiothérapie contre le mélanome métastasé sont utilisés en clinique. Nous allons voir pourquoi en détaillant les options thérapeutiques qui ont été étudiées.

1.4.1. Dacarbazine et témolozomide

Le seul traitement du mélanome disséminé approuvé par la FDA jusqu'à tout récemment (2011) est le diméthyl-1-triazénoimidazole-4-carboxamide (DTIC) ou dacarbazine. Cet agent alkylant de la classe des triazènes découvert il y a plus de 40 ans reste encore aujourd'hui le traitement de référence [69]. Son action n'est pas celle d'un agent alkylant classique : il doit être métabolisé au préalable par les enzymes hépatiques pour former son métabolite actif (**Schéma 4**).

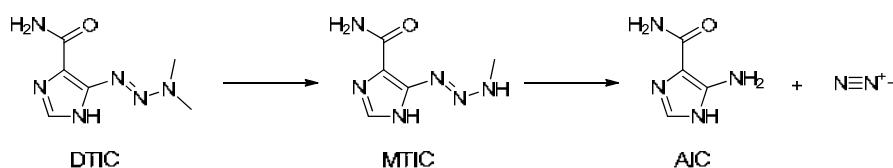


Schéma 4 : Métabolisme hépatique de la dacarbazine

La *N*-déméthylation conduit au 5-(3-méthyl-1-triazéno)imidazole-4-carboxamide (MTIC) qui se décompose spontanément en 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) et en diazométhane. C'est ce dernier qui est responsable de la méthylation des guanines contenues dans l'ADN. C'est l'alkylation en position 6 [70] qui induit les effets cytotoxiques majeurs : les *O*⁶-guanines ainsi générées provoquent des défauts d'appariement avec les cytosines et les thymines qui induisent après division cellulaire une réponse mutagène expliquant la cytotoxicité [71]. Il a été originellement reporté pour ce composé un taux de réponse d'environ 25 % dans des essais cliniques de phase II. Des études plus larges et récentes ont montré qu'en réalité, ce taux est seulement d'environ 10 % [72].

Il existe un analogue de la dacarbazine administrable par voie orale, le témolozomide. Son mécanisme d'action diffère légèrement puisqu'il est spontanément dégradé par voie non-enzymatique en AIC et diazométhane (**Schéma 5**).

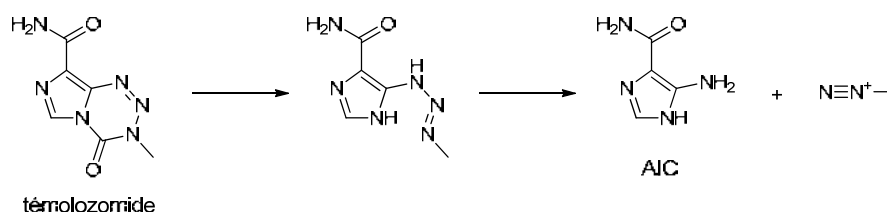


Schéma 5 : Métabolisme spontané du témolozomide

Les essais cliniques du témolozomide ont montré une légère amélioration en terme de réponse par rapport à la dacarbazine, sans toutefois améliorer la médiane de survie. En revanche, sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique lui permet d'avoir une meilleure efficacité sur les métastases cérébrales [73].

[69] Lens M. B. *et al.*, Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2003**, *4*, 2205-2211

[70] Lee S. M., Formation and loss of *O*⁶-methyldeoxyguanosine in human leucocyte DNA following sequential DTIC and fotemustine chemotherapy. *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 853-857

[71] Marchesi F. *et al.*, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol. Res.* **2007**, *56*, 275-287

[72] Garbe C. *et al.*, Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist* **2011**, *16*, 5-24

[73] Patel P. M. *et al.*, Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 1476-1483

I.4.2. Nitrosourées

Parmi les agents alkylants, les nitrosourées constituent une sous-classe thérapeutique majeure en oncologie. Leur action cytotoxique repose sur leur bifonctionnalité qui provoque *via* la formation de pontages covalents interbrins de l'ADN de nombreuses cassures double brin létales, à terme, pour la cellule [74]. Parmi ces agents, citons la carmustine et la lomustine dont les taux de réponse associés sont comparables aux agents historiques et se révèlent plus efficaces face à des métastases cutanées, ganglionnaires et pulmonaires [75]. Le leader de cette classe thérapeutique, la fotemustine, est un composé structurellement différent des nitrosourées classiques (présence d'un groupement alkyl phosphonate lipophile lui permettant de pénétrer le système nerveux central). D'une bonne efficacité contre les métastases cérébrales (environ 24 % de taux de réponse moyen) et hépatiques, son impact sur la médiane de survie reste faible comparé à la dacarbazine (7,3 contre 5,6 mois) [57].

I.4.3. Autres agents thérapeutiques

D'autres composés dont l'efficacité est reconnue sur de nombreuses tumeurs solides ont également été évalués face au mélanome disséminé. Parmi la famille des agents alkylants, les dérivés de platine (*cis*-platine, carboplatine) administrés seuls n'offrent qu'un taux de réponse très faible et génèrent de très importants effets secondaires [76].

Les antimétabolites dont les taxanes (paclitaxel et docitaxel) ont montré une efficacité très limitée [77] pour un taux de réponse aux environs de 13 %. Ils sont responsables de nombreux effets toxiques (atteintes de la moelle épinière, neurotoxicité,...). Une formulation de paclitaxel à base de nanoparticules d'albumine (Abraxane ou ABI-007) a montré des résultats encourageants dans une étude clinique de phase II avec un taux de réponse global aux alentours de 30 %. Ces résultats doivent être validés par une étude de phase III.

I.4.4. Polychimiothérapies

Comme nous venons de le voir, malgré les efforts consentis depuis 40 ans et l'approbation de la dacarbazine, aucun nouvel agent thérapeutique utilisé seul n'a amélioré significativement le traitement du mélanome métastaté. De multiples combinaisons de drogues de différentes classes thérapeutiques ont été évaluées. Malheureusement, les résultats encourageants des essais monocentriques n'ont jamais été confirmés en essais cliniques de phase III.

A titre d'exemple, le régime de Dartmouth (combinaison de dacarbazine, *cis*-platine, carmustine et tamoxifène) était initialement associé à des taux de réponses de l'ordre de 50-55 %. Une étude clinique de phase II a réduit l'impact de ce traitement à un taux de réponse entre 10 et 20 % [78] tandis qu'une étude multicentrique de phase III conclut qu'aucune différence notable n'existe en terme de survie vis-à-vis de la dacarbazine seule [79].

[74] Erickson L. C. *et al.*, DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 467-471

[75] Anderson C. M., Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology* **1995**, *9*, 1149-1158

[76] Steffens T. A. *et al.*, A phase II trial of high-dose cisplatin and dacarbazine. Lack of efficacy of high-dose, cisplatin-based therapy for metastatic melanoma. *Cancer* **1991**, *68*, 1230-1237

[77] Bedikian A. Y. *et al.*, Phase II trial of docetaxel in patients with advanced cutaneous malignant melanoma previously untreated with chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 2895-2899

[78] Sun W. *et al.*, Metastatic melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2001**, *2*, 193-202

[79] Chapman P. B. *et al.*, Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2745-2751

I.5. Immunochimiothérapies et biochimiothérapies

Un grand nombre de biochimiothérapies ou d'immunochimiothérapies (*cis*-platine, vinblastine ou dacarbazine combinés soit à l'interféron- α soit à l'interleukine-2) ont été évaluées lors d'essais cliniques et ont démontré une augmentation du taux de réponse sans toutefois améliorer significativement la survie ^[80].

II. Les approches récentes

L'amélioration de la compréhension des systèmes biologiques tumoraux et des réponses immunitaires anti-tumorales ont conduit à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant des protéines ou des récepteurs clés impliqués dans le développement et la progression des cancers ^{[81],[82]}.

II.1. Anticorps et immunothérapie

Le champ des recherches biomoléculaires s'est considérablement ouvert lors des quinze dernières années, et cette évolution a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Parmi elles, l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-CTLA4 est actuellement en phase de développement clinique. L'activation des lymphocytes T requiert une stimulation des récepteurs B7 par l'association de l'antigène CD28. Les antigènes 4 associés aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) se fixent compétitivement aux récepteurs B7, provoquant une régulation négative et donc une réponse immunitaire plus faible ^[83]. Des anticorps anti-CTLA4 totalement humanisés ont été développés (tremelimumab et ipilimumab) et présentent une affinité plus forte pour CTLA4 que le récepteur B7, favorisant ainsi l'activation et la prolifération des lymphocytes T, et donc leur action cytotoxique sur les cellules cancéreuses. Dans le cas du tremelimumab, les essais en phase III ont été prématurément stoppés malgré certaines promesses révélées lors d'essais en phase II (réponses induites durables) ^[84]. Concernant l'ipilimumab, les différentes études de phase II ^{[85],[86]} ont démontré qu'il induit une réponse de longue durée tout en améliorant la médiane de survie. Ces résultats ont conduit à une étude de phase III sur l'ipilimumab seul ou en combinaison avec un vaccin (glycoprotéine 100), publiée en 2010 ^[87]. Elle a révélé un important bénéfice de survie face au vaccin seul (10,1 contre 6,4 mois) pour un taux de réponse compris entre 25 et 30 %. De même, la combinaison avec la dacarbazine contre la dacarbazine seule présente une amélioration de la médiane de survie (11,2 mois contre 9,1 mois) ^[88]. Toutes ces données ont conduit en 2011 à l'approbation par la FDA et l'agence européenne des médicaments (EMA) du traitement en première ligne du mélanome métastaté par l'ipilimumab. Il s'agit dans l'histoire du mélanome du premier traitement validé sur les bases d'un bénéfice de survie avéré chez les patients atteints de mélanome métastaté avancé. Cette « success story » doit toutefois être pondérée : la médiane de survie n'est améliorée que de quelques mois, et malgré le manque de recul sur cette thérapie récente, la survie à plus long terme n'a pas l'air d'être impactée. De plus, le coût extrêmement élevé de ce traitement (estimé à plus de 100 k€) risque de restreindre grandement son accès.

[80] Ives N. J. *et al.*, Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 5426-5434

[81] Ji Z. *et al.*, Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol. Asp. Med.* **2010**, *31*, 194-204

[82] Eggermont A. M. M. *et al.*, New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 2150-2157

[83] O'Day S. J. *et al.*, Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4). *Cancer* **2007**, *110*, 2614-2627

[84] Kirkwood J. M. *et al.*, Phase II trial of Tremelimumab (CP-675,206) in patients with Advanced refractory or relapsed melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1042-1048

[85] Weber J. *et al.*, A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of Ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5591-5598

[86] O'Day S. J. *et al.*, Efficacy and safety of Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 1712-1717

[87] Hodi F. S. *et al.*, Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711-723

[88] Robert C. *et al.*, Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2517-2526

II.2. Thérapies ciblées et inhibiteurs de kinases

II.2.1. Inhibiteurs de kinases

La mutation la plus fréquente dans le cas du mélanome est celle de l'oncogène BRAF, impliqué dans la régulation de la voie MAP kinase (Mitogen Activated Protein kinase). La mutation BRAF_{V600E} est responsable d'une activation de cette voie dans les mélanomes avancés [89]. Dans ce contexte, des inhibiteurs sélectifs de kinases tels RG7204 (Vemurafenib) et AZD6244 (Selumetinib) ont été développés et sont actuellement en cours d'évaluation clinique [72]. Les essais de phase I du Vemurafenib [90] ont montré pour 80 % des patients une rémission totale ou partielle, mais très ponctuelle (2 à 18 mois avant rechute brutale).

D'autres inhibiteurs de kinases, tels le Sorafenib [91], l'Imatinib [92] et l'Axatinib [93] sont actuellement évalués dans le cadre d'études cliniques de phase II ou III.

II.2.2. Autres approches

Parmi les autres agents thérapeutiques évalués en clinique (phase II ou III), nous pouvons citer le Bevacizumab [94] (anticorps monoclonal anti-VEGF-A), le Tasisulam [95] (agent cytotoxique inducteur d'apoptose) ou encore les approches impliquant des facteurs de stimulation de colonies de granulocytes macrophages [96] (GM-CSF).

III. La thérapie du mélanome : conclusions

La recherche active de solutions thérapeutiques du mélanome métastaté a conduit au développement d'approches innovantes aux résultats préliminaires encourageants et qui élargissent le champ d'action des cliniciens thérapeutes à de nouvelles combinaisons d'immunochimiothérapies par exemple. Cependant, aucun réel bénéfice thérapeutique majeur n'est observé actuellement, divers facteurs limitant toujours les avancées cliniques.

Concernant la chimiothérapie (en excluant les thérapies ciblées), aucune découverte n'a vu le jour depuis la dacarbazine, certaines molécules ayant montré une efficacité comparable mais jamais meilleure. Ce constat est principalement imputable au manque de spécificité de ces composés de faibles index thérapeutiques : les doses administrées, limitées par d'importants effets secondaires, ne sont généralement pas suffisantes pour induire une réponse durable.

Concernant l'immunothérapie, les taux de réponse sont en général améliorés et de plus longue durée. Cependant, le coût des traitements impliquant des anticorps est extrêmement élevé, ce qui pose une réelle question de santé publique.

[89] Satyamoorthy K. *et al.*, Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 756-759

[90] Flaherty K. T. *et al.*, Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 809-819

[91] Margolin K. A. *et al.*, Randomized phase II trial of Sorafenib with Temsirolimus or Tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1129-1137

[92] Guo J. *et al.*, Phase II, Open-label, single-arm trial of Imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-kit mutation or amplification. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2904-2909

[93] Fruehauf J. *et al.*, Multicenter, phase II study of Axitinib, a selective second-generation inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3, in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 7462-7469

[94] Kim K. B. *et al.*, BEAM: A randomized phase II study evaluating the activity of Bevacizumab in combination with Carboplatin plus Paclitaxel in patients with previously untreated advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 34-41

[95] Kirkwood J. M. *et al.*, A phase 2 study of tasisulam sodium (LY573636 sodium) as second-line treatment for patients with unresectable or metastatic melanoma. *Cancer* **2011**, *117*, 4732-4739

[96] Eroglu Z. *et al.*, Phase II clinical trial evaluating docetaxel, vinorelbine and GM-CSF in stage IV melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68*, 1081-1087

De manière plus générale, le mélanome est connu pour ses propriétés de résistance et d'échappement tumoral. Par exemple, des mécanismes de réparation de l'ADN tels que : l'action des alkyltransférases ^[97] et des systèmes de réparations de défaut d'appariement ^[98] (Mismatch Repair, MMR), d'excision de base (Base Excision Repair, BER) ou encore de rupture double brin (Non-Homologous End Joining, NHEJ) génèrent une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Une autre spécificité du mélanome vient s'ajouter : l'effet « scavenger ». Cette particularité est liée aux propriétés intrinsèques des mélanines à piéger des dérivés potentiellement toxiques pour les cellules ^[99], stockés dans les mélanosomes qui sont eux-mêmes extravasés en dehors des cellules afin d'en garantir l'intégrité.

Les cellules mélaniques malignes possèdent également une grande faculté à donner lieu à des mutations permettant aux tumeurs d'échapper à l'action des thérapies ciblées. Le Vemurafenib et le Selumetinib illustrent parfaitement ce phénomène : ces drogues aux remarquables activités cliniques sont rendues inefficaces à terme par des mutations qui contrecarrent l'inhibition ou par l'activation d'autres voies que celle inhibée ^[100]. Cette constatation est généralisable aux thérapies ciblant très sélectivement un mécanisme essentiel dans le développement des cellules tumorales : plus le ciblage est précis, plus il semble aisé pour la tumeur d'y échapper.

En conclusion de ce chapitre et en ouverture du suivant, illustrons de façon imagée le concept qui sera la base de cette thèse et qui vise à s'affranchir des limites précédemment relevées : si l'on assimile la lutte contre le cancer aux avancées militaires, les agents de chimiothérapie d'activité nanomolaire sont comparables à des armes de destruction massive du fait de leur immense pouvoir de destruction. Néanmoins, si un char d'assaut fait preuve d'une grande efficacité pour écraser une mouche sur un rebord de fenêtre, le bâtiment entier peut être détruit par manque de spécificité de l'action.

Le Dr Paul Ehrlich (prix Nobel de physiologie / médecine en 1908) avait déjà pressenti que les thérapies devaient s'orienter vers un concept de « Magic Bullet » ^[101], qui consisterait à cibler sélectivement la structure biologique pathologique et ainsi générer une action thérapeutique spécifique. Le développement des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs sélectifs de kinases s'appuient sur ce fondement en agissant sur des mécanismes physiopathologiques précis (mutations génétiques, surexpressions d'enzymes ou de récepteurs). Cependant, nous avons vu précédemment les limites associées à ces approches.

Il pourrait être avantageux de combiner l'efficacité des traitements conventionnels à la spécificité des thérapies ciblées par la conception de prodrogues vectorisées s'appuyant sur une cible indépendante de l'initiation ou de l'évolution de la maladie. Le chapitre suivant a pour but d'explicitier le concept de vectorisation et d'identifier les cibles potentiellement utilisables pour la chimiothérapie vectorisée du mélanome.

[97] Kaina B. *et al.*, MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **2007**, 6, 1079-1099

[98] Jiricny J., The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 335-346

[99] Chen K. G. *et al.*, Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9903-9907

[100] Poulidakos P. I. *et al.*, Mutant BRAF melanomas-dependence and resistance. *Cancer Cell* **2011**, 19, 11-15

[101] Strebhardt K. *et al.*, Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 473-480

CHAPITRE 5

Cibles et traceurs du mélanome

Dans le cadre du traitement du mélanome, il semble ainsi nécessaire de s'appuyer sur une stratégie permettant de cibler au mieux les tumeurs mélaniques et d'imaginer des structures moléculaires présentant une affinité spécifique pour le mélanome afin de développer de nouvelles thérapies plus efficaces. Il est important avant d'aborder ce chapitre de définir clairement certains termes parfois ambigus.

I. Définitions

Une « cible » désigne une entité chimique ou biologique (récepteurs, tissus, protéines, glycanes,...) qui sera visée par des molécules ou macromolécules présentant une affinité et une capacité de liaison spécifique pour elle (ligands). La « thérapie ciblée » inclut donc ce type de composés (inhibiteurs sélectifs, anticorps monoclonaux,...).

Le terme « radiotraceur » désigne une molécule incorporant une source radioactive susceptible d'être suivie par imagerie scintigraphique. Nous nous permettrons d'étendre ce terme de « (radio)traceur » à des molécules permettant d'identifier, d'imager ou de suivre le devenir d'une cible.

Le terme « vecteur » désigne originellement « ce qui porte ou transporte quelque chose ». Par exemple, le sang est un vecteur d'oxygène, ou un parasite est vecteur d'agent infectieux. Nous désignerons ici par « vecteur » une structure ou édifice moléculaire présentant une affinité pour une cible, susceptible d'être couplé à une autre entité dans le but d'adresser celle-ci vers la cible concernée. La « thérapie vectorisée » est basée sur cette définition. Nous verrons plus loin que certaines thérapies dites ciblées (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy, ADEPT et Antibody-Drug Conjugate, ADC) sont en fait des thérapies vectorisées selon notre définition.

Concernant le mélanome, différentes cibles plus ou moins spécifiques ont été étudiées et les plus représentatives sont : les récepteurs sigma, les récepteurs MC1R et les mélanines.

II. Cible : les récepteurs sigma (σ)

Ces récepteurs membranaires ont plusieurs fonctions dans l'organisme : régulation de neurotransmetteurs dans les systèmes endocrinien, immunitaire et nerveux central, et sont surexprimés dans de nombreuses pathologies cancéreuses, dont le mélanome^[102]. Afin d'exploiter ce différentiel d'expression, un grand nombre de ligands (rimcazole, halopéridol, donepezil, dérivés d'anisamide,...) présentant une forte affinité pour ces récepteurs^[103] ont été synthétisés. Ils ont été évalués pour une application diagnostique^[104] ou thérapeutique du mélanome comme support pour la vectorisation de principes actifs^[105].

III. Cible : les récepteurs MC1R

Nous l'avons vu précédemment (chapitre 2 - paragraphe III.3.), les récepteurs MC1R sont exprimés à la surface des mélanocytes normaux et participent à la régulation de la mélanogénèse par l'action de son ligand naturel, l'hormone de stimulation α -MSH. Ils sont également surexprimés dans le mélanome et peuvent donc constituer une cible de choix. De nombreux peptides analogues de l' α -MSH (*e.g.* famille CCMSH : DOTA-Re-

[102] Vilner B. J. *et al.*, Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 408-413

[103] Megalizzi V. *et al.*, Sigma receptors and their ligands in cancer biology: overview and new perspectives for cancer therapy. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 410-427

[104] H. E. *et al.*, Sigma-receptor imaging by means of I[123]-IDAB scintigraphy : clinical application in melanoma and non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 1577-1582

[105] Banerjee R. *et al.*, Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 693-700

CCMSH, DOTA-Re-CCMSH(Arg¹¹)) ont été évalués principalement dans un but d'imagerie moléculaire, notamment par vectorisation active de nanoparticules d'or^[106] puis pour des applications en radiothérapie interne.

IV. Cible : les mélanines

Nous avons décrit (chapitre 2 - paragraphe III.4.) que les mélanines ont un rôle de filtre chimique et démontrent une affinité particulière pour certains composés organiques. De plus, nous avons vu que les mélanosomes matures des mélanocytes sains sont redistribués dans les kératinocytes. Ce transfert n'a pas lieu dans les tumeurs de mélanome, les mélanosomes sont donc présents en plus grande quantité dans les tumeurs pigmentées par rapport aux tissus sains. De nombreuses approches ont été envisagées afin d'utiliser cette particularité pour concevoir des traceurs ou des vecteurs spécifiques du mélanome.

Parmi ces approches figure l'anticorps monoclonal murin mAb 6D2 produit par le champignon *Cryptococcus Neoformans* qui présente une affinité forte pour les mélanines. Ne pouvant entrer dans les cellules, il ne cible que les mélanines extracellulaires^[107], présentes uniquement dans les tumeurs de taille importante : la nécrose ou la dégradation par les macrophages des cellules tumorales conduisent en effet à la dispersion des mélanines dans le stroma tumoral. Cet anticorps marqué par le rhénium 188 est actuellement l'objet d'études précliniques pour la radiothérapie interne du mélanome, seul^[108] ou couplé à une chimiothérapie à base de dacarbazine^[109].

Il a également été montré que certains peptides pouvaient présenter une fixation aux mélanines^[110] tels que le peptide HYNIC-4B4 dont les résultats préliminaires de radiothérapie interne pourtant encourageants^[111] sont restés sans suite.

De nombreuses molécules de faible poids moléculaire peuvent être piégées par les polymères de mélanine, comme les analogues de la chloroquine^[112], du 2-thiouracile qui est incorporé dans les polymères pendant la mélanogénèse^[113] ou encore du bleu de méthylène^[114]. Ces traceurs ont été évalués pour la thérapie, l'imagerie et la radiothérapie interne du mélanome (**Figure 7**).

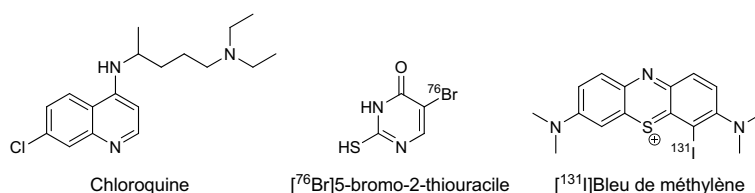


Figure 7 : Exemples de traceurs de mélanines

Toutes ces approches semblent être restées sans suite à l'exception d'une classe de molécules présentant un tropisme important et une forte affinité pour la mélanine qui retient l'attention de nombreux chercheurs et particulièrement de notre laboratoire : les benzamides.

[106] Kim C. *et al.*, *In vivo* photoacoustic tomography of melanomas targeted by bio-conjugated gold nanocages. *ACS Nano*. **2010**, *4*, 4559-4564

[107] Dadachova E. *et al.*, Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14865-14870

[108] Dadachova E. *et al.*, Pre-clinical evaluation and efficacy studies of a melanin-binding IgM antibody labeled with 188Re against experimental human metastatic melanoma in nude mice. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 1116-1127

[109] Revskaya E. *et al.*, Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2373-2379

[110] Dadachova E. *et al.*, Melanin as a potential target for radionuclide therapy of metastatic melanoma. *Future Oncol.* **2005**, *1*, 541-549

[111] Dadachova E., Radiolabeled melanin-binding peptides are safe and effective in treatment of human pigmented melanoma in a mouse model of disease. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2006**, *21*, 117-129

[112] Inoue S. *et al.*, Antimelanoma activity of chloroquine, an antimalarial agent with high affinity for melanin. *Pigm. Cell Res.* **1993**, *6*, 354-358

[113] Mars U. *et al.*, Positron emission tomography of experimental melanoma with [⁷⁶Br]5-bromo-2-thiouracil. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 845-849

[114] Sobal G. *et al.*, Radioiodinated methylene blue - A promising agent for melanoma scintigraphy: labelling, stability and in vitro uptake by melanoma cells. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 3691-3696

IV.1. Benzamides et analogues : historique

A l'origine, des dérivés tels que BZA et BZA₂ (**Figure 8**) découverts par notre laboratoire ont été synthétisés en tant qu'analogues de ligands des récepteurs σ (anisamide et dérivés) pouvant être exploités pour l'imagerie du mélanome métastasé [115]. Ces dérivés ont par la suite fait l'objet de nombreuses pharmacomodulations par d'autres équipes, dans le cadre de l'imagerie TEMP [116-118], TEP [119] ou de la radiothérapie interne [120] du mélanome.

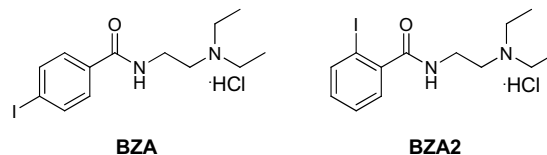


Figure 8 : Structures de BZA et BZA2

Notre laboratoire a prouvé qu'en réalité, la spécificité des benzamides pour le mélanome était due à une affinité pour la mélanine et non pour les récepteurs σ . Des études de microscopie ionique analytique ont effectivement montré *ex vivo* sur modèle animal présentant des colonies pulmonaires et après injection de BZA que ce traceur colocalisait avec les mélanosomes et les mélanines (intra et extracellulaires) [121]. D'autres travaux du laboratoire ont permis de préciser la nature des interactions mises en jeu [122]. Il s'agit principalement de liaisons ioniques formées entre l'amine protonée à pH physiologique et les résidus carboxylates des sous-unités polymériques. Ces interactions sont renforcées par l'empilement π - π des noyaux aromatiques (**Figure 9**).

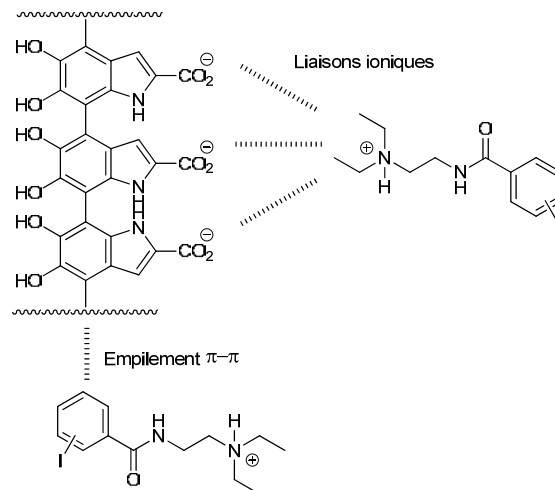


Figure 9 : Affinités des benzamides pour la mélanine

- [115] Michelot J. M. *et al.*, Synthesis and evaluation of new iodine-125 radiopharmaceuticals as potential tracers for malignant melanoma. *J. Nucl. Med.* **1991**, *32*, 1573-1580
- [116] Eisenhut M. *et al.*, Radioiodinated N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3913-3922
- [117] Pham T. Q. *et al.*, Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3561-3572
- [118] Liu X. *et al.*, Synthesis and evaluation of novel radioiodinated nicotinamides for malignant melanoma. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 769-781
- [119] Denoyer D. *et al.*, High-contrast PET of melanoma using ¹⁸F-MEL050, a selective probe for melanin with predominantly renal clearance. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 441-447
- [120] Joyal J. L. *et al.*, Preclinical evaluation of an ¹³¹I-labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4045-4053
- [121] Guerquin-Kern J.-L. *et al.*, Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences. *BioMed. Eng. Online* **2004**, *6*, 10
- [122] Labarre P. *et al.*, Melanin affinity of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide, an effective melanoma imaging agent. *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 115-121

Par la suite, il a été envisagé d'utiliser ces traceurs pour la radiothérapie interne par l'iode 131 (émetteur β^-). Cependant, la fixation tumorale de BZA et BZA₂ est certes spécifique mais peu durable (fixation très faible à 24 h post-injection) et ne se prête donc pas à une application en radiothérapie par l'iode 131 compte tenu de la période de ce radioélément (8,02 j). Sur la base de ce constat, des études de relation structure-activité ont été réalisées par notre laboratoire.

La première a porté sur des modifications de la chaîne amidique [123]. Celles-ci ont entraîné de faibles variations des paramètres pharmacocinétiques (*i.e.* fixation tumorale, et distribution dans les organes non cibles similaires). La seconde modulation a porté sur la partie aromatique de la structure (**Figure 10**) sans intervenir sur la chaîne amidique de BZA et BZA₂ [124],[125].

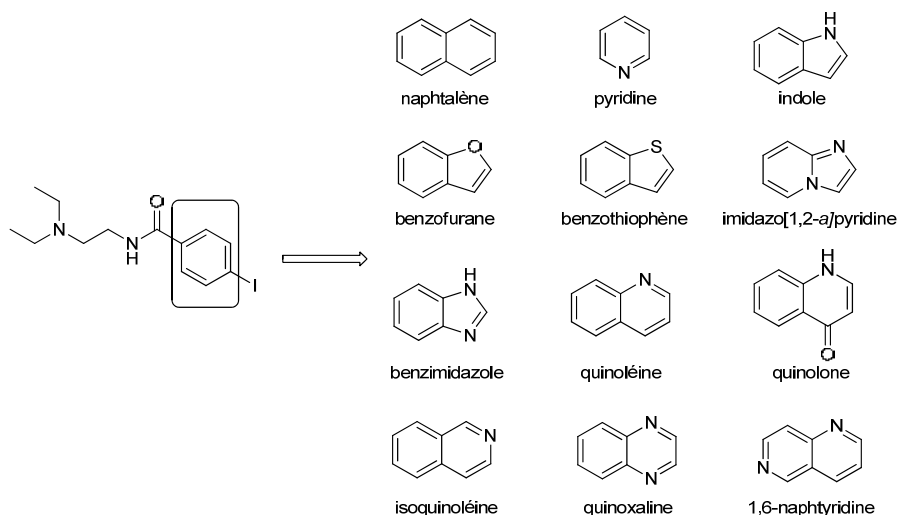


Figure 10 : Pharmacomodulation de BZA, partie aromatique

La plupart de ces composés présentaient un profil pharmacocinétique supérieur ou égal aux molécules parentes. En particulier, la molécule nommée ICF01012 contenant un noyau de type quinoxaline (**Figure 11**) présente une fixation tumorale 16 fois supérieure à celle de BZA à 72 h post-injection, et toujours détectable après 8 j (**Figure 12**). Cette biodistribution favorable associée à une clairance des organes non cibles plus rapide que d'autres analogues aromatiques ou hétéroaromatiques ont donc conduit à sa sélection en tant que leader de la série.

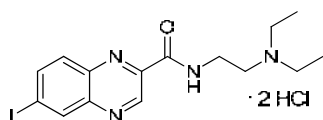


Figure 11 : Structure du composé ICF01012

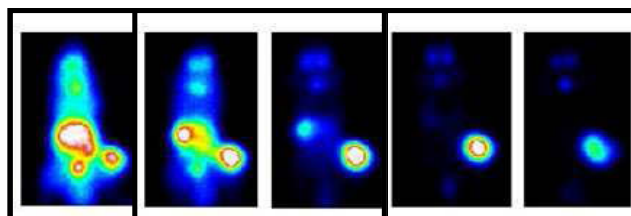


Figure 12 : Biodistribution de [¹²⁵I]ICF01012 chez une souris porteuse de xénotgreffe de mélanome (temps 1 h, 6 h, 24 h, 72 h et 8 j post-injection)

[123] Moins N. *et al.*, Synthesis, characterization and comparative biodistribution study of a new series of p-iodine-125 benzamides as potential melanoma imaging agents. *Nucl. Med. Biol.* **2001**, *28*, 799-808

[124] Chezal J.-M. *et al.*, Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3133-3144

[125] Madelmont J.-C. *et al.*, Labelled analogues of halobenzamides as radiopharmaceuticals. *World Patent* **2008**, *WO2008012782*

Une étude préclinique de radiothérapie interne utilisant ICF01012 marquée à l'iode 131 a démontré le potentiel thérapeutique de ce composé avec une amélioration significative de la médiane de survie des souris traitées associée à une inhibition de la dissémination pulmonaire des cellules tumorales ^{[126],[127]}.

IV.2. Benzamides et analogues : applications en chimiothérapie vectorisée

Bien que la détection précoce et le diagnostic restent primordiaux pour limiter la progression de la maladie, la nécessité d'accéder à des traitements réellement efficaces face à la maladie disséminée est comme nous l'avons vu tout à fait urgente. La radiothérapie à l'iode 131, malgré toutes ses promesses, pourrait être compromise par les effets radiotoxiques induits par la distribution du composé sur les organes non cibles ou bien encore par l'apparition de souches radiorésistantes.

Ainsi, la possibilité d'utiliser des traceurs comme BZA ou ICF01012 pour la vectorisation de principes actifs non radioactifs (métaux, drogues cytotoxiques ou inhibiteurs d'enzymes) a également été envisagée ^[128-130] afin de proposer des traitements du mélanome de meilleur index thérapeutique. Une augmentation du pouvoir cytotoxique du chlorambucil et de diméthyltriazenes (mimant la dacarbazine) a notamment été démontrée ^[131] lorsque ces composés sont couplés à des benzamides. Cependant, l'efficacité de ces conjugués est limitée : en effet, la liaison covalente du principe actif avec le vecteur entraîne la séquestration de l'ensemble au sein des mélanosomes et limite de fait l'action thérapeutique.

Afin de s'affranchir de cet effet « scavenger », le travail décrit dans cette thèse s'appuie sur le meilleur traceur du mélanome développé par notre laboratoire (ICF01012) pour construire des prodrogues vectorisées capables de libérer sélectivement le principe actif au sein des cellules tumorales

Le chapitre qui suit a pour but de définir le terme de « prodrogues », d'offrir un aperçu de leurs applications ainsi que de décrire les principaux espaceurs clivables utilisés et leurs caractéristiques.

-
- [126] Bonnet-Duquenois M. *et al.*, Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 708-716
- [127] Bonnet M. *et al.*, Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigm. Cell Mel. Res.* **2010**, *23*, e1-e11
- [128] Oltmanns D., Benzamides as melanotropic carriers for radioisotopes, metals, cytotoxic agents and as enzyme inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2086-2094
- [129] Vivier M. *et al.*, Synthesis, radiosynthesis, and biological evaluation of new proteasome inhibitors in a tumor targeting approach. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1043-1047
- [130] Rapp M. *et al.*, A new O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase inhibitor associated with a nitrosourea (cystemustine) validates a strategy of melanoma-targeted therapy in murine B16 and human-resistant M4Beu melanoma xenograft models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 171-177
- [131] Wolf M. *et al.*, Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity: experimental chemotherapy in a mouse melanoma model. *Melanoma Res.* **2006**, *16*, 487-496

CHAPITRE 6

Prodrogues et espaces clivables

Au sein de ce chapitre, nous allons voir que les applications des prodrogues sont très variées ^[132-134] : modulation de paramètres galéniques, ciblage ou encore libération sélective. Cependant, avant d'aborder ces points, une notion indissociable de la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques doit être introduite : le métabolisme, à l'origine des transformations de tout médicament présent dans un organisme vivant.

I. Métabolisme des drogues

Le métabolisme fait intervenir toutes sortes de transformations, enzymatiques ou non (*e.g.* pH, température). Elles ont en général pour but d'augmenter la polarité des composés afin de favoriser leur élimination rénale et ont lieu pour la plupart au niveau du foie, principal organe impliqué : il s'y déroule des réactions qui modifient la structure en introduisant ou transformant des groupements fonctionnels (métabolisme primaire) ainsi que des réactions de conjugaison (métabolisme secondaire). Différentes enzymes peuvent intervenir, mais la principale, responsable de près de 75 % des réactions associées, est le cytochrome P450 ^[135], capable de catalyser plus de quarante types de réactions différents (hydroxylations, déalkylations, oxydations,...). Dans une moindre mesure, les oxydoréductases, les hydrolases ou encore les transférases participent également en conjugant les métabolites primaires (majoritairement produits par les cytochromes) à de petites molécules ou groupements endogènes (acide glucuronique, phosphate, glutathion,...) pour former des métabolites secondaires facilement éliminables.

II. Les prodrogues

Le terme prodrogue a été introduit en 1958 par Adrien Albert ^[136] et désigne tout composé dont l'effet thérapeutique est conditionnée par une activation métabolique. Tout médicament administré sous sa forme active peut subir comme nous venons de le voir un certain nombre de transformations avant d'atteindre sa cible, chacune étant susceptible de diminuer son efficacité. A cette contrainte s'ajoute pour certains composés des problèmes de solubilité qui limitent les modes et voies d'administration, de même que les quantités administrées.

Ainsi, la conception de prodrogues a généralement pour objectif d'améliorer la solubilité, la stabilité, la spécificité (par vectorisation) ou encore l'activation par le tissu ou la cellule cible. Ces optimisations permettent de s'affranchir des limites précédemment évoquées et ainsi d'améliorer la biodistribution, la biodisponibilité ou encore l'efficacité. Depuis les années 70, un grand nombre de médicaments mis sur le marché sont des prodrogues, dont certains « blockbusters » (*e.g.* simvastatine, omeprazole, aciclovir, lovastatine, capécitabine,...).

II.1. Amélioration de la solubilité

Certaines molécules sont quasiment insolubles dans l'eau et ne se prêtent donc pas à certaines formulations ou voies d'administration. Plusieurs solutions sont à disposition des chercheurs afin d'augmenter l'hydrophilie des composés et ainsi favoriser l'absorption orale, parentérale ou percutanée lorsque les formulations conventionnelles (formation de sels, ajout d'excipients de solubilisation ou de complexation) ne sont pas applicables ^[137].

[132] Han H.-K. *et al.*, Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharmsci.* **2000**, 2, article 6

[133] Etmayer P. *et al.*, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2393-2404

[134] Kratz F. *et al.*, Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 20-53

[135] Guengerich F. P., Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 21, 70-83

[136] Albert A., Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, 182, 421-423

[137] Stella V. J. *et al.*, Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 677-694

Par exemple, diverses prodrogues comportant un groupement phosphate sont aujourd'hui utilisées cliniquement, ces groupements étant aisément clivés *in vivo* par diverses phosphatases membranaires. Le fosamprenavir (**Figure 13**) est une prodrogue phosphatée de l'amprenavir (inhibiteur de protéase VIH utilisée dans le traitement du SIDA) et présente une solubilité aqueuse 10 fois supérieure à la molécule parente, facilitant grandement la prise du traitement par les patients [138].

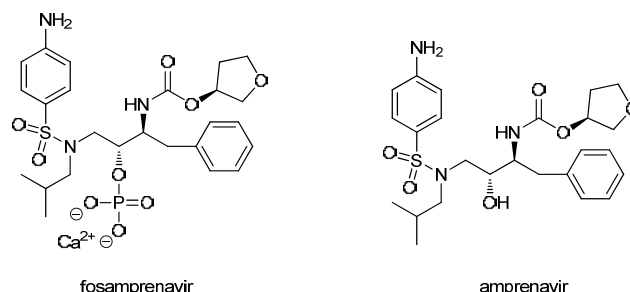


Figure 13 : Structures du fosamprenavir et de l'amprenavir

Un autre exemple intéressant est celui de la fosphénytoïne (**Figure 14**), un anticonvulsif utilisé dans le traitement de l'épilepsie. La molécule mère, la phénytoïne, est une molécule hydrophobe ne présentant pas de groupements chimiques permettant de greffer un phosphate. Cependant, la phénytoïne peut réagir avec le formaldéhyde en excès pour former la 3-hydroxyméthylphénytoïne qui peut être phosphorylée. A pH et température physiologique, ce dérivé se décompose en régénérant la phénytoïne et du formaldéhyde avec une demi-vie de quelques secondes [139].

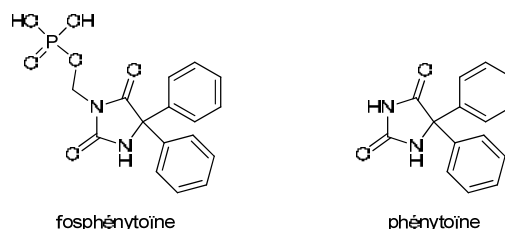


Figure 14 : Structures de la fosphénytoïne et de la phénytoïne

Une autre manière d'augmenter l'hydrophilie d'une molécule est d'incorporer dans sa structure un motif polyéthylène glycol (PEG). Les PEG ont été utilisés pour la dérivation de composés presque insolubles dans l'eau sur lesquels ils sont greffés de manière covalente. Suivant cette stratégie, des enzymes (*e.g.* asparaginase, methioninase, glutaminase), des protéines (*e.g.* fragments d'anticorps, granulocytes, interférons) ou encore des petites molécules (*e.g.* irinotecan, camptotecin, paclitaxel) ont été PEGylées dans le but d'améliorer leur solubilité, et donc leur biodisponibilité, augmentant ainsi leur efficacité antitumorale [140]. A titre d'exemple et afin de montrer le bénéfice en terme de biodisponibilité, considérons le cas du paclitaxel. Ce poison du fuseau n'est soluble dans l'eau qu'à hauteur de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, alors que son homologue PEGylé ($M = 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) se solubilise à hauteur de $666 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [141]. D'autres groupements polaires tels des sulfo-esters, des diméthylamino-acétates ou encore des hemisuccinates ont également été étudiés pour améliorer la solubilité aqueuse de principes actifs [133].

[138] Sohma Y. *et al.*, Development of water-soluble prodrugs of the HIV-1 protease inhibitor KNI-727: importance of the conversion time for higher gastrointestinal absorption of prodrugs based on spontaneous chemical cleavage. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4124-4135

[139] Varia S. A. *et al.*, Phenytoin prodrugs IV: hydrolysis of various 3-(hydroxymethyl)phenytoin esters. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1074-1080

[140] Pasut G. *et al.*, PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1177-1188

[141] Greenwald R. B. *et al.*, Highly water soluble taxol derivatives: 2'-polyethyleneglycol esters as potential prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2465-2470

II.2. Amélioration de la stabilité

Certains composés relativement instables chimiquement sont parfois trop rapidement métabolisés pour atteindre leur cible thérapeutique. La constitution de prodrogues peut permettre de lever ce problème par la protection des parties sensibles au métabolisme mais essentielles à l'activité. Pour le bambutérol, prodrogue de la terbutaline (**Figure 15**) utilisé dans le traitement de l'asthme aigu, les groupements phénoliques sont masqués pour une action plus durable sous forme de carbamates, hydrolysables par des cholinestérases ^[142].

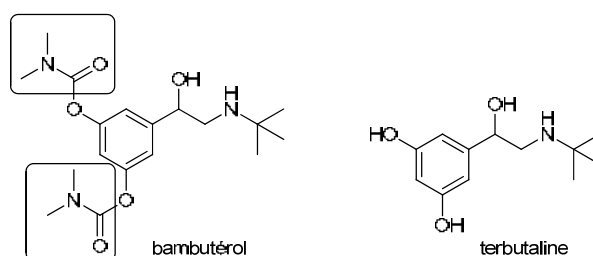


Figure 15 : Structures du bambutérol et de la terbutaline

Un autre exemple est celui de la docarpamine, une prodrogue de la dopamine (**Figure 16**), pour laquelle l'activation est en deux temps : les fonctions carbonates sont lysées dans l'intestin puis l'amide est hydrolysée au niveau du foie ^[143]. La formation de métabolites résultant d'oxydations et de *O*-sulfatations est ainsi réduite.

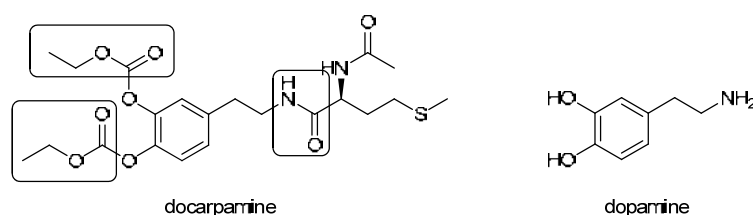


Figure 16 : Structures de la docarpamine et de la dopamine

II.3. Amélioration du ciblage : prodrogues vectorisées

L'une des clés dans la recherche de nouveaux médicaments réside dans l'amélioration de leur spécificité. Ainsi, les dernières décennies ont vu le développement de prodrogues associant vecteur et principe actif. La vectorisation peut se faire par une accumulation passive dans le tissu cible, ou bien de manière active en ciblant des transporteurs, des enzymes ou des antigènes membranaires spécifiques.

II.3.1. Vectorisation passive

Il a été démontré que par effet EPR ^[144] (Enhanced Permeation and Retention), des macromolécules (*e.g.* polymères naturels ou synthétiques de masse supérieure à 40 kDa) ou des nanoobjets (*e.g.* liposomes, nanoparticules) se concentrent dans les tumeurs. Cet effet est causé par la structure discontinue de l'endothélium vasculaire tumoral, associée à un défaut de drainage lymphatique.

Différents polymères ont démontré cliniquement leur utilité pour une rétention tumorale améliorée, une demi-vie plasmatique allongée et une toxicité systémique inexistante. Parmi eux, les polyéthylènes glycols (PEG), les poly-acides glutamiques ou encore les *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HMPA). De nombreux agents

[142] Tunek A. *et al.*, Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 3867-3876

[143] Yoshikawa M., Metabolism of dopamine prodrug, docarpamine. *Hypertens. Res.* **1995**, *18*, S211-S213

[144] Matsumura Y. *et al.*, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392

thérapeutiques ont été associés à ces derniers, par encapsulation ou bien de manière covalente. Les fonctions chimiques de couplage drogue / polymère peuvent être de nature très variées selon les groupements disponibles sur les macromolécules et les principes actifs étudiés : esters, carbamates, carbonates, liaisons peptidiques, oximes,...A titre d'exemple, citons des prodrogues de la camptothécine, du paclitaxel ou encore de la doxorubicine ^[145] actuellement en cours d'évaluation clinique.

II.3.2. Ciblage actif

Les cellules tumorales surexprimant un grand nombre d'enzymes, protéines, antigènes ou récepteurs, de nombreuses stratégies ont vu le jour pour exploiter ces différentiels et développer des thérapies vectorisées.

➤ Stratégie ADC (Antibody-Drug Conjugate) ^{[146],[147]}

De nombreux anticorps comme le trastuzumab (anti HER2/neu), le brentuximab (anti-CD30), le rituximab (anti-CD20), le bevacizumab (anti-VEGF-A) ou encore le gemtuzumab (anti-CD33) ont été approuvés par la FDA pour le traitement ciblé du cancer du sein et des lymphomes. Ces anticorps ont ensuite été couplés à de nombreux agents anticancéreux pour donner naissance à des thérapies vectorisées qui ont pour certaines été approuvées par la FDA : l'Adcetris®, conjugué du brentuximab avec la védotine (un anti-néoplasique, aussi appelé monométhylauristatine E), pour le traitement du lymphome d'Hodgkin et le Mylotarg®, conjugué du gemtuzumab et de la calichéamycine (un antibiotique cytotoxique) utilisé cliniquement pour le traitement de la leucémie myéloïde. Ce dernier a cependant été retiré du marché en 2010 suite à de nombreux problèmes de toxicité pourtant relevés bien auparavant ^{[148],[149]}.

➤ Stratégie ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy)

Cette stratégie, développée en parallèle par deux équipes dans la fin des années 80 ^{[150],[151]} est basée en général sur une action en deux temps (**Figure 17**).

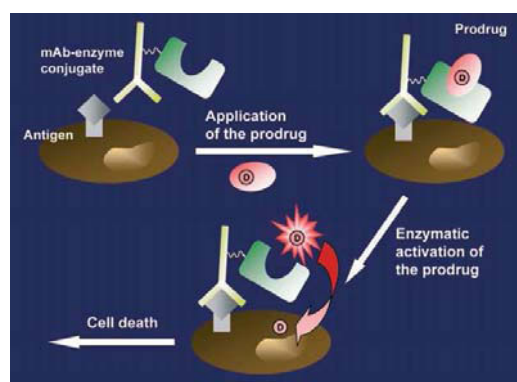


Figure 17 : Stratégie ADEPT ^[135]

[145] Khandare J. *et al.*, Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 359-397

[146] Ducry L. *et al.*, Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *21*, 5-13

[147] Teicher B. A. *et al.*, Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6389-6397

[148] Giles F. J. *et al.*, Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicin) therapy is associated with hepatic venoocclusive disease in patients who have not received stem cell transplantation. *Cancer* **2001**, *92*, 406-413

[149] Wadleigh M. *et al.*, Prior gemtuzumab ozogamicin exposure significantly increases the risk of veno-occlusive disease in patients who undergo myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **2003**, *102*, 1578-1582

[150] Bagshawe K. D., Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531-532

[151] Senter P. D. *et al.*, Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4842-4846

Un conjugué composé d'un anticorps spécifique des tissus tumoraux lié à une enzyme d'activation exogène est d'abord injectée par voie intraveineuse. Il se lie à l'antigène associé présent à la surface des cellules tumorales. Une prodrogue constituée d'un motif ligand de l'enzyme et d'un principe actif est ensuite injectée puis activée par l'action de l'enzyme. Par exemple, le système MFECPI constitué d'une protéine de fusion de l'enzyme bactérienne carboxypeptidase G2 (CPG2), de l'anticorps monocaténaire MFE-23 (anti-antigène carcino-embryonnaire) et d'une prodrogue de moutarde phénolique bis-iodée a été évalué cliniquement en phase I/II ^[152].

La stratégie ADEPT est néanmoins très complexe à mettre en œuvre, tant pour accéder aux conjugués qu'aux anticorps fonctionnalisés. D'autre part, le mécanisme de libération est associé à de nombreuses étapes aux rendements assez faibles (distribution de l'anticorps et de l'enzyme, internalisation, libération de la drogue,...). Ces différentes contraintes expliquent que cette stratégie soit restée au stade expérimental.

➤ Ciblage de transporteurs ou de récepteurs membranaires

Les transporteurs membranaires sont des protéines qui régulent l'apport de nutriments essentiels au développement des cellules tels les sucres, nucléosides, amino-acides ou peptides. Les cellules tumorales ayant des besoins accrus par rapport aux cellules saines, ces récepteurs sont surexprimés et/ou suractivés dans les tumeurs. Cette particularité a été exploitée par le développement de prodrogues les ciblant.

Parmi ces récepteurs, les transporteurs peptidiques sont les plus étudiés, notamment les transporteurs PEPT1, surexprimés dans la plupart des cancers. Divers substrats (résidus proline, lysine, asparagine) de PEPT1 ont été couplés avec un agent anticancéreux utilisé dans le traitement du cancer du colon, la floxuridine, par l'intermédiaire d'un groupement ester. Une inhibition sélective de la croissance tumorale dans les cellules surexprimant PEPT1 a été observée ^[153]. On notera également les travaux impliquant le ciblage des transporteurs multivitamines sodium-dépendants (SMVT).

Certaines substances exogènes ou endogènes essentielles sont surconsommées par les cellules tumorales. C'est le cas des acides gras polyinsaturés qui sont utilisés comme bioprécurseurs et source d'énergie pour la cellule. Des approches associant l'acide linoléïque ou l'acide arachidonique avec divers agents anticancéreux dont le paclitaxel ^[154] ont permis d'améliorer significativement l'activité antitumorale tout en diminuant les effets secondaires dus à la toxicité systémique.

L'acide folique (vitamine B9) retient également l'attention des chercheurs, car un grand nombre de cancers (cancer du sein, ovarien, carcinomes, tumeurs cérébrales,...) surexpriment les récepteurs qui lui sont associés ^[155]. De plus, même couplé à diverses structures chimiques, il maintient une très grande affinité pour son récepteur.

[152] Mayer A. *et al.*, A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFECPI and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6509-6516

[153] Landowski C. P. *et al.*, Targeted delivery to PEPT1-overexpressing cells: acidic, basic, and secondary floxuridine amino acid ester prodrugs. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 659-667

[154] Ganesh T., Improved biochemical strategies for targeted delivery of taxoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3597-3623

[155] Low P. S. *et al.*, Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 256-262

Ainsi, un large spectre de conjugués drogue-folate (taxol [156], 5-fluorouracile [157], camptothécine [158],...) ont été évalués en imagerie (essais cliniques pour le composé ^{111}In -DTPA-folate qui présente une importante affinité tumorale et une clairance rapide des organes non cibles [159]) et/ou pour une application en thérapie vectorisée. Un exemple illustrant cette dernière stratégie concerne le composé nommé EC145 (**Figure 18**) [160].

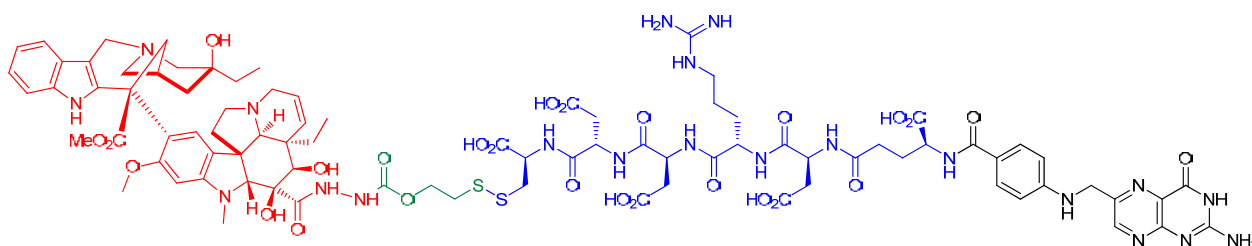


Figure 18 : Structure de la prodrogue EC145

L'acide folique (en noir) a été conjugué par l'intermédiaire d'un espaceur peptidique (Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys, en bleu) porteur d'une fonction hydrazine, qui assure la solubilité aqueuse de l'ensemble. La drogue (desacetylvinblastine monohydrazone, un dérivé d'alcaloïde de Vinca, en rouge) a été couplée par l'intermédiaire d'un espaceur (en vert) contenant un pont disulfure clivable dans les endosomes des cellules cancéreuses. EC145 a fait l'objet d'études précliniques qui ont montré une meilleure efficacité antitumorale et une toxicité systémique bien plus faible que l'alcaloïde seul chez des souris porteuses de lymphome [161], et est en cours d'évaluation clinique de phase II pour le traitement des cancers ovariens et des poumons. Cet exemple illustre parfaitement le bénéfice apporté par les prodrogues : les alcaloïdes de Vinca sont en effet connus pour leur très forte toxicité systémique, principale limite à leurs utilisations cliniques.

II.4. Prodrogues à libération sélective

Une autre approche des prodrogues consiste à se baser sur une libération sélective au niveau tumoral. Deux grands principes sont distingués pour l'activation, qui peut être réalisée par une enzyme ou certaines caractéristiques physico-chimiques. La stratégie ADEPT développée précédemment est également incluse dans ce type de prodrogues.

II.4.1. Libération enzymatique

Ce type de libération peut être réalisé par l'action d'enzymes surexprimées au niveau tumoral.

➤ Cascade enzymatique

Un des cas le plus représentatif de cette stratégie est celui d'une prodrogue du 5-fluorouracile (5-FU), la capécitabine. Le 5-FU est très utilisé en oncologie, notamment pour le traitement du cancer du sein et du cancer du colon. Cependant, un grand nombre d'effets secondaires (neurotoxicité, toxicités hématologique et pour les muqueuses,...) sont relevés pour 15 à 20 % des patients [162].

[156] Lee J. W. *et al.*, Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2397-2414

[157] Liu J. *et al.*, Targeted drug delivery to chemoresistant cells: folic acid derivatization of FdUMP[10] enhances cytotoxicity toward 5-FU-resistant human colorectal tumor cells. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5655-5663

[158] Henne W. A. *et al.*, Synthesis and activity of a folate peptide camptothecin prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350-5355

[159] Siegel B. A. *et al.*, Evaluation of ^{111}In -DTPA-folate as a receptor-targeted diagnostic agent for ovarian cancer: initial clinical results. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 700-707

[160] Vlahov I. R. *et al.*, Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrazone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096

[161] Reddy J. A. *et al.*, Preclinical evaluation of EC145, a folate-Vinca alkaloid conjugate. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4434-4442

[162] Ciccolini J. *et al.*, Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin. Colorectal Cancer* **2010**, *9*, 224-228

Le développement de la prodrogue capécitabine a partiellement levé ces restrictions : elle subit trois étapes de métabolisation successives (**Figure 19**) avant de générer le principe actif. La dernière étape fait intervenir la thymidine phosphorylase, spécifique des cellules tumorales ^[163]. La toxicité systémique est ainsi notablement diminuée.

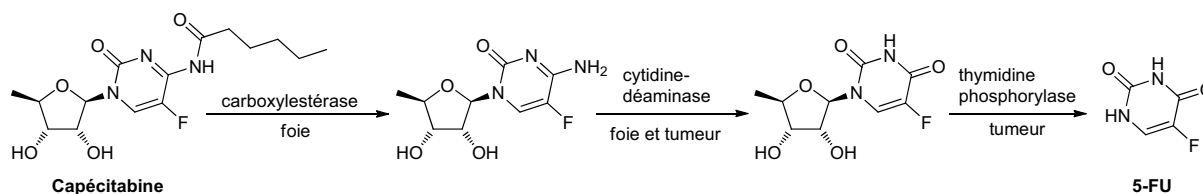


Figure 19 : Métabolisme de la capécitabine

➤ Cathepsines ^[164]

Les cathepsines, surexprimées dans de nombreux cancers, sont des enzymes protéolytiques responsables de la dégradation des membranes (cathepsine D) ou de la dégradation lysosomale de protéines (cathepsines B, H et L). Les séquences peptidiques de type Arg-Arg-X, Ala-Leu-X, Gly-Phe-Leu-Gly-X ou encore Ala-Leu-Ala-Leu-X sont substrats de ces enzymes et peuvent être couplés à des principes actifs.

➤ Autres enzymes

Sont également étudiées pour le développement de prodrogues ^[134] i) diverses enzymes telles les métalloprotéases matricielles (MMP-2 et MMP-9, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et du collagène) clivant des substrats de type Ac-Pro-Leu-Gln-Leu-X et Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-X, ii) les plasmines, responsables de la fibrinolyse et de la dégradation de protéines sériques sont présentes à de fortes concentrations dans l'environnement tumoral et agissent notamment sur des substrats de type D-Val-Leu-Lys-X, D-Ala-Phe-Lys-X ou D-Ala-Trp-Lys-X ou encore iii) la β -glucuronidase (hydrolyse de glucuronides).

II.4.2. Clivages fondés sur des paramètres physico-chimiques

Les tumeurs sont des milieux très particuliers : outre l'activité métabolique et angiogénique différente des cellules saines, les compartiments tumoraux intra et extracellulaires sont le siège de modifications physico-chimiques (e.g. pH, taux d'oxygène,...) qui tendent à les protéger des agressions chimiques, radioactives ou immunitaires.

➤ Effet du pH

La conversion du glucose en lactate est la principale source d'énergie des cellules tumorales (effet Warburg ^[165]) : l'activité glycolytique peut être jusqu'à 200 fois plus élevée que dans les cellules saines. Ce changement métabolique a pour conséquence de diminuer la valeur du pH dans les tissus tumoraux d'environ une unité de pH (pH = 6,0 à 6,5 dans les tissus tumoraux). De même, nous avons pu voir (chapitre 2 - paragraphe III.3.) qu'au sein de divers organelles (endosomes, lysosomes et mélanosomes), les valeurs de pH peuvent être comprises entre 4,0 et 6,5. Cette caractéristique permet d'envisager des prodrogues clivables aux pH acides. Ainsi, des fonctions de type acétal, cétal, imine, hydrazone, carbonylhydrazone, cis-acotinyle ou encore trityle sont pertinents pour une libération sélective en milieu acide (**Figure 20**).

[163] Marshall J. L. *et al.*, Capecitabine: fulfilling the promise of oral chemotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 733-743

[164] Singh Y. *et al.*, Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1802-1826

[165] Warburg O., On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309-314

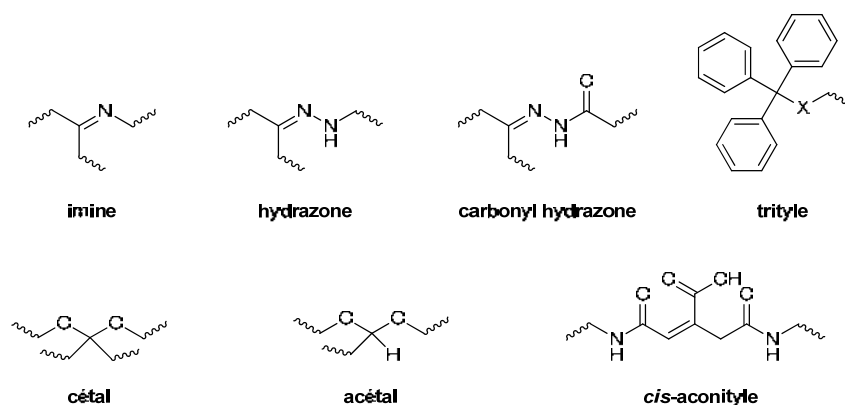


Figure 20 : Exemples de groupements sensibles à un pH acide

Des polymères de type poly-amidoamines comportant ce type de fonctions ont été mis au point pour la conception de prodrogues (vectorisation passive) et ont démontré des résultats intéressants : quasiment inchangés à pH physiologique (7,2 - 7,4), ils sont assez rapidement dégradés à pH = 5,0 et sont donc adaptés à une stratégie de prodrogue clivable en milieu acide [166]. Cependant, leur poids moléculaire (6,5 kDa) est trop faible pour le ciblage passif par effet EPR et l'absence de groupements fonctionnels ne permet pas encore la conjugaison d'agents actifs. Cette approche innovante nécessite donc encore une optimisation pour produire des polymères biodégradables adéquats à une vectorisation de composés anticancéreux.

➤ Effet de l'hypoxie

Les tumeurs résultent de la prolifération rapide et anarchique de cellules. Les amas cellulaires ainsi formés sont parfois peu vascularisés et donc appauvris en oxygène. Cet environnement réducteur particulier peut être mis à profit pour déclencher la libération d'un principe actif. En général, la partie clivable de la prodrogue est constituée pour ce type d'approche d'un motif nitroaryle, d'un *N*-oxide, d'une quinone ou encore d'un pont disulfure. Ils sont métabolisés par des espèces produites dans les cellules hypoxiques, comme des radicaux libres ou des électrophiles.

Par exemple, la tirapazamine [167] ou l'AQ4N [168], analogue d'anthraquinone (**Figure 21**) qui sont tous deux des prodrogues d'inhibiteurs de topoisomères II, ont fait l'objet d'études cliniques.

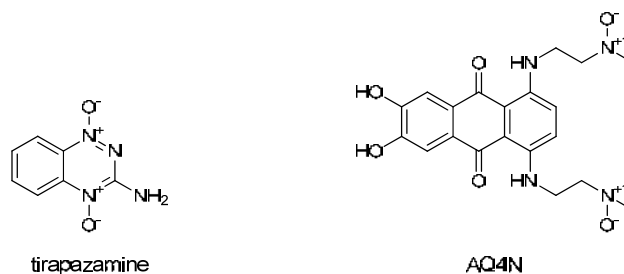


Figure 21 : Exemples de prodrogues à libération hypoxique

[166] Jain R. *et al.*, Synthesis and degradation of pH-sensitive linear poly(amidoamine)s. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457

[167] Reddy S. B. *et al.*, Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells. *Expert Opin. Inv. Drug* **2009**, *18*, 77-87

[168] Papadopoulos K. P. *et al.*, A phase 1 open-label, accelerated dose-escalation study of the hypoxia-activated prodrug AQ4N in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7110-7115

II.5. Doubles prodrogues

Les doubles prodrogues, pro-prodrogues ou prodrogues auto-clivables sont des édifices qui nécessitent plus d'une étape d'activation avant de générer l'agent actif. La capécitabine décrite plus haut entre en théorie dans ce champ, mais les doubles prodrogues sont en général décrites comme des édifices nécessitant une intervention métabolique suivie d'une ou plusieurs transformations spontanées. Ces composés sont nommés espaceurs auto-immolatifs ou auto-clivables. Leur développement a été inspiré par les limites des prodrogues classiques : par exemple, dans le cas d'une activation enzymatique, les prodrogues sont en règle générale des mauvais substrats des enzymes visées en raison de l'encombrement stérique lié à la présence d'un principe actif souvent encombrant. Pour limiter cet effet, des structures incorporant trois sous-unités ont été développées : elles comportent une gâchette (servant de déclencheur : la première activation se fait à ce niveau), un espaceur auto-clivable et une drogue (*Schéma 6*).

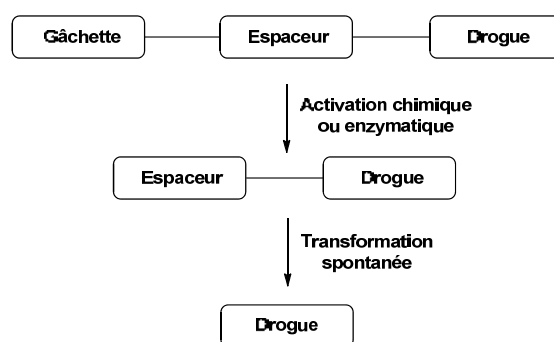


Schéma 6 : Mécanisme général des prodrogues auto-clivables

Les principes de libération reposent sur une activation primaire (enzymatique ou physico-chimique) suivie d'une réorganisation intramoléculaire : un grand nombre d'espaceurs auto-clivables ont été développés, permettant différents mécanismes de libération ^{[169],[170]} : par éliminations benzyliques (1,4) et (1,6), élimination cinnamique (1,8), cyclisation intramoléculaire (formation d'urées, de lactones,...) ou encore β -élimination. Les espaceurs les plus couramment utilisés et leurs mécanismes de libération du principe actif sont représentés *Schéma 7*.

[169] Gomes P. *et al.*, Cyclization-activated prodrugs. *Molecules* **2007**, *12*, 2484-2506

[170] Papot S., Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2002**, *2*, 155-185

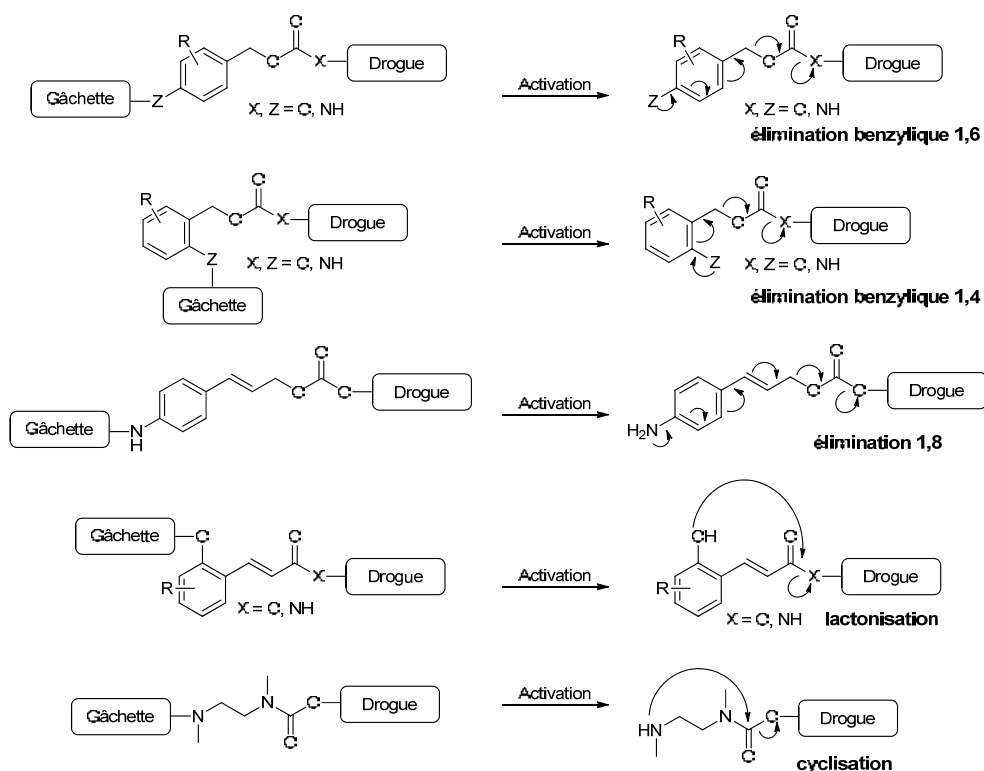


Schéma 7 : Quelques exemples d'espaceurs auto-clivables et libérations associées

Parmi les nombreux exemples de prodrogues auto-clivables ayant fait l'objet d'évaluations précliniques, citons les travaux de deGroot *et al.* [171] basés sur des prodrogues du paclitaxel comportant une gâchette tripeptidique, qui une fois activée par la plasmine libère une fonction amine primaire pouvant réagir sur une fonction carbonate ou carbamate de l'espaceur et libérer le paclitaxel par cyclisation intramoléculaire (**Figure 22**, à gauche) ou élimination benzylique 1,6 (**Figure 22**, à droite).

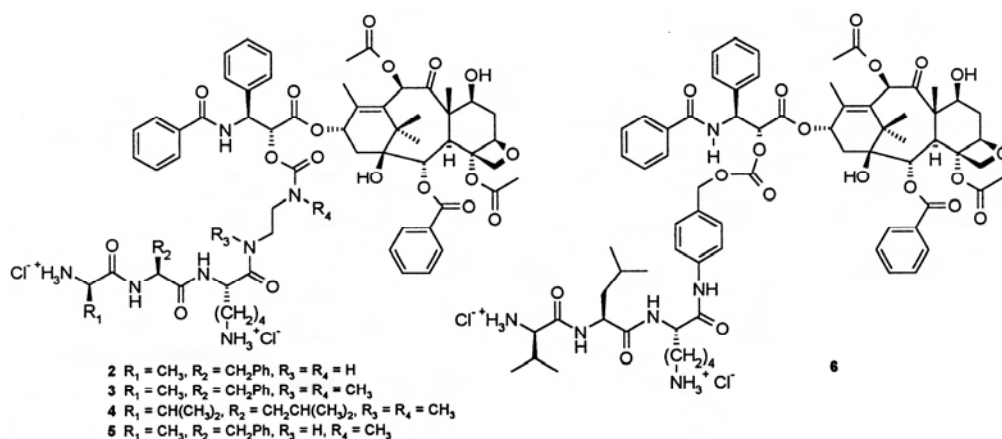


Figure 22 : Prodrogues du paclitaxel incorporant un motif auto-clivable

In vitro, l'incubation de ces prodrogues dans un tampon contenant de la plasmine humaine a induit la libération de paclitaxel libre pour les prodrogues **5** et **6** avec des demi-vies d'hydrolyse enzymatique (mesurées par électrophorèse capillaire) respectives de 3,5 et 42 minutes. La suite du processus de libération a également été étudié en détail : la libération du paclitaxel après clivage peptidique de la prodrogue **5** a nécessité 23 h tandis que pour la prodrogue **6**, cette libération est presque instantanée.

[171] de Groot F. M. H. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of Paclitaxel: selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3093-3102

Ces stratégies de « double prodrogue » constituent une part importante de l'avenir de la chimiothérapie anticancéreuse : elles devraient permettre en effet, grâce à une libération plus spécifique, d'augmenter l'index thérapeutique de nombreux principes actifs.

III. Prodrogues et mélanome

Nous avons pu voir que l'agent thérapeutique de référence (la dacarbazine) est une prodrogue activée par voie hépatique. Hormis cet exemple, les stratégies décrites tout au long de ce chapitre n'ont été que peu exploitées dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements du mélanome. Ceci s'explique par la difficulté de trouver des cibles viables et spécifiques du mélanome permettant l'activation de prodrogues ou la vectorisation de principes actifs. Cependant, une enzyme retient l'attention : la tyrosinase. Elle est présente quasiment exclusivement dans les mélanocytes et est surexprimée dans les cellules tumorales^{[172],[173]}. Ce différentiel en fait donc une base intéressante pour la stratégie baptisée MDEPT (Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy) développée en 1985 par Morrison *et al.*^[174]. Ces travaux restés sans suite étaient basés sur l'activation de la 2,4-dihydroxyphénylalanine par la tyrosinase fongique (structurellement très proche de la tyrosinase humaine), qui conduit à une quinone cytotoxique.

D'autres travaux plus récents ont porté sur la synthèse de phénols ou de catéchols générant des quinones cytotoxiques après transformation par la tyrosinase. Des prodrogues utilisant des motifs auto-clivables ont été ensuite conçues et évaluées : des dérivés de triazènes couplés à la dopamine ou à la tyramine (**Schéma 8**)^[175] sont libérés après activation par la tyrosinase.

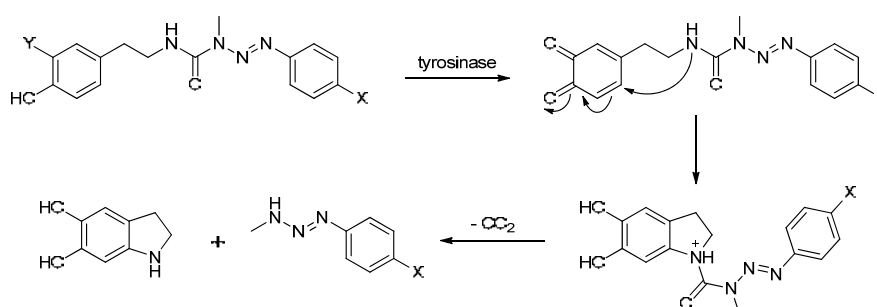


Schéma 8 : Prodrogue de triazène activée par la tyrosinase

De la même façon, des prodrogues dérivées de la 6-aminodopamine et du 4-aminophénol libèrent les principes actifs (*i.e.* moutarde azotée, daunomycine) par action de la tyrosinase suivie de réarrangements moléculaires^[176]. L'étude suivante incorpore une fonction urée ou thiourée entre la gâchette (phénol ou catéchol) et la moutarde azotée (**Figure 23**)^[177].

[172] Vielkind U. *et al.*, Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosine activity and degree of malignancy. *Cancer Res. Clin. Oncol.* **1977**, *90*, 285-299

[173] Cormier J. N., Comparative analysis of the *in vivo* expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J. Immunother.* **1998**, *21*, 27-31

[174] Morrison M. E. *et al.*, *In vitro* studies of 2,4-dihydroxyphenylalanine, a prodrug targeted against malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2960-2964

[175] Perry M. J. *et al.*, Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: Activation by tyrosinase and implications for prodrug design. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3228-3234

[176] Jordan A. M. *et al.*, Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1549-1558

[177] Knaggs S. *et al.*, New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT). *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4002-4010

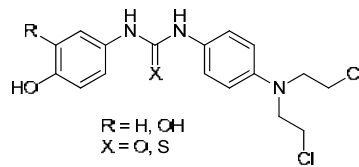


Figure 23 : Prodrogues urée et thiourée activables par la tyrosinase

Les prodrogues ainsi synthétisées ont été soumises à des études de stabilité dans un tampon phosphate et dans le sérum bovin. La tyrosinase consommant du dioxygène, l'oxymétrie a été réalisée et a démontré que ces composés sont oxydés à une vitesse allant de 70 à 78 % de la valeur obtenue pour le substrat naturel, la L-tyrosine ($V_{\max} = 17 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ dans les conditions de l'étude). Les analyses par chromatographie liquide haute performance ont permis de constater le relargage de la moutarde azotée uniquement pour les espaceurs incorporant une fonction urée.

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

CHAPITRE 1

Objectifs de recherche

I. Objectifs généraux

La chimiothérapie du mélanome est principalement limitée par le manque de spécificité des principes actifs utilisés, à l'origine d'importants effets secondaires dus à la toxicité systémique des drogues.

Pour contourner ces limites et comme nous l'avons vu précédemment, les stratégies de ciblage ou de vectorisation des principes actifs anticancéreux (cf. Bibliographie - Chapitre 5 - I.) pourraient permettre d'accéder à des traitements efficaces de la maladie disséminée d'index thérapeutiques élevés. Suivant cette hypothèse, mes travaux de thèse ont porté sur la conception, la synthèse et l'évaluation d'un ensemble de prodrogues vectorisées pour la chimiothérapie du mélanome métastaté.

Ces prodrogues seront constituées d'un vecteur ciblant les mélanomes, d'un principe actif anticancéreux et d'un espaceur clivable doivent être capable de libérer le principe actif une fois l'ensemble distribué dans la tumeur (**Figure 24**) :

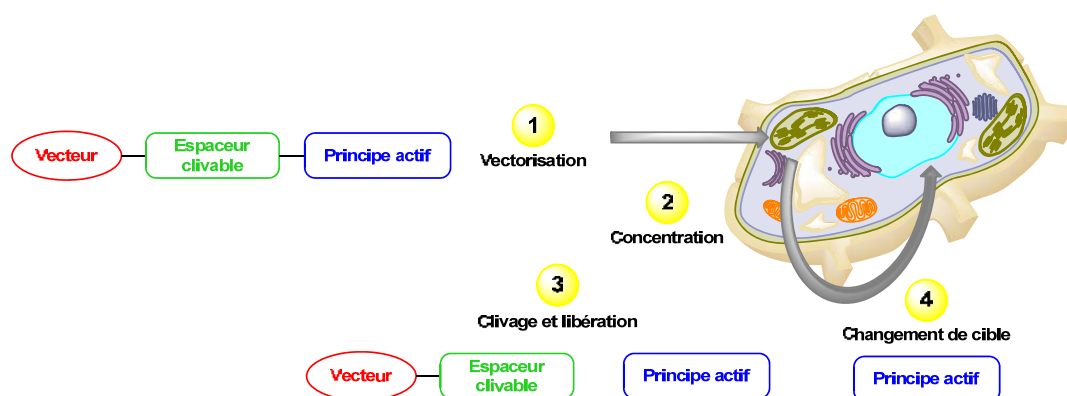


Figure 24 : Représentation schématique de la stratégie envisagée

II. Choix du vecteur

La vectorisation sera assurée par le meilleur traceur des mélanines précédemment décrit (cf. Bibliographie - Chapitre 5 - IV.1.) : ICF01012, qui présente un profil pharmacocinétique idéal pour cette application. Sa fixation tumorale est rapide (distribution au niveau de la tumeur en moins d'une heure), importante (jusqu'à 40 % de la dose injectée par gramme de tumeur) et durable (respectivement 12,5 % et 3,5 % de la dose injectée par gramme de tumeur aux temps 72 h et 8 j post-injection). Par ailleurs, la clairance d'ICF01012 des organes non cibles est rapide (< 24 h).

III. Choix du principe actif

De nombreuses équipes (cf. Bibliographie - Chapitre 6 - II.3.) travaillent sur des stratégies de prodrogues vectorisées de principes actifs anticancéreux largement utilisés en clinique (taxanes, agents alkylants,...). La plupart de ces études sont basées sur un modèle *in vitro* bâti pour valider la libération de la drogue, évaluer un différentiel de cytotoxicité entre la prodrogue et la drogue ou bien renseigner sur la validité du ciblage (*i.e.* études ligands / récepteurs). La plupart de ces approches restent bien souvent sans suite car même si les modèles *in vitro* peuvent parfois être très prédictifs du vivant, le passage à des évaluations pharmacologiques sur modèles animaux fait fréquemment émerger des impondérables liés par exemple au métabolisme ou encore à la distribution des composés étudiés.

Pour ces différentes raisons, et avant d'envisager l'incorporation d'un principe actif pertinent pour la thérapie (e.g. dacarbazine, anti-Braf,...), nous avons souhaité utiliser un principe actif « modèle » compatible avec les évaluations *in vitro* et *in vivo* liées à notre concept.

III.1. Pré-requis

Cette thèse constituant le point de départ de la stratégie de chimiothérapie vectorisée du mélanome dans notre laboratoire, nous avons souhaité étudier un principe actif permettant de faciliter les études *in vitro* comme *in vivo*. Parmi la gamme d'agents anticancéreux, notre choix a été basé sur différents critères :

- la fonctionnalisation : le principe actif devait permettre le greffage du vecteur par une large variété de fonctions chimiques, et ce de manière relativement aisée.

- l'évaluation *in vitro* : les prodrogues ne devaient pas être actives avant la libération du principe actif. Un grand nombre d'agents alkylants ont donc par exemple été écartés.

- l'évaluation *in vivo* : si le principe actif possédait dans sa structure une position ou un atome permettant l'incorporation d'un radioisotope, l'utilisation des outils d'imagerie et de quantification disponibles en routine au laboratoire serait alors facilitée.

- le coût : beaucoup de principes actifs démontrant une activité cytotoxique de l'ordre du nanomolaire sont soit commerciaux mais à des prix très élevés, soit difficilement accessibles par voies de synthèse (les taxanes en sont l'exemple parfait).

III.2. L'IUdR

Pour répondre au mieux à ces critères, notre choix s'est porté sur la (+)-5-iodo-2'-déoxyuridine (désignée IUdR par la suite), un analogue de la déoxythymidine (**Figure 25**).

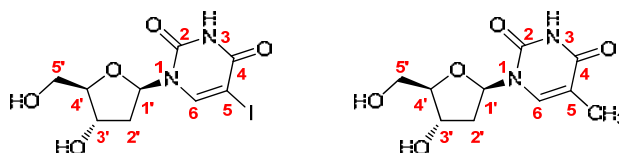


Figure 25 : Structures de l'IUdR et de la déoxythymidine

L'IUdR a été décrite pour la première fois en 1959^[178]. Elle est constituée d'une base pyrimidique (l'uracile) iodée en position 5 et d'un résidu osidique 2'-déoxyribose. C'est un antimétabolite analogue de la déoxythymidine, elle-même précurseur du déoxyribonucléotide thymidine-5'-monophosphate constitutif de l'ADN. En effet, l'atome d'iode présent sur l'IUdR possède un rayon de Van der Waals équivalent à celui du groupement méthyle de la déoxythymidine (respectivement 2,0 et 2,15 Å), lui permettant ainsi d'être incorporé à l'ADN lors de la répliation^[179]. La présence de cet halogène entraîne cependant un défaut d'appariement de bases A-T qui cause des mutations ponctuelles à l'origine de la cytotoxicité.

[178] Prusoff W. H., Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295-296

[179] Eidinoff M.L. *et al.*, Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science* **1959**, *129*, 1550-1551

L'IUdR est principalement utilisée en clinique pour le traitement du virus *Herpes Simplex* [180] mais est également l'objet de différentes recherches portant sur son potentiel radiosensibilisant [181] à une irradiation externe ou comme outil pour l'analyse cinétique de mécanismes cellulaires [182]. Plus récemment, l'IUdR radioiodée a été utilisée conjointement avec le methotrexate pour le traitement de la méningite néoplasique [183].

Les caractéristiques de l'IUdR conviennent parfaitement aux critères de choix énoncés plus haut :

- elle est fonctionnalisable sur la partie osidique par de nombreuses liaisons chimiques *via* ses fonctions alcools,

- elle s'adapte parfaitement aux méthodes d'évaluation maîtrisées au laboratoire :

- *in vitro* : son mode d'action (incorporation à l'ADN) est compatible avec une approche de prodrogues. En effet, tant que l'IUdR n'est pas libérée sous sa forme initiale (fonctions alcools en 3' et 5' libres), elle ne peut être reconnue ni incorporée à l'ADN et n'a donc pas d'activité cytotoxique.

- *in vivo* : son atome d'iode est échangeable avec des radioisotopes tels que l'iode 123 ou 125, émetteurs de rayons γ (et d'électrons Auger) qui permettent une étude quantitative d'incorporation à l'ADN et le suivi de la biodistribution par imagerie scintigraphique sur un modèle de petit animal.

- elle est relativement moins coûteuse (environ 200 € pour 5 g) que de nombreux agents anticancéreux et est disponible commercialement en grandes quantités (dizaines de grammes).

Enfin, une étude récente [184] a démontré que l'IUdR est un excellent modèle pour évaluer une stratégie de chimiothérapie vectorisée. Elle a été couplée à un stéroïde analogue d'hormones sexuelles présentant une affinité pour les récepteurs androgènes surexprimés dans un grand nombre de cancers. Le radiomarquage du conjugué à l'iode 125 a permis de valider la vectorisation (par biodistribution), la libération de [¹²⁵I]IUdR et son incorporation à l'ADN.

III.3. Radioiodation de l'IUdR

Afin de valider la vectorisation des prodrogues, une étude de biodistribution par imagerie scintigraphique doit être réalisée. A ces fins, la radioiodation de la base pyrimidique de l'IUdR est nécessaire (**Figure 26**).

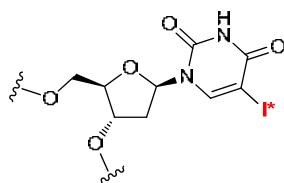


Figure 26 : IUdR radioiodée en position 5

[180] Viera M. H. *et al.*, Herpes simplex virus and human papillomavirus genital infections: new and investigational therapeutic options. *Int. J. Dermatol.* **2010**, *49*, 733-749

[181] Taverna P. *et al.*, Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 838-846

[182] Hoshino T. *et al.*, Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int. J. Cancer* **1992**, *50*, 1-5

[183] Rebischung C. *et al.*, First human treatment of resistant neoplastic meningitis by intrathecal administration of MTX Plus ¹²⁵IUdR. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 1123-1129

[184] Kortylewicz Z. P. *et al.*, Radiolabeled 5-Iodo-3'-O-(17 β -succinyl-5 α -androstan-3-one)-2'-deoxyuridine and Its 5'-Monophosphate for Imaging and Therapy of Androgen Receptor-Positive Cancers: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5124-5143

III.3.1. Radioisotopes de l'iode

L'iode est un élément monoisotopique car parmi ses 39 isotopes (de l'iode 107 à l'iode 145), un seul est stable : l'iode 127. Les différents radioisotopes couramment utilisés en Médecine Nucléaire sont : l'iode 124 (émetteur de positons), l'iode 131 (émetteur β^- et γ), l'iode 123 (émetteur γ) et l'iode 125 (émetteur γ).

L'iode 124 est majoritairement utilisé en imagerie TEP, parfois en remplacement du fluor 18 pour sa demi-vie plus longue (4,18 j contre 1 h 50).

L'iode 131 est lui utilisé pour des applications en radiothérapie pour son rayonnement β^- de 606 keV. Son émission γ peut également être détectée en imagerie γ .

L'iode 123 et l'iode 125 sont les isotopes utilisés pour l'imagerie γ . Ils sont tous deux également émetteurs d'électrons Auger de faibles parcours énergétiques mais de transfert d'énergie linéaire (TEL) élevé. Une application en radiothérapie interne est donc possible s'ils sont associés à une structure s'accumulant dans les cellules ou mieux encore s'incorporant à l'ADN.

Notre choix s'est porté sur l'iode 125, très largement utilisé au laboratoire. Son émission γ de plus faible énergie que celle de l'iode 123 et sa demi-vie plus longue (59,4 j contre 13,2 h) sont des paramètres favorables à notre projet, pouvant impliquer une étude sur des temps longs (2 semaines). Du point de vue de radioprotection, la faible énergie du rayonnement γ associé constitue également un facteur déterminant.

III.3.2. Radioiodation à l'iode 125

Les radioidations, et plus généralement les radiohalogénations, sont très courantes et largement décrites dans la littérature : les différentes méthodes utilisées sont listées dans une revue complète [185]. Les dérivés iodés aliphatiques sont instables : les radioiodations sont donc uniquement réalisées sur des positions aromatiques et dans une moindre mesure vinyliques. Les principaux modes d'introduction de l'iode 125 sur un cycle aromatique ou hétéroaromatique sont les suivants (**Schéma 9**) :

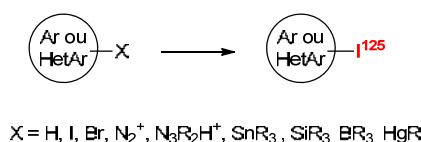


Schéma 9 : Radioiodations d'un cycle aromatique

- par substitution électrophile aromatique directe ($X = H$),
- par échange isotopique ou non isotopique ($X = I, Br$),
- par décomposition de sels de diazoniums ou de triazènes ($X = N_2^+, N_3R_2H^+$),
- par iododémétallation de divers précurseurs organométalliques : dérivés d'étain, de silicium, de bore, de mercure,...($X = SnR_3, SiR_3, BR_3, HgR, \dots$).

Les trois premières méthodes impliquent généralement des conditions drastiques (milieux fortement oxydants, températures élevées,...) incompatibles avec notre approche impliquant des espaceurs potentiellement fragiles. Notre choix s'est donc orienté vers la iododémétallation dont les conditions réactionnelles sont plus douces.

[185] Bolton R., Radiohalogen incorporation into organic systems. *J. Labelled Compd. Rad.* **2002**, *45*, 485-528

Parmi les précurseurs organométalliques, les trialkylstannyles sont très largement décrits dans la littérature (notamment pour l'IUdR) et présentent une excellente stabilité, y compris en solution aqueuse. Pour des raisons de moindre toxicité notamment, nous avons dans un premier temps choisi d'utiliser des dérivés tributylstannyles. Leur introduction peut être réalisée par un couplage de type Stille impliquant un complexe de palladium (0) ou de palladium (II) et de l'hexabutyldiétain [186].

L'introduction du radioisotope se déroule ensuite à température ambiante par substitution électrophile aromatique (SE_{ar}) à partir d'iodure de sodium radioactif [^{125}I]NaI en présence d'un oxydant doux (e.g. acide peracétique [187], chloramine T, iodogène,...) qui permet de générer *in situ* des iodoniums électrophiles I^+ .

IV. L'espaceur clivable

IV.1. Espaceurs « classiques »

Nous avons pu voir lors de l'étude bibliographique que les prodrogues peuvent comporter une grande variété d'espaceurs clivables impliquant toutes sortes de fonctions chimiques (cf. Bibliographie - Chapitre 6 - II.). Dans un premier temps, nous avons souhaité synthétiser des espaceurs simples de type ester, carbonate, carbamate, acétal,..., dont le choix est conditionné par la seule présence sur l'IUdR de groupements hydroxyyles aisément fonctionnalisables (**Figure 27**).

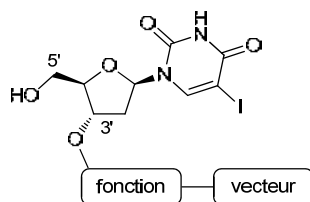


Figure 27 : Structure générale des prodrogues envisagées

La fonctionnalisation de l'IUdR en position 3' a été choisie préférentiellement à la position 5' pour des raisons de stabilité relative : l'encombrement de la position 3' est à l'origine d'une stabilité *a priori* accrue comparativement à la position 5'. De plus, la monoprotection sélective de l'IUdR dans cette position est aisément réalisable par différents groupements (trityle, diméthoxytrityle, trialkylsilyles, benzoate,...).

Le vecteur ICF01012 peut quant à lui être fonctionnalisé sur une des chaînes alkyles portées par l'amine tertiaire. Il a en effet été montré [124],[125] que la modification structurale de cette position n'entraîne pas de variation de l'affinité à la mélanine synthétique. L'alkylation de l'amine secondaire (**Figure 28**) déjà disponible au laboratoire permet ainsi l'introduction d'une grande variété de bras fonctionnalisés.

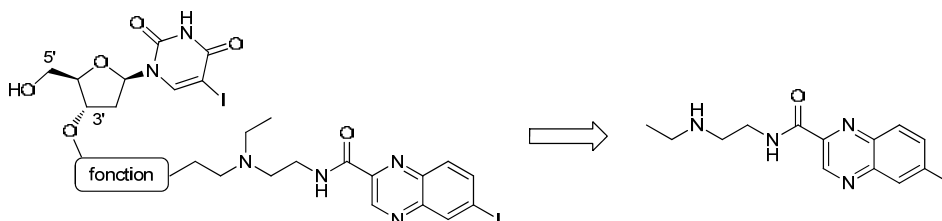


Figure 28 : Fonctionnalisation du vecteur via l'amine secondaire

[186] Azizian H. *et al.*, Synthesis of organotrialkylstannanes. The reaction between organic halides and hexaalkyldistannanes in the presence of palladium complexes. *J. Organomet. Chem.* **1981**, *215*, 49-58

[187] Baranowska-Kortylewicz J. *et al.*, Radiolabeling kit / generator for 5-radiohalogenated uridines. *J. Labelled Compd. Rad.* **1994**, *34*, 513-521

IV.2. Espaceurs auto-clivables

Dans un second temps, et sur la base des travaux de la stratégie MDEPT décrits plus tôt dans ce manuscrit (cf. Bibliographie - chapitre 6 - III.), nous avons envisagé le développement de prodrogues activables par la tyrosinase comportant un espaceur auto-clivable. Nous avons choisi de concevoir, synthétiser et évaluer des conjugués qui seront désignés par la suite par le terme « prosonde » par analogie avec le terme « prodrogue ». La structure générale de ces prosondes est représentée ci-dessous (**Figure 29**).

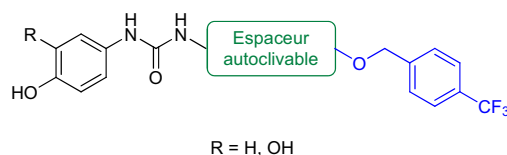


Figure 29 : Structure générale des prosondes

Ces prosondes sont constituées :

- d'un substrat de la tyrosinase de type phénol ou catéchol (en noir) et d'une fonction de couplage de type urée (validée par les travaux antérieurs de MDEPT),
- d'un espaceur auto-clivable : après oxydation du phénol ou du catéchol en quinone par la tyrosinase, l'amine primaire résultant de la décomposition de l'urée permettra la libération de la sonde par différents réarrangements intramoléculaires précédemment décrits (cf. Bibliographie - Chapitre 6 - II.5.)
- d'une sonde (l'alcool 4-trifluorométhylbenzylique, en bleu) permettant une détection UV ou par RMN du fluor pour l'étude du mécanisme et de la cinétique de libération.

Les voies employées pour la synthèse de ces prosondes doivent pouvoir s'adapter ensuite aisément à l'incorporation du vecteur et de l'IUdR ou d'un autre principe actif.

V. Démarches générales

➤ Prodrogues « classiques »

L'objectif principal de ces travaux est de valider la vectorisation d'un principe actif anticancéreux par le vecteur ICF01012. La démarche adoptée est la suivante :

1°) Synthèse

- rétrosynthèse pour rechercher la voie de synthèse *a priori* la plus générale et la plus adaptée,
- réalisation et optimisation des synthèses puis identification par déterminations structurales (RMN ¹H, ¹³C et 2D, spectrométrie de masse). Afin de faciliter la lecture, les déterminations structurales sont présentées dans cette partie sous forme d'encarts présentant les éléments majeurs, pour chaque étape et comparativement au produit de départ de l'étape concernée. Les attributions complètes sont détaillées dans la partie expérimentale.

2°) Etudes de stabilités *in vitro* par chromatographie liquide hautes performances (CLHP) dans différents milieux pour la présélection des prodrogues à évaluer *in vivo*.

3°) Etudes de métabolisme *in vitro* sur microsomes hépatiques.

4°) Evaluations *in vivo*

- synthèse des précurseurs pour le radiomarquage puis marquage à l'iode 125.
- étude de biodistribution *in vivo* par imagerie scintigraphique et par prélèvement et comptage des organes d'intérêt, pour valider la vectorisation.

➤ Prodrogues auto-clivables

Ce volet a été consacré à une étude plus poussée de l'espaceur, dont le mode de libération (action de la tyrosinase) peut en lui-même induire une spécificité dans notre stratégie de thérapie vectorisée. La démarche générale est la suivante :

1°) Synthèse

- rétrosynthèse et détermination d'une voie de synthèse généralisable à l'incorporation d'autres structures que la sonde,
- synthèse des synthons (substrat de la tyrosinase, espaceur, sonde) puis synthèse des prosondes et déterminations structurales,
- synthèse d'une prosonde incorporant le vecteur.

➤ Contributions

Concernant les prodrogues « classiques », j'ai réalisé l'intégralité de la conception, des synthèses, des radiosynthèses et des déterminations structurales décrites dans ce manuscrit, et collaboré activement au suivi des évaluations *in vitro* (stabilités, métabolisme) réalisées au sein du service de Chimie Analytique du laboratoire. Les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées par les biologistes de l'équipe 2 du laboratoire.

J'ai également été à l'origine de l'initiation au laboratoire de l'application de l'approche MDEPT à des prodrogues vectorisées comportant un espaceur auto-clivable et réalisé la totalité de la conception, des synthèses et déterminations structurales associées. Les évaluations *in vitro* réalisées dans cette approche ont également été assurées par les membres du service de Chimie Analytique.

CHAPITRE 2

*Prodrogues à espaceur « classique »,
première génération*

Comme nous l'avons dans le chapitre précédent, un certain nombre de fonctions chimiques peuvent être utilisées comme espaceur entre l'IUdR et le vecteur ICF01012. Elles sont de natures variées et *a priori* susceptibles de libérer le principe actif par différents mécanismes : hydrolyse enzymatique (ester, carbonate, carbamate) ou hydrolyse non-enzymatique (ester, carbonate, acétal). Les structures correspondantes sont présentées dans la **Figure 30** suivante :

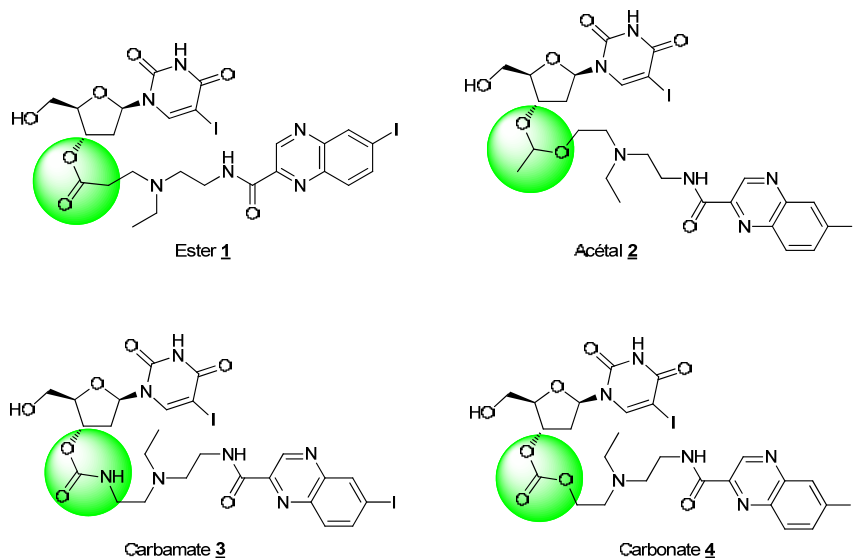


Figure 30 : Structures des prodrogues envisagées

L'accès à ces différentes prodrogues a été envisagé selon le schéma rétrosynthétique suivant (**Schéma 10**) :

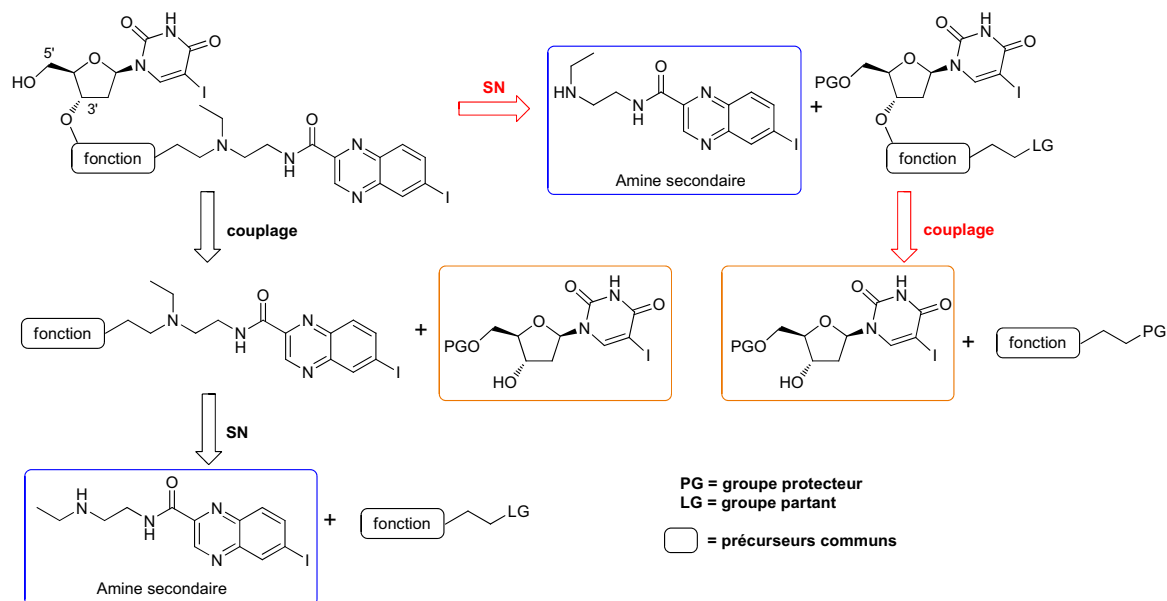


Schéma 10 : Rétrosynthèse générale des prodrogues classiques

Deux stratégies convergentes peuvent permettre d'obtenir les prodrogues souhaitées, par inversion des étapes principales d'alkylation de l'amine secondaire et de couplage visant à former la fonction espaceur : dans les deux cas, le bras espaceur est au préalable fonctionnalisé. La voie décrite en noir commence par la substitution nucléophile de ce fragment par le vecteur puis le couplage à l'IUdR tandis que la voie alternative en rouge implique un couplage à l'IUdR avant substitution nucléophile de l'amine secondaire. La déprotection en dernière étape conduit aux prodrogues finales.

I. Synthèses de la première génération de prodrogues

I.1. Synthèse des précurseurs communs

D'après le schéma rétrosynthétique précédent, les précurseurs communs aux voies de synthèse menant aux prodrogues **1** à **4** sont l'IUdR protégée en position 5' (en orange) et l'amine secondaire du vecteur (en bleu). Leur synthèse est décrite dans ce paragraphe, ainsi que les déterminations structurales complètes associées.

I.1.1. Protection de l'IUdR

Le choix du groupement protecteur est crucial car il doit présenter une bonne stabilité dans les divers milieux envisagés (acide, basique, nucléophile,...) pour les voies de synthèse des prodrogues « classiques », tout en permettant une déprotection quantitative en dernière étape dans des conditions douces. La protection sélective de l'IUdR en position 5' est en général réalisée par des groupements très encombrants : les groupements trityle ou diméthoxytrityle. La déprotection de ces groupements intervient typiquement en milieu acide concentré, conditions incompatibles avec certains des espaceurs envisagés (acétal, cétal). Nous nous sommes alors orientés vers les dérivés d'organosilanes, très largement utilisés dans la chimie des sucres et des nucléosides. Parmi la grande diversité des groupements silylés, c'est le triisopropylsilyle (TIPS) qui a retenu notre attention, pour son excellente stabilité en milieux acide et basique et pour son large éventail de conditions de déprotection à disposition ^[188]. La sélectivité de la protection est assurée par la différence de réactivité entre les fonctions alcools primaire (position 5') et secondaire (position 3') de l'IUdR. Elle est réalisée selon le **Schéma 11** suivant par adaptation d'un protocole utilisé pour la protection de l'IUdR par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) en position 5' ^[189].

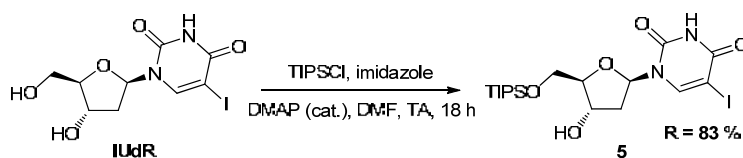


Schéma 11 : Protection de l'IUdR en position 5'

Cette synthèse se déroule dans un solvant polaire, le *N,N*-diméthylformamide (DMF), dans des conditions classiques de silylation (chlorure de silane et imidazole). La *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) en quantité catalytique (10 %) augmente l'encombrement par la formation d'un intermédiaire réactionnel avec le triisopropylchlorosilane (TIPSCl), favorisant ainsi l'attaque de l'alcool le moins encombré. Le composé **5** est ainsi obtenu avec une excellente sélectivité (la formation du produit protégé en position 3' n'a jamais été constatée) et un bon rendement (83 %) permettant l'extension de la synthèse à l'échelle d'une dizaine de grammes.

Comme évoqué précédemment, le synthon IUdR silylé **5** est commun à l'ensemble des prodrogues décrites dans ce manuscrit. Aussi, une attention particulière a été portée à la détermination structurale par RMN ¹H et ¹³C. En effet, les déplacements chimiques de RMN susceptibles d'être significativement modifiés par les différentes étapes de synthèse sont les protons et carbone en position 3' (position de greffage de l'espaceur) ainsi que le proton et le carbone en position 6 (lors des déiodostannylation) de l'IUdR. La détermination structurale de

[188] Wuts P. G. M. *et al.*, Silyl ethers. *Greene's Protective Groups in Organic Syntheses 4th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey 2007, 165-222

[189] Moharram S. *et al.*, Design and synthesis of 3'- and 5'-O-(3-benzenesulfonylfuroxan-4-yl)-2'-deoxyuridines: biological evaluation as hybrid nitric oxide donor-nucleoside anticancer agents. *J. Med. Chem.* 2004, *47*, 1840-1846

l'IUdR protégée **5** est réalisée par les techniques classiques d'analyses RMN (^1H , ^{13}C , 2D ^1H - ^1H COSY, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^{13}C HMBC et 2D ^1H - ^1H NOESY), spectroscopie infrarouge et spectrométrie de masse (**Figures 32 à 38**).

La numérotation des atomes a été établie comme indiqué par la **Figure 31** ci-dessous :

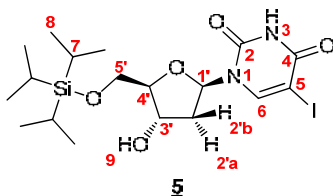


Figure 31 : Numérotation périphérique de l'IUdR protégée **5** utilisée pour la détermination structurale

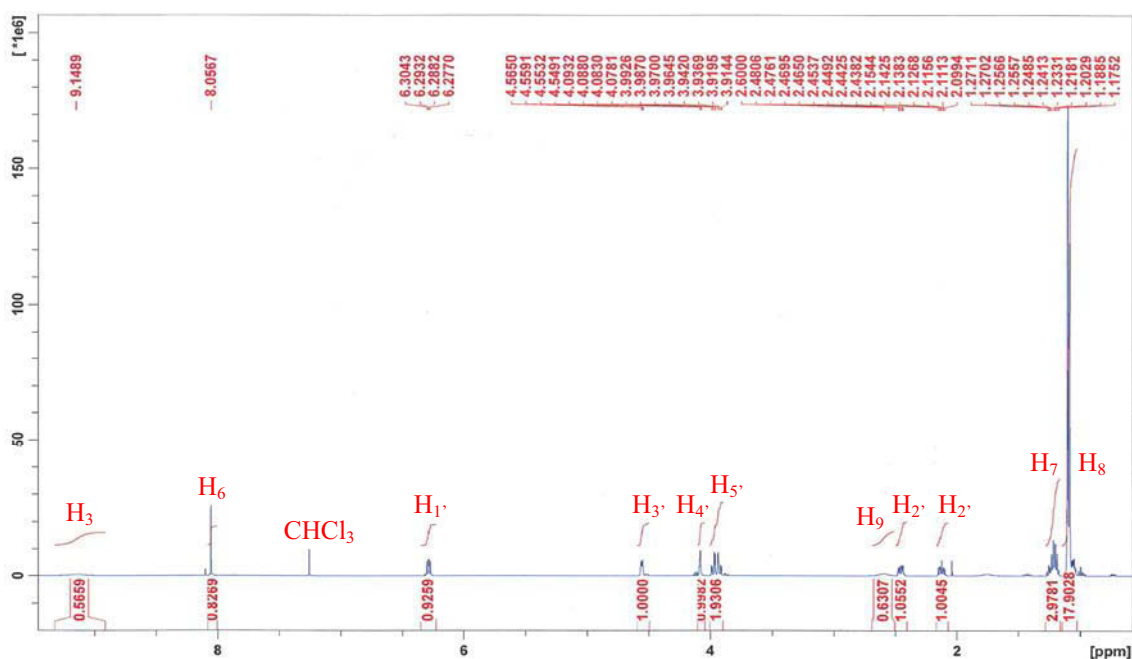


Figure 32 : RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de l'IUdR protégée **5**

Concernant la base pyrimidique, deux signaux caractéristiques sont retrouvés en RMN ^1H : un large singulet, dont le déplacement varie entre 8,10 et 9,50 ppm, correspondant au proton échangeable H_3 et un singulet très déblindé (8,06 ppm) correspond au proton H_6 . Le proton $\text{H}_{1'}$, en position anomérique, est retrouvé sous forme de doublet dédoublé à 6,29 ppm ($J_{\text{H}_{1'}-\text{H}_{2'a}} = 5,6$ Hz et $J_{\text{H}_{1'}-\text{H}_{2'b}} = 8,1$ Hz). L'unique signal intégrant pour 2 protons (à 3,95 ppm) est celui correspondant aux protons H_5 .

La RMN 2D ^1H - ^1H COSY (**Figure 33**) confirme le couplage entre les protons $\text{H}_{1'}$ et H_2 à 2,13 et 2,49 ppm et permet ensuite d'attribuer par couplage au proton H_5 le signal à 4,08 ppm au proton H_4 puis le signal à 4,55 ppm au proton H_3 par couplage au proton H_4 . Le signal de proton échangeable à 2,60 ppm correspond au proton H_9 et les massifs entre 1,18 et 1,25 ppm (intégrant pour 3 protons) et entre 1,07 et 1,12 ppm (intégrant pour 18 protons) sont attribués respectivement aux protons H_7 et H_8 .

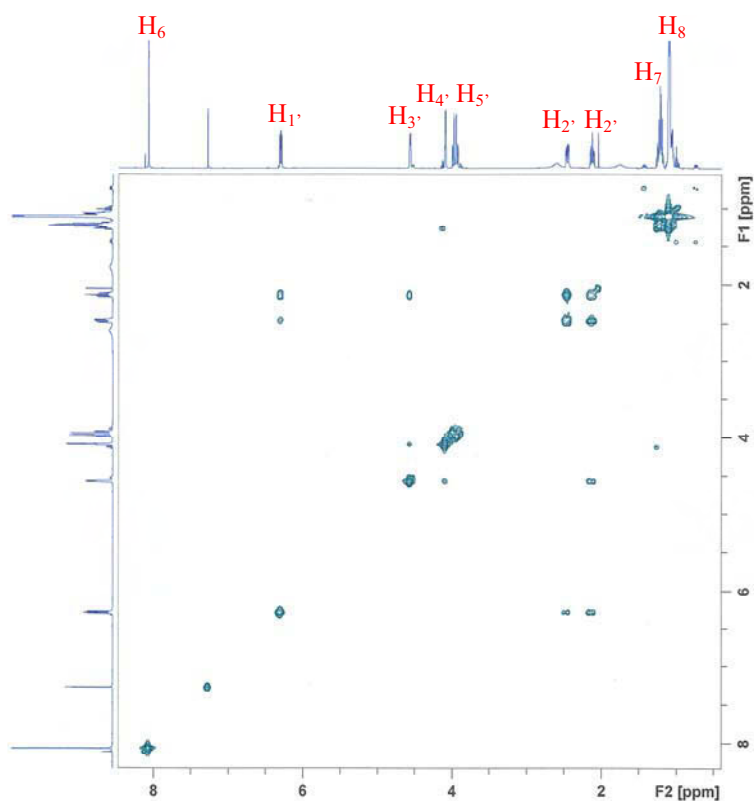


Figure 33 : RMN 2D COSY (corrélation ^1H - ^1H , CDCl_3) de l'IUdR protégée 5

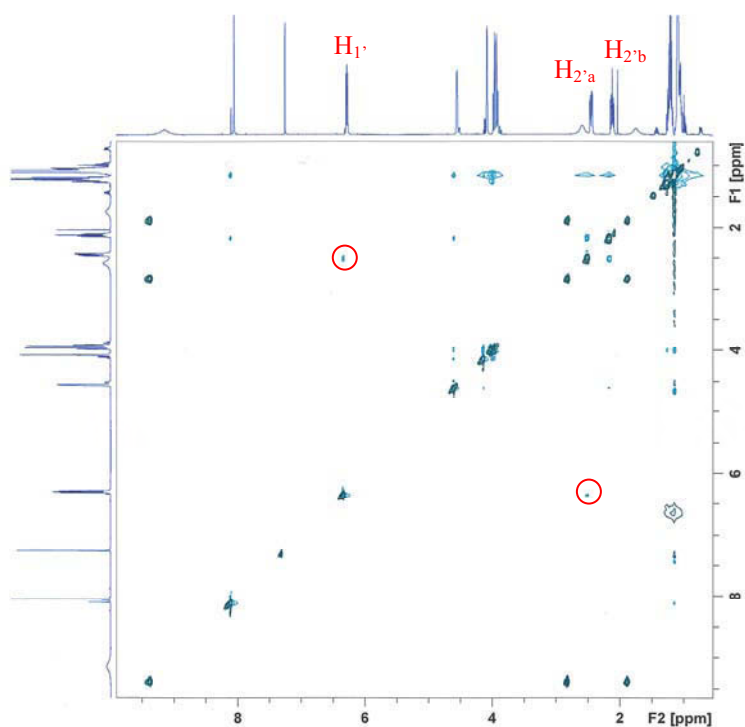


Figure 34 : RMN 2D NOESY (corrélation spatiale ^1H - ^1H) de l'IUdR protégée 5

L'attribution des protons 2' est possible grâce à la RMN 2D ^1H - ^1H NOESY (Figure 34) : un effet NOE positif entre le proton $\text{H}_{1'}$ et le proton correspondant au signal à 2,13 ppm est observé. Ce signal peut donc être attribué au proton en vis-à-vis du proton $\text{H}_{1'}$, à savoir le proton $\text{H}_{2'a}$.

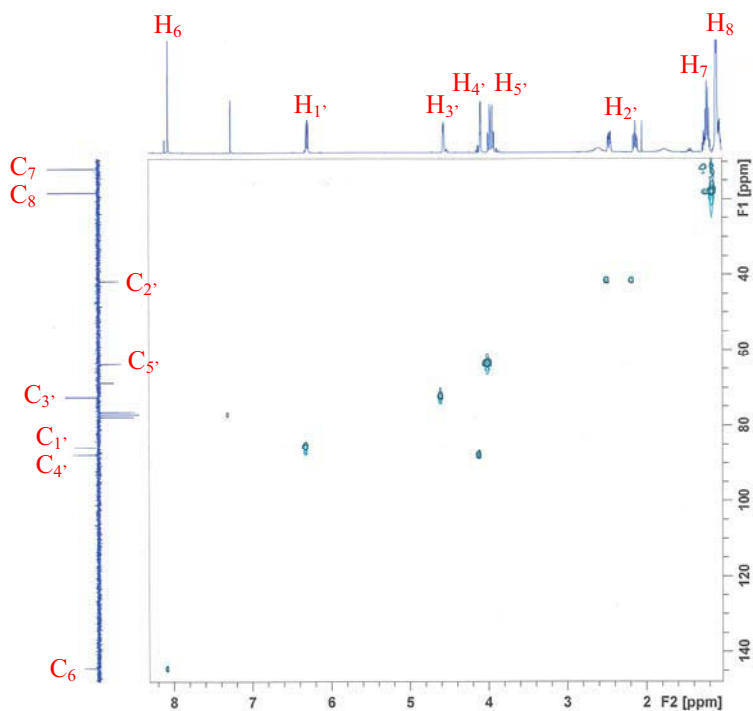


Figure 35 : RMN 2D HSQC (corrélation ^1H - ^{13}C , CDCl_3) de l'IuDR protégée 5

La RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC (Figure 35) permet d'attribuer la plupart des signaux des carbones (C_6 , $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{4'}$, $\text{C}_{5'}$, C_7 et C_8).

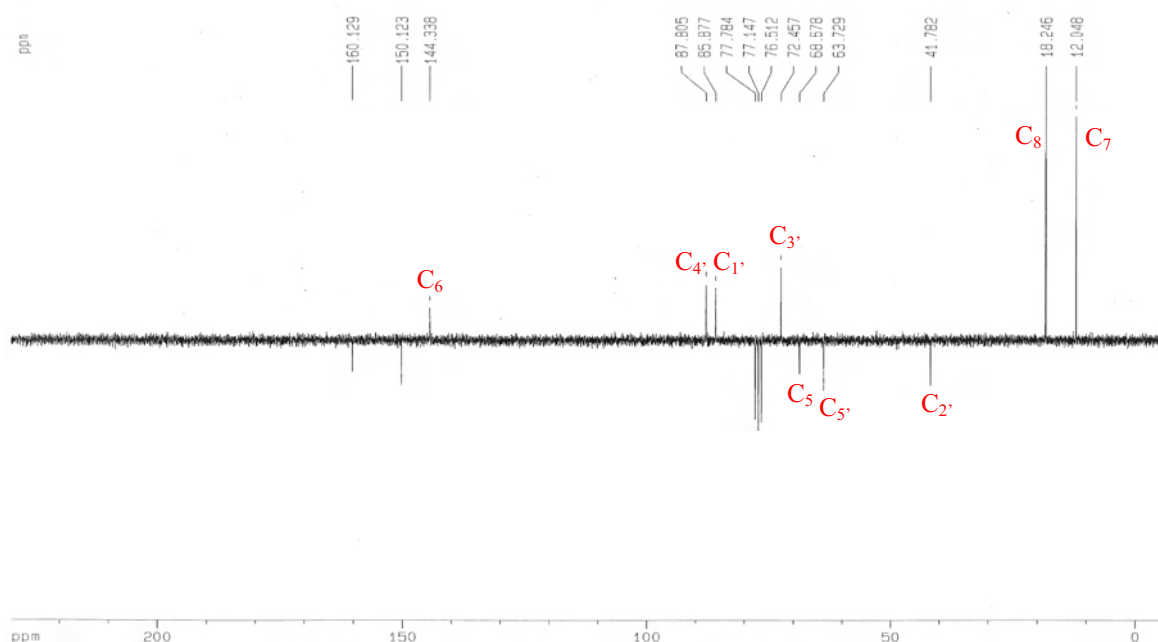


Figure 36 : RMN ^{13}C JMOD(50 MHz, CDCl_3) de l'IuDR protégée 5

Le déplacement chimique du signal à 68,7 ppm est caractéristique d'un carbone aromatique ou hétéro-aromatique portant un atome d'iode, il est donc attribué au carbone C_5 .

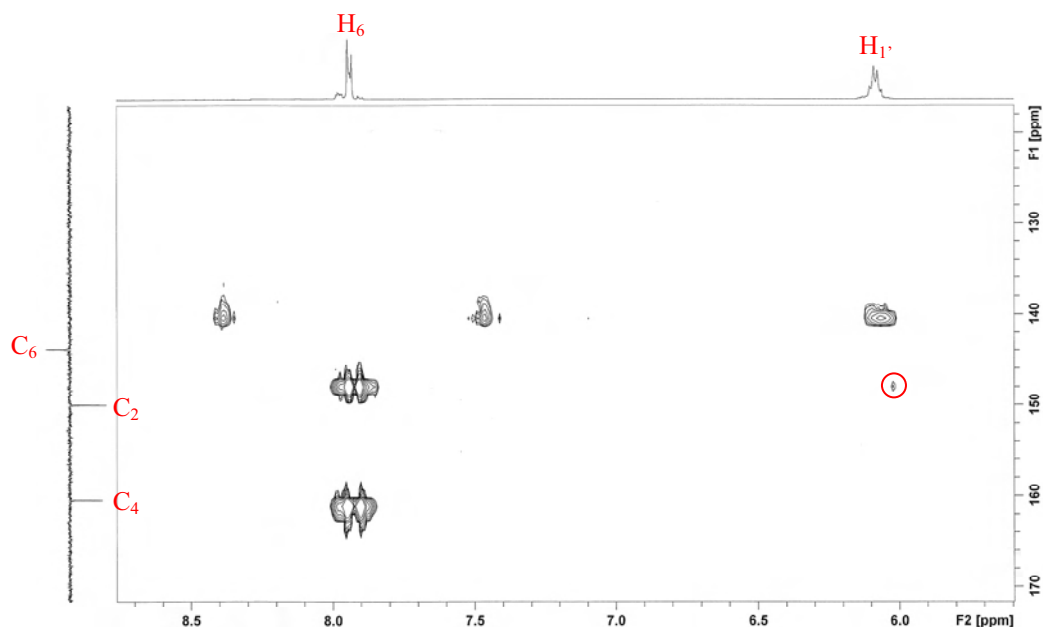


Figure 37 : Agrandissement en zone aromatique de la RMN 2D HMBC (corrélation ^1H - ^{13}C longue distance, DMSO- d_6) de l'IUR protégée **5**

L'attribution des carbones quaternaires C_2 et C_4 est possible grâce à la RMN 2D ^1H - ^{13}C HMBC (corrélation longue distance, **Figure 37**) indiquant un couplage entre le signal du proton $\text{H}_{1'}$ et le signal d'un carbone quaternaire à 150,1 ppm. Ce dernier peut donc être attribué sans ambiguïté au carbone C_2 . L'unique signal non attribué, à 160,1 ppm, correspond alors au carbone C_4 .

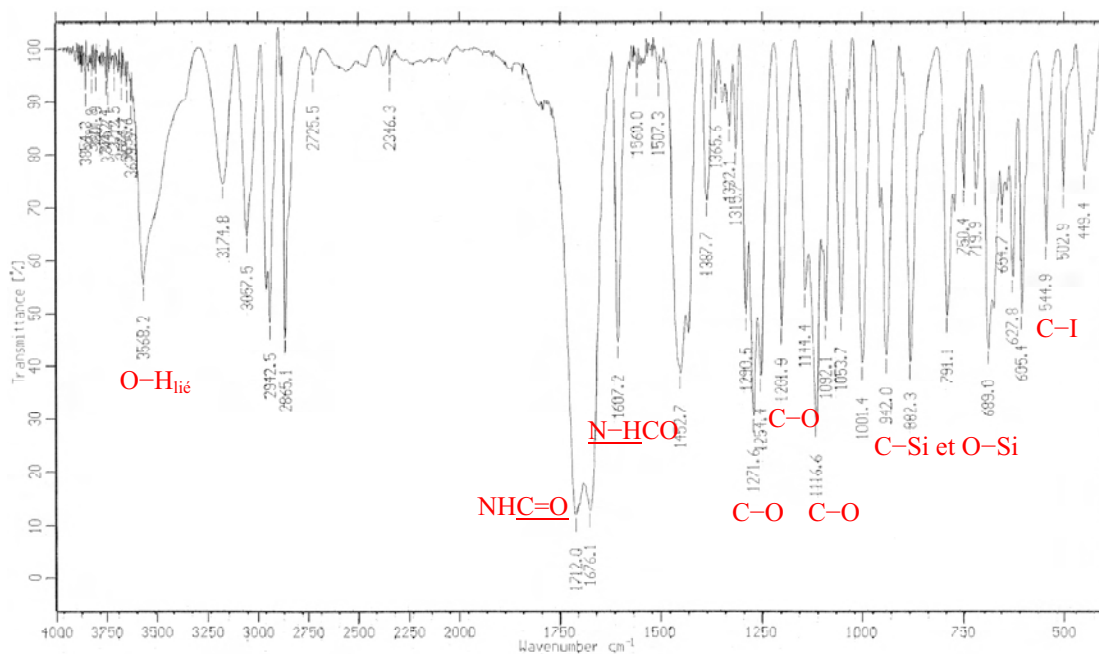


Figure 38 : Spectre infrarouge (pastille de KBr) de l'IUR protégée **5**

La spectroscopie infrarouge montre également l'existence de bandes d'absorption caractéristiques : un massif de 3300 à 3650 cm^{-1} (alcool lié), deux bandes intenses à 1676 et 1712 cm^{-1} (C=O de liaisons amidiques), une bande moyenne à 1607 cm^{-1} (N-H d'amide) et des bandes intenses entre 1000 et 1300 cm^{-1} (liaisons C-O).

Les bandes moyennes à 689, 791, 882 et 942 cm^{-1} peuvent correspondre aux liaisons C-Si et O-Si, tandis que la liaison C-I apparaît à 545 cm^{-1} .

La spectrométrie de masse ($[\text{M-H}]_{\text{th}} = 509,10 / [\text{M-H}]_{\text{mes}} = 508,83$) est en accord avec la structure proposée.

L'attribution définitive des signaux des spectres RMN ^1H et JMOD du synthon **5** est résumée dans le **Tableau 1** suivant :

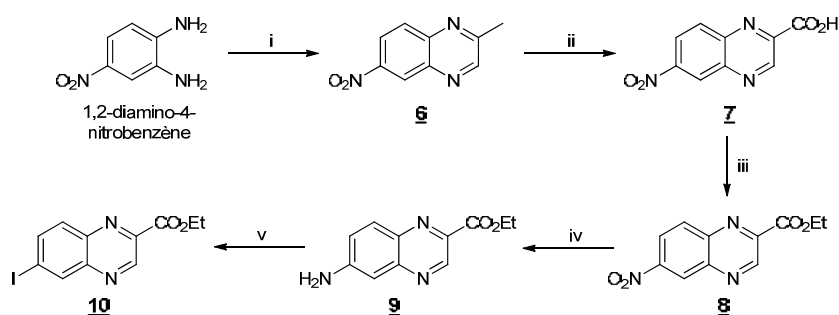
Proton	δ (ppm)	Multiplicité	Constantes de couplage	Intégration	Carbone	δ (ppm)
3	9,15*	Large singulet	-	1	2	150,1
6	8,06	Singulet	-	1	4	160,1
1'	6,29	Doublet dédoublé	8,1 et 5,6 Hz	1	5	68,7
2'a	2,13	Doublet dédoublé dédoublé	13,5 ; 5,6 Hz et 2,2 Hz	1	6	144,3
2'b	2,46	Doublet dédoublé dédoublé	13,5 ; 8,1 Hz et 5,8 Hz	1	1'	85,9
3'	4,55	Multiplet	-	1	2'	41,8
4'	4,08	Multiplet	-	1	3'	72,4
5'	3,95	Multiplet	-	2	4'	87,8
7	1,18-1,25	Multiplet	-	3	5'	63,7
8	1,07-1,12	Multiplet	-	18	7	12,1
9	2,60*	Large singulet	-	1	8	18,2

* : signal mobile

Tableau 1 : Attributions des signaux RMN ^1H et ^{13}C de l'IUdR protégée **5**

I.1.2. Synthèse de l'amine secondaire **13** du vecteur ICF01012

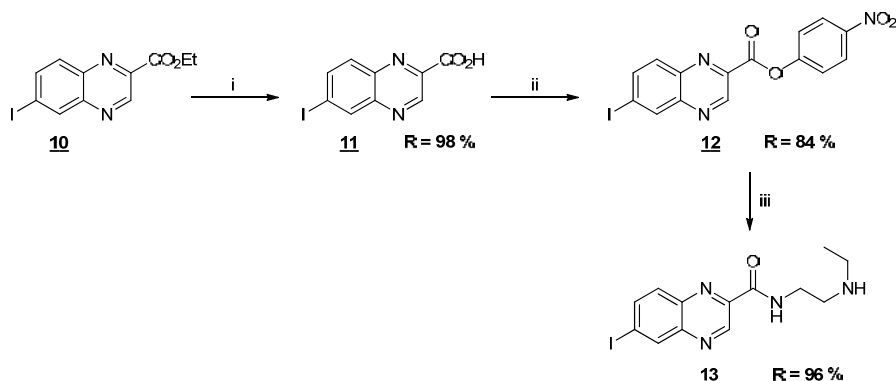
Cette synthèse implique l'intermédiaire 6-iodoquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle **10** obtenu à partir du 1,2-diamino-4-nitrobenzène commercial. Cet ester **10** est préparé en grande quantité au laboratoire suivant la voie de synthèse en 5 étapes ^[124] décrite ci-dessous (**Schéma 12**).



Réactifs et conditions : (i) pyruvaldéhyde, *i*-PrOH, H_2O , reflux ; (ii) (a) SeO_2 , toluène, reflux, (b) acétone, KMnO_4 5% ; (iii) EtOH, H_2SO_4 , reflux ; (iv) H_2 1 atm, Pd/C 10%, EtOH ; (v) (a) NaNO_2 , HBF_4 , H_2O , 0°C (b) KI, 50 °C

Schéma 12 : Synthèse du précurseur **10**

L'amine secondaire **13** peut être synthétisée à partir de l'ester activé **12**, lui-même obtenu en deux étapes à partir de l'ester éthylique **10** selon la méthode décrite par Denoyer *et al.* [190]. Celle-ci a fait l'objet d'ajustements, car peu reproductible en termes de rendement et de pureté du produit final (*Schéma 13*).



Réactifs et conditions : (i) NaOH, H₂O, EtOH, Δ, 1 h; (ii) (a) chlorure d'oxalyle, DMF (cat.), CH₂Cl₂, TA, 15 h (b) *p*-nitrophénol, NEt₃, THF, 50°C, 16 h; (iii) *N*-éthyléthylènediamine, THF, TA, 20 h

Schéma 13 : Synthèse de l'amine secondaire **13**

L'ester éthylique **10** est hydrolysé par la soude en milieu aqueux éthanolique. L'acide carboxylique **11** est isolé pur à hauteur de 98 % par précipitation en milieu acide. Ce dernier est ensuite converti en chlorure d'acide. Les conditions initialement décrites pour cette réaction impliquaient le chlorure de thionyle (SOCl₂) comme solvant et agent de chloration, et nécessitaient un chauffage à reflux. Afin d'éviter la formation ultérieure de produits secondaires inséparables par chromatographies sur colonne, le chlorure de thionyle a été remplacé par le chlorure d'oxalyle en présence d'une quantité catalytique de DMF anhydre dans des conditions diluées, générant un agent de chloration doux. Le mécanisme réactionnel de cette étape est détaillé ci-après (*Schéma 14*).

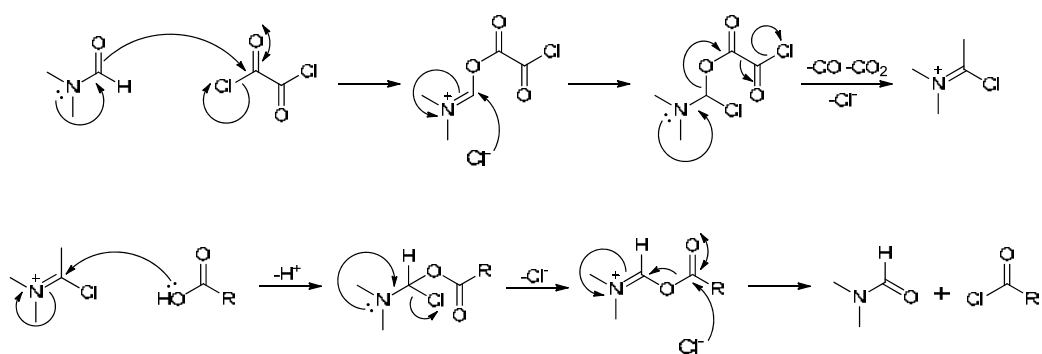


Schéma 14 : Mécanisme réactionnel de chloration d'un acide carboxylique par le couple chlorure d'oxalyle / DMF

Ce sont les dégagements gazeux (monoxyde et dioxyde de carbone) qui constituent la force motrice du déplacement de l'équilibre réactionnel. Le chlorure d'acide instable ainsi généré est immédiatement mis en réaction avec le *p*-nitrophénol en présence de triéthylamine (NEt₃) dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre.

L'ester activé **12** purifié par lavages aqueux et organiques est obtenu avec un rendement combiné de 84 %. L'action de l'éthyléthylènediamine dans le THF produit l'amine secondaire **13** avec un rendement de 96 % après purification par chromatographie sur colonne.

[190] Denoyer D. *et al.*, Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of a new potent radioiodinated melanoma imaging and therapeutic agent. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 411-418

A titre de référence, l'attribution des signaux RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) obtenus pour l'amine secondaire **13** est conforme à la littérature^[190] et détaillée dans le **Tableau 2**.

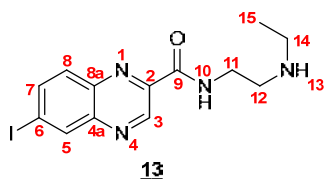


Figure 39 : Numérotation périphérique de l'amine secondaire **13** utilisée pour la détermination structurale

Proton	δ (ppm)	Multiplicité	Constantes de couplage	Intégration	Carbone	δ (ppm)
3	9,64	Singulet	-	1	2	139,0
5	8,60	Doublet	1,9 Hz	1	3	144,2
7	8,08	Doublet dédoublé	8,8 et 1,9 Hz	1	4a	143,9
8	7,83	Doublet	8,8 Hz	1	5	138,1
10	8,26*	Triplet élargi	6,0 Hz	1	6	97,5
11	3,64	Quadruplet	6,0 Hz	2	7	139,2
12	2,94	Triplet	6,0 Hz	2	8	130,3
13	1,54*	Singulet élargi	-	1	8a	143,4
14	2,73	Quadruplet	7,1 Hz	2	9	162,7
15	1,15	Triplet	7,1 Hz	3	11	39,1
-	-	-	-	-	12	48,0
-	-	-	-	-	14	43,4
-	-	-	-	-	15	14,9

* : signal mobile

Tableau 2 : Attributions des signaux RMN ^1H et ^{13}C de l'amine secondaire **13**

Les signaux caractéristiques de l'IUdR protégée **5** et du vecteur, *a fortiori* ceux du noyau quinoxaline peuvent être considérés comme invariables. Comme évoqué précédemment, les seuls déplacements chimiques de l'IUdR protégée **5** susceptibles de varier significativement correspondent aux protons et carbone en position 3' ainsi qu'en position 6' (position de déiodostannylation). Les seuls signaux « nouveaux » seront apportés par les espaceurs et les différentes fonctionnalités portées par ceux-ci. Ainsi, par la suite, les déterminations structurales seront proposées sous la forme d'encarts simplifiés, qui représenteront uniquement les éléments variables d'un intermédiaire réactionnel à un autre, représentatifs des modifications structurales apportées.

Les deux synthons **5** et **13** communs de la rétrosynthèse générale envisagée ayant été préparés, la description des synthèses des prodrogues peut débuter. Le paragraphe suivant décrit la préparation de la prodrogue **1** dont l'espaceur est constitué par une fonction ester.

1.2. Prodrogue « ester » **1**

1.2.1. Rétrosynthèse

La synthèse de cette prodrogue peut être envisagée comme décrit précédemment selon deux voies se distinguant par l'inversion des principales séquences réactionnelles (**Schéma 15**) :

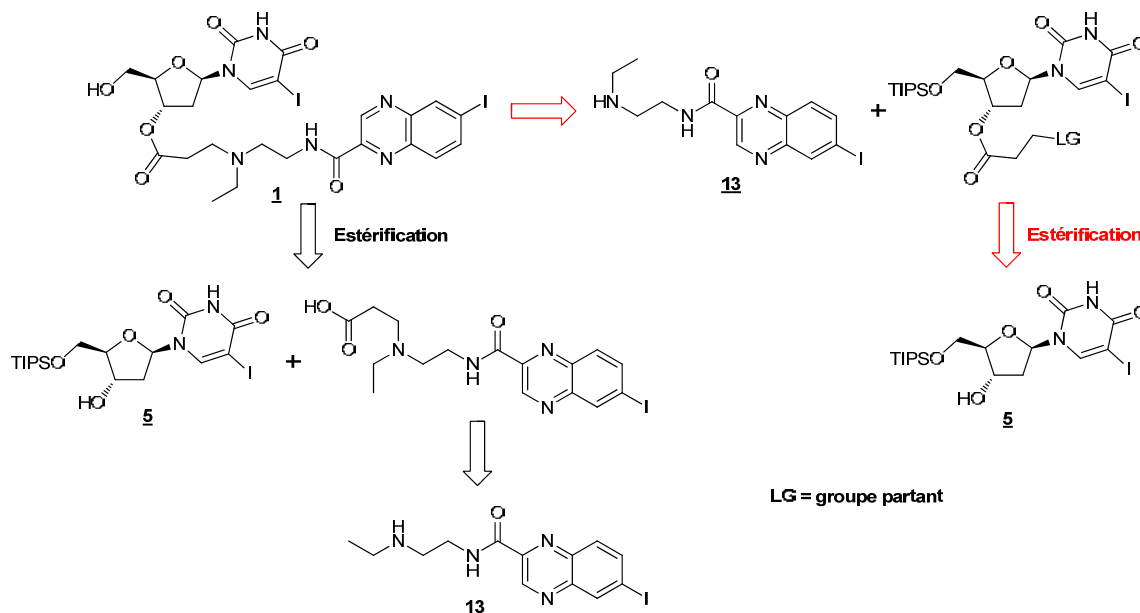


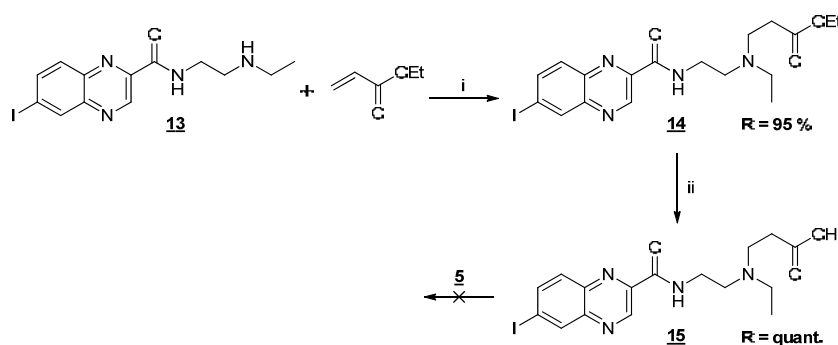
Schéma 15 : Rétrosynthèse de la prodrogue « ester » **1**

➤ La première voie (**en noir**) consiste à greffer sur l'amine secondaire **13** un bras fonctionnalisé par une fonction acide masquée qui sera après libération couplée à l'IUDR protégée **5**.

➤ La seconde voie (**en rouge**) réside dans la construction de la fonction ester sur l'IUDR protégée **5**. Les transformations du bras espaceur doivent ensuite permettre le greffage de l'amine secondaire **13** pour générer la prodrogue « ester » **1** après déprotection finale.

1.2.2. Synthèse de la prodrogue « ester » **1**

La voie décrite **en noir** a été la première appliquée : l'introduction de l'espaceur sur le vecteur est réalisée par une réaction de type aza-Michael utilisant le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) comme catalyseur^[191] (**Schéma 16**) :



Réactifs et conditions : (i) DBU, MeCN, TA, 48 h ; (ii) NaCH, H₂C, EtCH, TA, 4 h

Schéma 16 : Synthèse avortée de **1**

[191] Yeom C.-E. *et al.*, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)-promoted efficient and versatile aza-Michael addition. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 904-909

La réaction d'aza-Michael est réalisée sur l'amine **13** en présence d'un excès d'acrylate d'éthyle et de DBU, dans un ballon scellé. L'ester **14** est obtenu avec un rendement de 95 % et sa saponification conduit à l'acide **15**, isolé sous forme de dichlorhydrate par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Le couplage de l'acide **15** avec l'IUdR protégée **5** a échoué, et ce malgré différents essais effectués variant les agents de couplage (*e.g.* DCC / DMAP, EDC / DMAP, DCC / HOBt) et le solvant (*e.g.* CH₂Cl₂, DMF).

Eléments de détermination structurale :

- **14** RMN ¹H : apparition des signaux de l'ester éthylique (triplet à 1,00 ppm et quadruplet à 4,05 ppm).
- **15** RMN ¹H : disparition des signaux de l'ester éthylique précédemment décrits.

Les échecs lors des réactions de couplage et la purification longue et délicate de l'acide **15** nous ont poussés vers la seconde voie envisagée (**voie rouge**), pour laquelle la fonction alcool secondaire de **5** est convertie en acrylate de deux manières différentes (**Schéma 17**) :

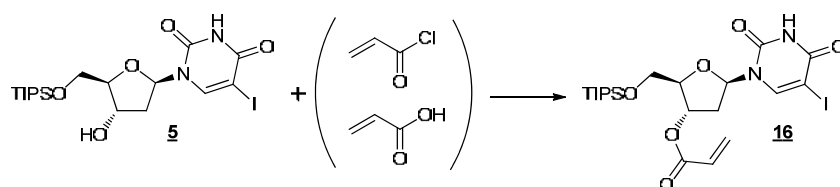


Schéma 17 : Synthèse de **16**

Les premiers essais d'estérification de l'IUdR protégée **5** par le chlorure d'acryloyle en présence de NEt₃ dans le dichlorométhane n'ont pas permis d'isoler l'acrylate **16**. Une mise au point a alors été réalisée, en faisant varier le solvant (dichlorométhane, THF), la base (NEt₃, DMAP, K₂CO₃), la température (-10 °C, 0 °C, TA), le temps de réaction (de 1 h à 17 h) et le mode d'addition du chlorure d'acide (continue ou fractionnée). L'acrylate **16** a été obtenu, avec des rendements variant de 8 à 51 %, les conditions optimales étant : NEt₃, THF, TA, addition fractionnée. L'extension à une quantité plus importante a conduit à une importante chute de rendement (R = 15 à 25 %). Cette difficulté de « scaling-up » s'explique par la grande réactivité du noyau pyrimidique pour le chlorure d'acide, comme l'indique un des produits secondaires isolé lors de cette réaction (**Figure 40**), qui représente environ 50 % de la conversion de l'IUdR protégée **5** :

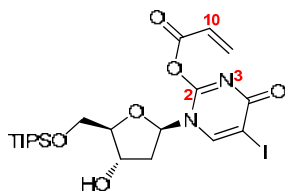
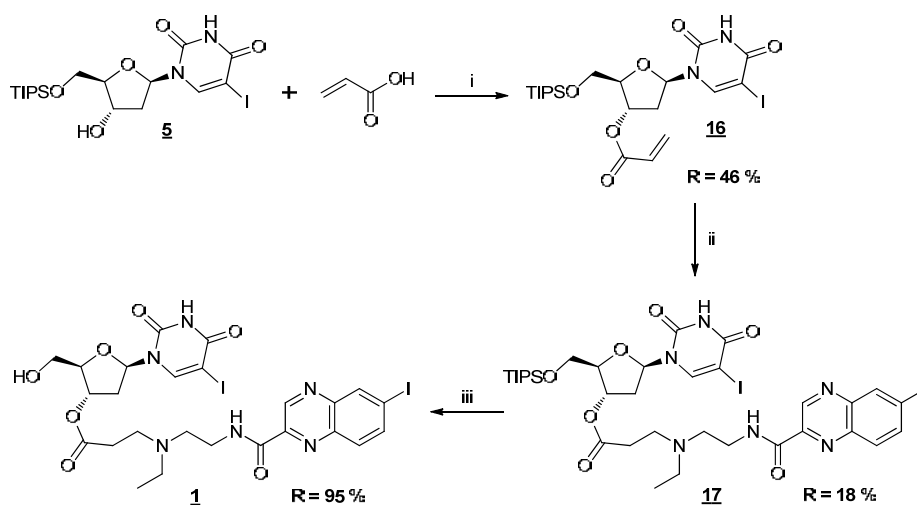


Figure 40 : Produit secondaire majoritaire obtenu lors de l'estérification de **5** par le chlorure d'acryloyle

La structure de ce composé a été déterminée par l'analyse des spectres RMN : les signaux en RMN ¹H correspondants à la partie osidique sont inchangés, tandis que le large singulet en zone aromatique du NH en position 3 de la base ($\delta = 9,15$ ppm) disparaît et que les signaux caractéristiques de l'acrylate sont bien présents (3 doublets dédoublés à 5,85 ; 6,07 et 6,42 ppm). En RMN 2D ¹H-¹³C HMBC, un couplage entre le carbone 2 et le proton 10 est bien observé.

La réaction d'estérification entre l'IUdR protégée **5** et l'acide acrylique en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de DMAP (réactifs de l'estérification de Steglich) permet quant à elle d'obtenir l'acrylate **16** avec un rendement certes moyen (46 %) mais reproductible sur une quantité plus importante, permettant ainsi la suite de la voie de synthèse (**Schéma 18**) :



Réactifs et conditions : (i) DCC, DMAP, THF, TA, 1 h ; (ii) **13**, DBU, MeCN, TA, 96 h ; (iii) TBAF, THF, TA, 5 h

Schéma 18 : Synthèse de la prodrogue « ester » **1**

Par la réaction d'aza-Michael développée précédemment, le conjugué **17** est obtenu à partir de l'acrylate **16** et de l'amine secondaire **13** avec un rendement faible de 18 %, qui peut s'expliquer par la réaction de cyclisation intramoléculaire du cycle pyrimidique avec l'acrylate. La déprotection du groupement silylé dans des conditions classiques (TBAF, THF) mène à la prodrogue « ester » **1** avec un excellent rendement, justifiant le choix de ce groupement protecteur.

Eléments de détermination structurale :

- **16** RMN ^1H : apparition des signaux caractéristiques de l'acrylate (trois doublets dédoublés à 5,88 ; 6,12 et 6,45 ppm).
- **17** RMN ^1H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline), disparition des signaux de l'acrylate et apparition de deux massifs en zone aliphatique (-OCOCH₂CH₂N-).
- **1** RMN ^1H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 1,02 à 1,17 ppm).
- **1** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 779,02$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 779,26$.

Suite à la synthèse de cette prodrogue à espaceur « ester », le paragraphe suivant décrit la synthèse de la prodrogue constituée par un espaceur « acétal ».

1.3. Prodrogue « acétal » 2

1.3.1. Rétrosynthèse

La formation d'acétals et de cétals asymétriques est assez répandue dans la littérature. Elle est en général réalisée par la réaction d'un éther de vinyle sur une fonction alcool, catalysée par un acide fort [192-194]. La rétrosynthèse de la prodrogue « acétal » **2** a été envisagée en considérant les deux séquences générales décrites en introduction, telles que représentées ci-dessous (**Schéma 19**).

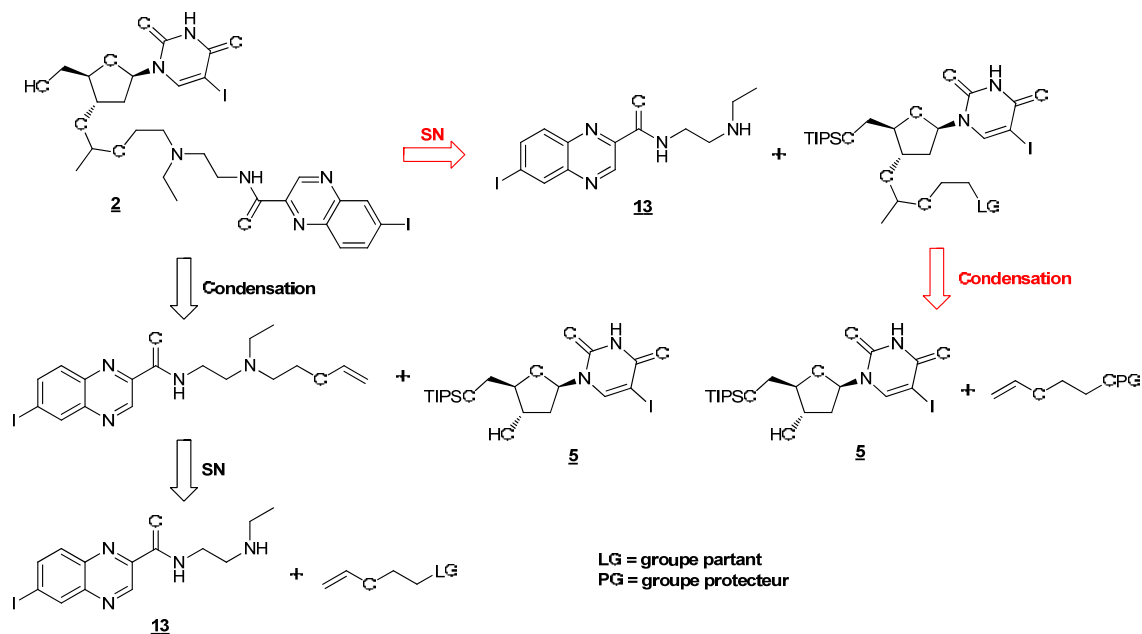


Schéma 19 : Rétrosynthèse de la prodrogue « acétal » **2**

Comme précédemment pour la prodrogue « ester » **1**, deux voies convergentes sont envisageables pour la synthèse de la prodrogue « acétal » **2**.

➤ La première voie (**en noir**) conduit à la formation de la fonction acétal en avant dernière étape, par un couplage de l'IUdR protégée **5** et du vecteur ICF01012 fonctionnalisé par un groupement éther de vinyle, l'introduction de ce dernier étant réalisée par la substitution nucléophile entre l'amine secondaire **13** et un éther de vinyle activé.

Cependant, cette voie risquait d'être incompatible avec le précurseur de radiomarquage envisagé, à savoir un dérivé stannylé. En effet, le groupement stannyle doit être introduit en position 5 de l'IUdR avant le couplage au vecteur, car ce dernier porte lui-même un atome d'iode. Or, ces dérivés sont connus pour être rapidement hydrolysés en milieu acide, conditions utilisées pour la création de la fonction acétal.

➤ La seconde voie (**en rouge**) vise à condenser l'espaceur sur l'IUdR protégée **5**, puis à substituer un groupe partant par l'amine secondaire **13**. C'est donc cette seconde voie qui a été choisie.

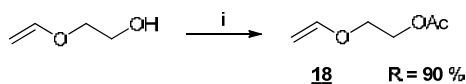
[192] Farschtschi N., 'Ethylene-bis[phosphonate] nucleic acids': novel monomeric synthons for the solid-phase synthesis of (P-CH₂-CH₂-P)-bridged oligonucleotides. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 402-414

[193] Matysiak S. *et al.*, Nucleosides. Part LXIII. Acetals as new 2'-O-protecting functions for the synthesis of oligoribonucleotides: Synthesis of uridine building blocks and evaluation of their relative acid stability. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1545-1566

[194] Munro T. A. *et al.*, Standard protecting groups create potent and selective κ opioids: Salvinorin B alkoxymethyl ethers. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1279-1286

1.3.2. Synthèse de la prodrogue « acétal » **2**

La synthèse de la prodrogue « acétal » **2** a donc été envisagée selon la **voie rouge**, impliquant la préparation du bras espaceur protégé qui sera ensuite couplé à l'IUdR protégée **5**. Le groupement protecteur de la fonction alcool utilisé pour ce fragment ne devait pas être un dérivé silylé afin d'éviter tout problème de sélectivité vis-à-vis du TIPS en position 5' de l'IUdR. La déprotection de ce groupement ne devait pas non plus être réalisée en milieu acide, sous peine d'hydrolyser l'acétal. Notre choix s'est donc orienté vers un ester, plus précisément un acétate (**Schéma 20**).



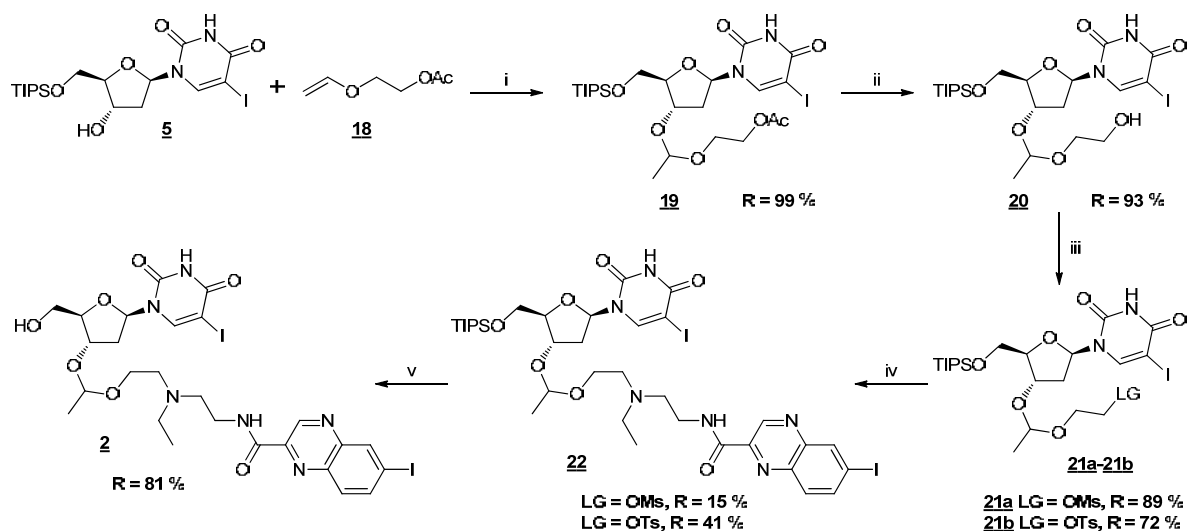
Réactifs et conditions : (i) Ac₂O, pyridine, DMAP (cat.), CH₂Cl₂, TA, 1 h 30

Schéma 20 : Protection du mono-éthylène glycol de l'éthylène glycol

Eléments de détermination structurale :

- **18** RMN ¹H : apparition du signal correspondant au méthyle de l'acétate (singulet à 2,09 ppm).
- **18** RMN ¹³C : apparition du signal du carbonyle (170,9 ppm).

Une fois ce précurseur synthétisé, la synthèse de la prodrogue « acétal » **2** a été réalisée comme décrit **Schéma 21** :



Réactifs et conditions : (i) acide camphorsulfonique (cat.), THF, TA, 5 h ; (ii) LiOH, EtOH, TA, 1 h ; (iii) (a) MsCl, pyridine, DMAP, CH₂Cl₂, TA, 22 h ou (b) TsCl, pyridine, 0°C->TA, 16 h ; (iv) **13**, MeCN, 55°C, 88 h (**21a**) ou 80 h (**21b**) ; (v) TBAF, THF, TA, 4 h

Schéma 21 : Synthèse de la prodrogue « acétal » **2**

La réaction de condensation de l'éther vinylique **18** avec l'IUdR protégée **5** a été adaptée des conditions de la littérature (catalyse par un acide fort : APTS, PPTS ou TFA) évoquées lors de la rétrosynthèse : la catalyse par l'acide camphorsulfonique (ACS) dans le THF permet d'isoler l'acétate **19** avec un rendement quantitatif, sous la forme d'un mélange inséparable de diastéréoisomères (provenant de la création d'un nouveau centre chiral). Ce mélange présente un ratio 1 : 1 observé en RMN ¹H par le dédoublement de la quasi-totalité des signaux. La transestérification de l'acétate **19** dans l'éthanol en présence d'hydroxyde de lithium régénère l'alcool **20** qui est ensuite activé sous forme de méthanesulfonate (mésylate) **21a** et de *p*-toluènesulfonate (tosylate) **21b**.

Eléments de détermination structurale :

- **19** RMN ¹H : apparition des signaux de l'acétal (doublet à 1,34 ppm et quadruplet à 4,84 ppm) et de l'espaceur (massifs de 3,61 à 3,92 ppm et de 3,96 à 4,25 ppm, singlet à 2,08 ppm).
- **20** RMN ¹H : disparition du singlet du méthyle de l'acétate (2,08 ppm).
- **21a** RMN ¹H : apparition du singlet du méthyle du mésylate (3,04 ppm) et déplacement du signal des protons du CH₂ lié au groupe partant (de 3,73 à 4,35 ppm).
- **21b** RMN ¹H : apparition des signaux aromatiques (doublets à 7,34 et 7,78 ppm) et du méthyle du tosylate (singlet à 2,40 ppm) et déplacement du CH₂ lié au groupe partant (de 3,73 à 4,14 ppm).

La substitution nucléophile du tosylate **21b** par l'amine secondaire **13** a fait l'objet de nombreuses mises au point : solvant (acétonitrile, THF, DMF), température (40 °C, 55 °C, 75 °C, reflux), nature de la base (sans base, NEt₃, *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA), K₂CO₃) et temps de réaction ont ainsi été modulés. De manière générale, l'augmentation de la température accélère la réaction, mais également les réactions secondaires. Particulièrement, un sous-produit majoritaire (**Figure 41**) est toujours présent. Il a été isolé et caractérisé en RMN par analogie avec le produit obtenu lors de la réaction avec le chlorure d'oxalyle (*cf.* p85) :

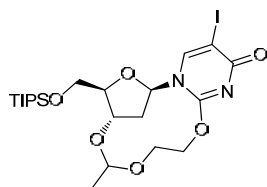


Figure 41 : Sous-produit obtenu lors de la substitution nucléophile du tosylate **21b** par l'amine secondaire **13**

Parmi les solvants étudiés, seuls le DMF ou l'acétonitrile permettent d'accéder à l'amine tertiaire **22**. On notera toutefois que lorsque la réaction est réalisée dans le DMF, l'isolement du conjugué **22** est rendu difficile par la présence d'un sous-produit co-éluant avec ce dernier et ce quelles que soient les conditions chromatographiques testées.

Pour les essais avec le carbonate de potassium K₂CO₃, une dégradation du composé de départ est observée. L'utilisation de bases azotées organiques permet d'accéder au produit **22** attendu avec des rendements toutefois assez faibles. Ces bases pourraient participer à la réaction en formant de manière irréversible un ammonium quaternaire, limitant de fait la conversion vers le produit attendu. Le temps de réaction a également été optimisé : 3 à 4 jours de réaction sont nécessaires pour une conversion convenable (environ 50 %).

Ainsi, les meilleures conditions trouvées sont : acétonitrile, 55 °C, sans base, 3 à 4 jours. Le tosylate permet d'atteindre un meilleur rendement que le mésylate (41 contre 15 %). Une hypothèse (non prouvée par la détermination structurale) pouvant expliquer cette différence serait la propension du mésylate à être plus sujet à l'élimination et/ou à la substitution intramoléculaire. La déprotection du conjugué **22** dans les conditions déjà employées (TBAF, THF) génère finalement la prodrogue « acétal » **2** avec un bon rendement (81 %).

Eléments de détermination structurale :

- **22** RMN ¹H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition des signaux des groupes partants.
- **2** RMN ¹H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 1,08 à 1,16 ppm).
- **2** spectrométrie de masse : [M+H]⁺_{th} = 795,05 / [M+H]⁺_{mes} = 795,23.

I.4. Prodrogues « carbamate » **3** et « carbonate » **4**

Les fonctions carbonate et carbamate étant structurellement proches, nous avons souhaité bâtir une stratégie de synthèse convergente, avec le maximum d'intermédiaires communs.

I.4.1. Rétrosynthèse

La rétrosynthèse des deux composés a été envisagée suivant la voie représentée **Schéma 22** :

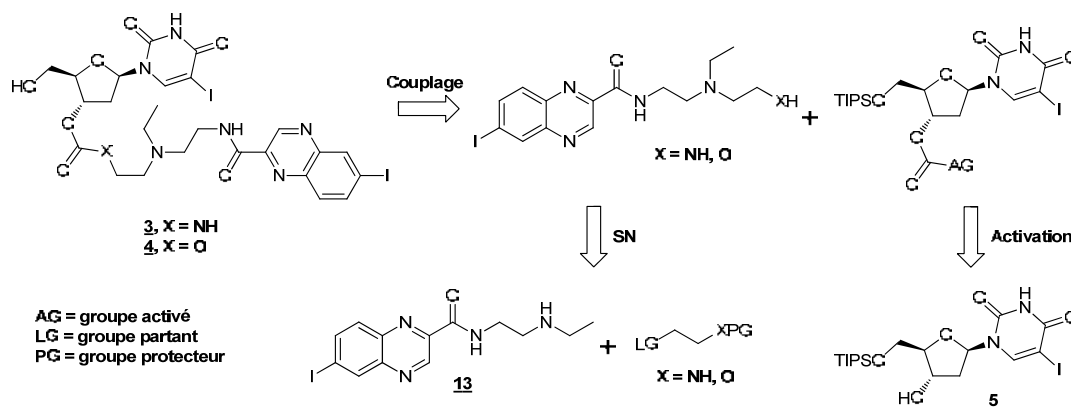
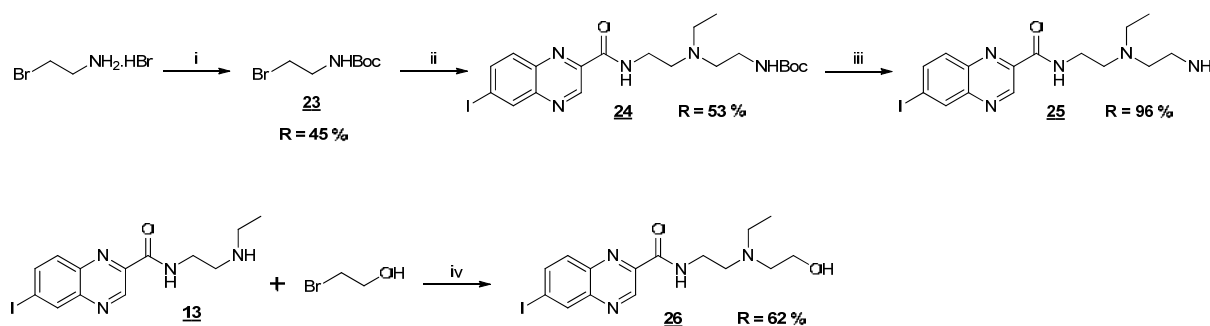


Schéma 22 : Rétrosynthèse des prodrogues « carbamate » **3** et « carbonate » **4**

La fonction alcool libre en position 3' de l'IUDR protégée **5** doit être convertie en carbonyle activé avant d'être couplés aux vecteurs fonctionnalisés, ces derniers étant eux-mêmes obtenus par substitution nucléophile des fragments correspondants par l'amine secondaire **13**.

I.4.2. Synthèse des prodrogues « carbamate » **3** et « carbonate » **4**

Les amines tertiaires fonctionnalisées par les espaceurs ont été préparées selon la méthode décrite ci-dessous (**Schéma 23**) :



Réactifs et conditions : (i) Boc_2O , DIPEA, CH_2Cl_2 , TA, 15 h ; (ii) **13**, MeCN, TA, 96 h ; (iii) TFA, CH_2Cl_2 , TA, 1 h 30 ; (iv) DIPEA, MeCN, Δ , 48 h

Schéma 23 : Synthèse des vecteurs fonctionnalisés

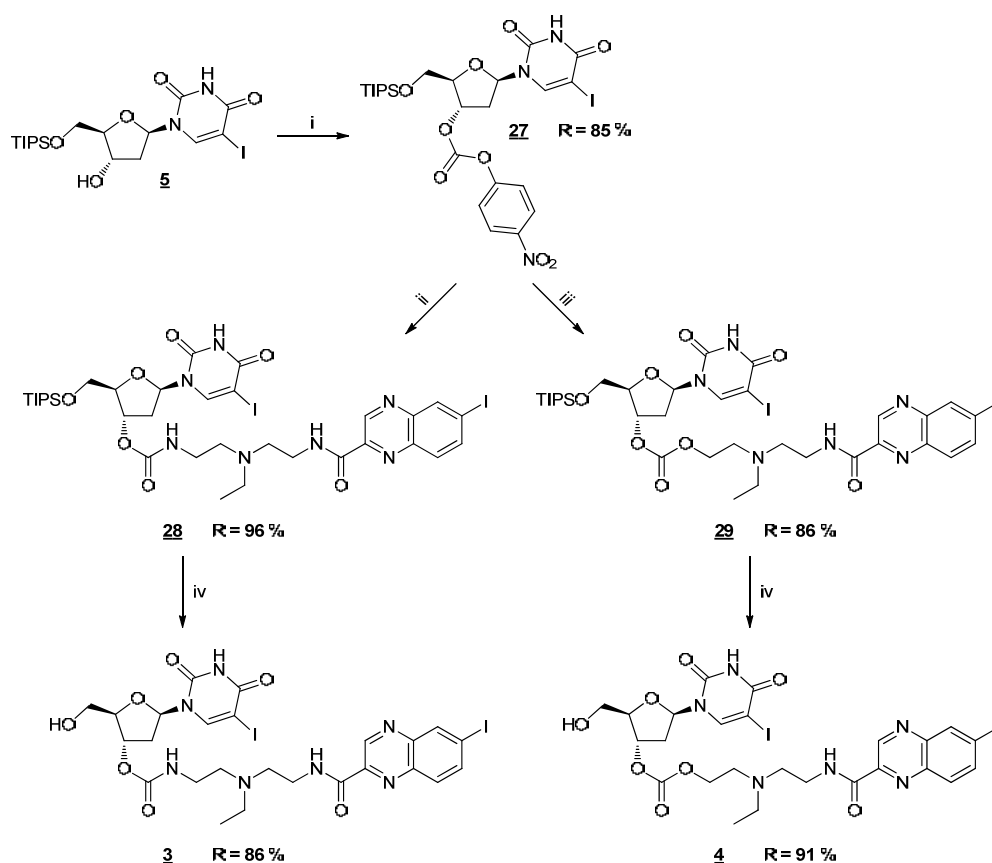
La protection du bromhydrate de 2-bromoéthylamine par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc), labile en milieu acide, est réalisée par l'anhydride correspondant^[195] (Boc_2O) en présence d'une base organique. Le composé **23** ainsi obtenu est couplé à l'amine secondaire **13** pour former le dérivé *N*-Boc **24**. Ce dernier est déprotégé par l'acide trifluoroacétique (TFA) pour générer l'amine primaire **25** désirée. L'alcool **26** est quant à lui obtenu directement par alkylation de l'amine secondaire **13** par le bromoéthanol.

[195] Patino N. *et al.*, Modelling, synthesis and biological evaluation of an ethidium-arginine conjugate linked to a ribonuclease mimic directed against TAR RNA of HIV-1. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 573-584

Eléments de détermination structurale :

- **23** RMN ¹H : en accord avec les données de la littérature [195].
- **24** RMN ¹H : présence de deux méthylènes supplémentaires (massif de 2,51 à 2,62 ppm et quadruplet à 3,13 ppm) et du singulet du groupement Boc (1,28 ppm).
- **25** RMN ¹H : disparition du singulet des méthyles du groupement Boc.
- **26** RMN ¹H : présence de deux méthylènes supplémentaires (massifs de 2,67 à 2,82 ppm et de 3,60 à 3,66 ppm) et d'un signal de proton échangeable (large singulet à 2,04 ppm) attribuable à la fonction alcool.

Les intermédiaires **25** et **26** synthétisés sont ensuite couplés à l'IUdR protégée **5**, via la formation d'un carbonate ou carbamate activé. Cette méthode de formation de fonctions carbonate et carbamate est classique en chimie nucléosidique : des carbamates de diimidazole [196] ou de triazole [197] ainsi que des carbonates de *p*-nitrophényle [198] sur des dérivés d'uridine ou de thymidine ont été largement décrits dans la littérature. La formation d'un carbonate de *p*-nitrophényle, activation similaire à celle utilisée lors de la synthèse de l'amine secondaire **13** (ester de *p*-nitrophényle) a été choisie. Cette étape et la suite de la synthèse sont décrites dans le **Schéma 24** suivant.



Réactifs et conditions : (i) chloroformate de *p*-nitrophényle, pyridine, CH₂Cl₂, 0°C->TA, 2 h-> 17 h ; (ii) **25**, NEt₃, CH₂Cl₂, TA, 18 h ; (iii) **26**, pyridine, DMAP, CH₂Cl₂, TA, 72 h ; (iv) TBAF, THF, TA, 2 h

Schéma 24 : Synthèse des prodrogues **3** et **4**

[196] Korshun V. A. *et al.*, Novel uridin-2'-yl carbamates: synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2'-pyren-1-ylmethylcarbamate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 1092-1104

[197] Vortherms A. R. *et al.*, Synthesis, characterization, and in vitro assay of folic acid conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): toward targeted AZT based anticancer therapeutics. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2008**, *27*, 173-185

[198] Leuck M. *et al.*, A novel reagent for the chemical phosphorylation of oligonucleotides. *Tet. Lett.* **2004**, *45*, 321-324

La fonction alcool en position 3' de l'IUDR silylée **5** est activé sous forme de carbonate de *p*-nitrophényle dans les conditions données par la littérature [198]. Le carbonate activé **27** est ainsi obtenu avec un rendement de 85 % après purification sur colonne de silice. Cette activation suffit pour un couplage rapide et quasi-quantitatif menant au carbamate **28**. En revanche, la fonction alcool du vecteur **26** est insuffisamment nucléophile pour déplacer l'équilibre existant entre le *p*-nitrophénol libéré, le carbonate activé **27** et le carbonate **29**. Une activation supplémentaire par la DMAP est alors nécessaire (*Schéma 25*) :

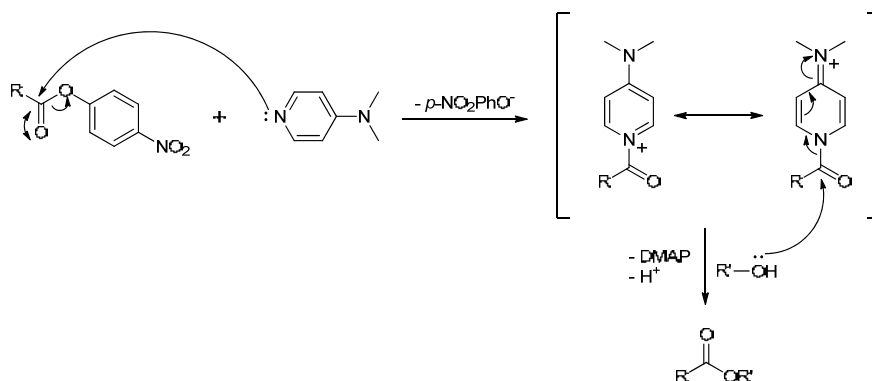


Schéma 25 : Mécanisme d'acylation catalysée par la DMAP

L'atome d'azote hétérocyclique de la DMAP attaque le carbonyle du carbonate activé, libérant ainsi le *p*-nitrophénol, piégé sous sa forme basique. Cette étape constitue la force motrice de la réaction, aidée par l'équilibre stabilisant induit par les différentes formes mésomères du conjugué. L'intermédiaire ainsi créé est alors attaqué par l'alcool pour former le carbonate mixte et régénérer la DMAP. La pyridine possède également cette propriété catalytique, mais le taux de réaction est beaucoup moins rapide qu'avec son homologue substituée [199] (ratio 1 : 10⁴-10⁵) en raison de sa nucléophilie moindre et de la stabilisation par mésomérie moins importante de l'intermédiaire réactionnel.

La déprotection des conjugués **28** et **29** conduit respectivement aux prodrogues « carbamate » **3** et « carbonate » **4** avec d'excellents rendements (86 et 91 %).

Eléments de détermination structurale :

- **27** RMN ¹H : apparition des doublets aromatiques du *p*-nitrobenzène (7,40 et 8,30 ppm) et glissement vers les champs faibles du doublet relatif au proton en position 3' du déoxyribose (de 4,55 à 5,41 ppm).
- **28** RMN ¹H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline), du NH du carbamate (triplet à 5,57 ppm) et disparition des signaux du *p*-nitrobenzène.
- **29** RMN ¹H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition des signaux du *p*-nitrobenzène.
- **3** RMN ¹H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 1,03 à 1,25 ppm).
- **3** spectrométrie de masse : [M+H]⁺_{th} = 794,03 / [M+H]⁺_{mes} = 794,21.
- **4** RMN ¹H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 1,08 à 1,18 ppm).
- **4** spectrométrie de masse : [M+H]⁺_{th} = 795,01 / [M+H]⁺_{mes} = 795,32.

[199] Spivey A. C. *et al.*, Nucleophilic catalysis by 4-(dialkylamino)pyridines revisited—The search for optimal reactivity and selectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436-5441

1.5. Conclusions

Quatre prodrogues de première génération (**1-4**) associant l'IUdR au vecteur *via* un espaceur « classique » ont été synthétisées et caractérisées par RMN (^1H , ^{13}C et 2D), spectrométrie de masse, infra-rouge et analyse élémentaire. Leurs structures sont rappelées dans la **Figure 42** suivante :

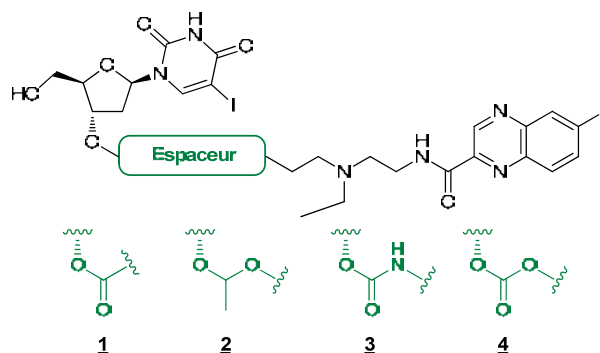


Figure 42 : Structures des prodrogues à espaceurs « classiques », première génération

Les voies de synthèse mises au point ont permis d'accéder aux différentes prodrogues avec les rendements globaux indiqués ci-dessous :

- « Ester » **1** : 7 % en 4 étapes.
- « Acétal » **2** : 7 % (*via* le mésylate **21a**) et 16 % (*via* le tosylate **21b**) en 7 étapes.
- « Carbamate » **3** : 13 % en 7 étapes.
- « Carbonate » **4** : 34 % en 5 étapes.

Les verrous synthétiques rencontrés ont permis d'apprécier la complexité de la chimie nucléosidique, notamment en terme de réactivité. De nombreuses réactions secondaires sont survenues lors des diverses étapes, et ce malgré la volonté d'appliquer des conditions les plus douces possibles. Nous avons également pu constater qu'à l'instar de la chimie des sucres, l'importance des groupements protecteurs est capitale et conditionne en grande partie la réussite et l'efficacité des voies de synthèse.

II. Evaluation *in vitro* de la première génération de prodrogues

Les évaluations *in vivo*, bien que parfaitement maîtrisées au laboratoire, sont délicates et parfois longues et onéreuses. Ainsi, nous avons choisi de mener des investigations préliminaires *in vitro* des prodrogues synthétisées, afin de sélectionner celles qui présentent un intérêt pour la poursuite des études par imagerie. Ces travaux préliminaires sont fondées sur des critères de stabilité physico-chimique dans différents milieux et de stabilité métabolique.

II.1. Stabilité physico-chimique

La stabilité physico-chimique des quatre prodrogues de première génération (« ester » **1**, « acétal » **2**, « carbamate » **3** et « carbonate » **4**) a été évaluée à 37 °C dans différents milieux : tampons phosphate salin (PBS) et acides, milieu de culture « Minimum Essential Medium » (MEM) et plasma humain. Une étude cinétique

de stabilité est réalisée pour chaque composé étudié dans les différents milieux sur un temps maximal de 3 jours par chromatographie en phase liquide (CLHP). La quantification est réalisée par étalonnage interne, permettant la normalisation des concentrations relativement à la concentration initiale. Les courbes à tendances exponentielles de concentration en fonction du temps obtenues pour chaque prodrogue dans chaque milieu permettent de déterminer les demi-vies (temps nécessaire pour obtenir la diminution de moitié de la concentration initiale) par régression logarithmique (**Figure 43** à **Figure 46**). Les valeurs des temps de demi-vie obtenus sont résumées dans les **Tableau 3** à **Tableau 7** incluant les quatre prodrogues de la première génération : « ester » **1**, « acétal » **2**, « carbamate » **3** et « carbonate » **4**.

➤ **PBS**

Ce tampon est très utilisé en biochimie car il présente un pH physiologique de 7,4. C'est un milieu peu dénaturant, seules les molécules chimiquement instables dans les milieux aqueux y sont dégradées. La **Figure 43** ci-dessous présente à titre d'exemple l'évolution de la concentration du « carbonate » **4** en fonction du temps (en noir : représentation cartésienne, en rouge : représentation logarithmique).

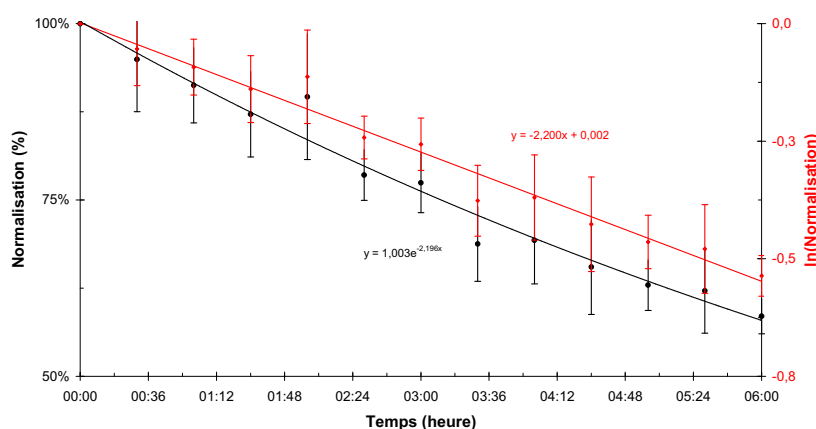


Figure 43 : Evolution de la concentration du « carbonate » **4** dans le PBS en fonction du temps

Pour ce composé, la demi-vie déterminée par extrapolation de la régression est de 7 h et 35 minutes. Les résultats obtenus pour les quatre prodrogues sont présentés dans le **Tableau 3** ci-dessous :

	Ester 1	Acétal 2	Carbamate 3	Carbonate 4
Temps de demi-vie	1 h 49	Stable à 3 j	Stable à 3 j	7 h 35

Tableau 3 : Temps de demi-vie des prodrogues **1** à **4** dans le PBS

Dans le tampon PBS, seuls l'« ester » **1** et le « carbonate » **4** sont instables. Ce résultat est attendu en raison de la sensibilité à l'hydrolyse de ces fonctions. Le « carbamate » **3** et l'« acétal » **2**, chimiquement plus stables, ne sont pas dégradés sur la durée des expérimentations (3 jours).

➤ Tampons acides

La coupure des prodrogues peut être provoquée par l'effet du pH dans certains compartiments physiologiques tels que les lysosomes et les mélanosomes. Dans notre approche, seule la prodrogue « acétal » 2 étant conçue pour libérer l'IUdR par ce mécanisme, l'analyse a toutefois été étendue aux trois autres. L'étude a tout d'abord été réalisée avec un tampon formiate d'ammonium 10 mM à pH = 5, valeur compatible avec le milieu intramélanosomal. La **Figure 44** ci-dessous indique l'évolution de la concentration du « carbonate » 4 en fonction du temps, et les résultats concernant les autres prodrogues sont résumés dans le **Tableau 4** qui suit :

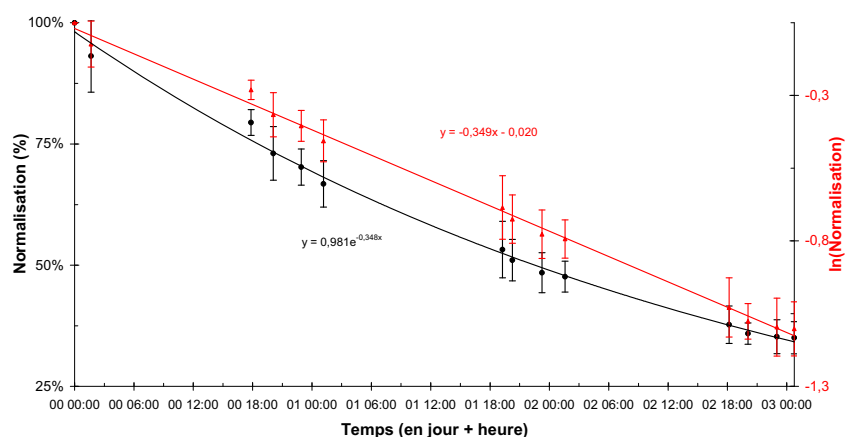


Figure 44 : Evolution de la concentration du « carbonate » 4 dans le tampon pH = 5 en fonction du temps

	Ester <u>1</u>	Acétal <u>2</u>	Carbamate <u>3</u>	Carbonate <u>4</u>
Temps de demi-vie	30 h	Stable à 3 j	Stable à 3 j	47 h

Tableau 4 : Temps de demi-vie des prodrogues 1 à 4 dans le tampon pH = 5

Dans ces conditions, deux prodrogues, l'« acétal » 2 et le « carbamate » 3 sont très stables (au-delà de trois jours) et les deux autres, l'« ester » 1 et le « carbonate » 4, présentent une demi-vie de plus d'un jour.

Concernant les prodrogues 1 et 4, les résultats obtenus (stabilité accrue vis-à-vis de l'expérience menée dans le PBS) ne sont pas surprenants, en raison de la fragilité de leur fonction espaceur en milieu aqueux due à l'hydrolyse, moins prononcée pour cette valeur de pH. Le « carbamate » 3, stable dans le PBS est également stable à pH légèrement acide de manière tout à fait logique. En revanche, aucune dégradation de l'« acétal » 2 n'a été relevée alors qu'elle était attendue pour ce composé comportant une fonction sensible au pH acide.

L'influence d'un pH plus acide a ensuite été étudiée afin de vérifier la possibilité de clivage de l'« acétal » 2. Deux tampons formiate d'ammonium 10 mM à pH = 4 et pH = 3 ont alors été testés. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 5** suivant.

	Ester <u>1</u>	Acétal <u>2</u>	Carbamate <u>3</u>	Carbonate <u>4</u>
Temps de demi-vie (pH = 3)	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 3 j
Temps de demi-vie (pH = 4)	ND	Stable à 3 j	ND	Stable à 3 j

ND = non déterminé

Tableau 5 : Temps de demi-vies des prodrogues 1 à 4 dans les tampons pH = 3 et pH = 4

Dans ces deux tampons, les composés 1, 3 et 4 sont stables sur la durée des expérimentations comme avec le tampon pH = 5. La donnée la plus marquante de cette série d'expériences est que l'« acétal » 2 reste stable également à pH = 3. Une expérience complémentaire a permis de montrer qu'il fallait atteindre une valeur de pH égale à 2 voire 1,5 pour observer son hydrolyse.

➤ MEM

Ce milieu de culture contenant des nutriments essentiels (acides aminés, sels, glucose et vitamines) est largement employé en culture cellulaire. Au laboratoire, il est utilisé pour la culture de lignées de mélanome murin ou humain (B16F0, SK-Mel, M4Beu,...) par exemple. La **Figure 45** suivante présente à titre d'exemple les résultats obtenus pour l'« ester » 1 tandis que le **Tableau 6** résume les demi-vies obtenues.

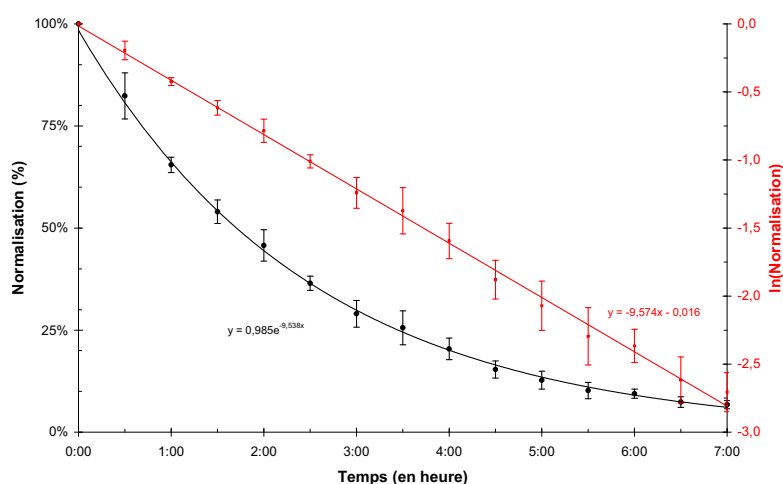


Figure 45 : Evolution de la concentration de l'« ester » 1 dans le MEM en fonction du temps

	Ester <u>1</u>	Acétal <u>2</u>	Carbamate <u>3</u>	Carbonate <u>4</u>
Temps de demi-vie	1 h 44	Stable à 2 j	Stable à 4 j	6 h 42

Tableau 6 : Temps de demi-vie des prodrogues 1 à 4 dans le MEM

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour l'étude dans le PBS. Les demi-vies associées aux prodrogues 1 et 4 sont du même ordre de grandeur que dans le PBS, la différence d'environ 1 h (7 h 35 vs. 6 h 42) observée pour le « carbonate » 4 peut être expliquée par la présence de diverses biomolécules (acides aminés, protéines) nucléophiles susceptibles d'attaquer la fonction carbonate. L'hydrolyse spontanée de l'« ester » 1 est si rapide que l'influence de ces réactions est négligeable (1 h 49 vs. 1 h 44). Comme précédemment, l'« acétal » 2 et le « carbamate » 3 sont stables sur les durées d'étude respectives (deux et quatre jours).

➤ Plasma humain

Le plasma humain contient un grand nombre de protéines qui peuvent se lier et ainsi stabiliser les prodrogues ou au contraire participer à leur dégradation. Ce milieu est donc un modèle reflétant la stabilité *in vivo* des prodrogues dans le système circulatoire sanguin. Les résultats obtenus par exemple pour l'« ester » **1** sont présentés ci-après (**Figure 46**) et les demi-vies des prodrogues **1** à **4** sont résumées dans le **Tableau 7**.

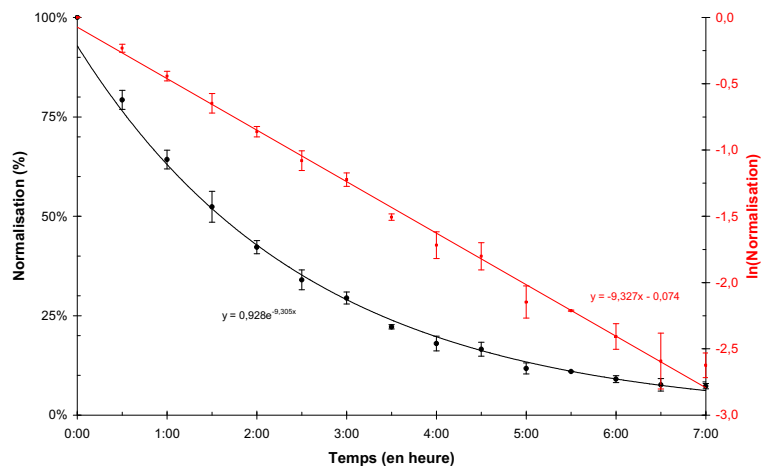


Figure 46 : Evolution de la concentration de l'« ester » **1** dans le plasma humain en fonction du temps

	Ester 1	Acétal 2	Carbamate 3	Carbonate 4
Temps de demi-vie	1 h 47	42 h	44 h	4 h 16

Tableau 7 : Temps de demi-vie des prodrogues **1** à **4** dans le plasma humain

La faible stabilité de l'« ester » **1** en milieu aqueux est retrouvée. La demi-vie du « carbonate » **4** est presque divisée par deux par rapport aux deux milieux neutres précédemment étudiés (PBS et MEM). Ceci semble indiquer que les enzymes présentes dans le plasma humain induisent la coupure de la fonction carbonate. Cet effet est également observé pour le « carbamate » **3**, jusqu'alors stable et même pour l'« acétal » **2**, alors que le pH du milieu est proche de la neutralité.

➤ Conclusions

La demi-vie relativement longue du « carbamate » **3** et de l'« acétal » **2** laisse espérer une libération du principe actif (IUdR) par l'action d'enzymes (*cf.* stabilité plasmatique). Toutefois, la libération efficace, bien qu'essentielle, ne constitue pas ici l'objectif principal : la première « étape » de notre stratégie consiste en effet à vérifier la possibilité de vectorisation du principe actif par le vecteur ICF01012. L'optimisation de la cinétique de clivage sera abordée dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Les prodrogues « ester » **1** et « carbonate » **4** sont d'une trop grande instabilité physico-chimique pour être retenues pour une évaluation *in vivo*. Les prodrogues « acétal » **2** et « carbamate » **3** sont en revanche très stables en milieux aqueux enrichis ou non (PBS, MEM, tampons, plasma) et permettent d'envisager une étude de biodistribution pour vérifier leur vectorisation vers les cellules de mélanome. Afin de réaliser cette étude, les deux prodrogues doivent être préalablement radiomarquées à l'iode 125.

II.2. Stabilité métabolique

Nous avons vu dans la partie bibliographique (cf. Chapitre 6 - paragraphe I.) que la famille d'enzymes principalement responsables du métabolisme primaire sont les cytochromes P450. Des études de stabilité sur microsomes (vésicules provenant de la fragmentation du réticulum endoplasmique) hépatiques murins ont été engagées. Les microsomes hépatiques sont en effet couramment utilisés pour l'exploration du métabolisme de nouveaux médicaments. Sans toutefois représenter de manière exacte le métabolisme *in vivo*, ces expériences permettent d'obtenir des premières indications sur le métabolisme primaire associé aux différentes prodrogues, et d'identifier les principaux métabolites générés. Sur la base des différents points de fragilité des structures mis en évidence, des perspectives de pharmacomodulation pertinentes pourront être envisagées.

Les prodrogues sont placées : (i) dans le milieu réactionnel seul (**MR**) constitué par un tampon phosphate 100 mM à pH = 7,4, du NADPH/H⁺ à 1 mM et 0,05 % de THF (v/v), (ii) dans le milieu réactionnel précédent additionné de microsomes à 1 mg/mL inactivés par chauffage à 100 °C pendant 5 minutes (**MI**) et (iii) dans le milieu réactionnel contenant des microsomes actifs (**MM**), constitué par le **MR**, additionné de microsomes (1 mg de protéines/mL ; pool de 25 foies de souris mâles CD1 titré en quantité de cytochromes P450, en activités cytochrome C réductase, carboxyl estérase, éthoxyrésorufine-dééthylase, pentoxyrésorufine-désalkylase et testostérone 6β-hydroxylase). La réaction est stoppée par addition de 1 mL d'éthanol à -20 °C puis l'échantillon est congelé à -80 °C pour la nuit. Il est ensuite centrifugé à 11000g pendant 5 minutes à 4 °C. 1,8 mL de solution hydroalcoolique est récupérée, le solvant éliminé au Speed-Vac et l'échantillon conservé à -80 °C jusqu'à analyse. Les expériences dans ces différents milieux permettent de distinguer les métabolites des produits résultants d'une dégradation par instabilité physico-chimique (par comparaison entre **MM** et **MI** / **MR**). Les échantillons obtenus lors de ces expériences sont ensuite analysés par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse (CLHP-SM²). Les quatre prodrogues de première génération ont été soumises à ces expériences. Seuls les résultats obtenus pour les prodrogues sélectionnées pour une évaluation *in vivo*, à savoir les prodrogues « acétal » **2** et « carbamate » **3**, seront présentés dans ce paragraphe.

II.2.1. Prodrogue « acétal » 2

Les expériences conduites avec cette prodrogue ont abouti à l'identification de quatre métabolites principaux, décrits dans le schéma métabolique suivant (**Figure 47**).

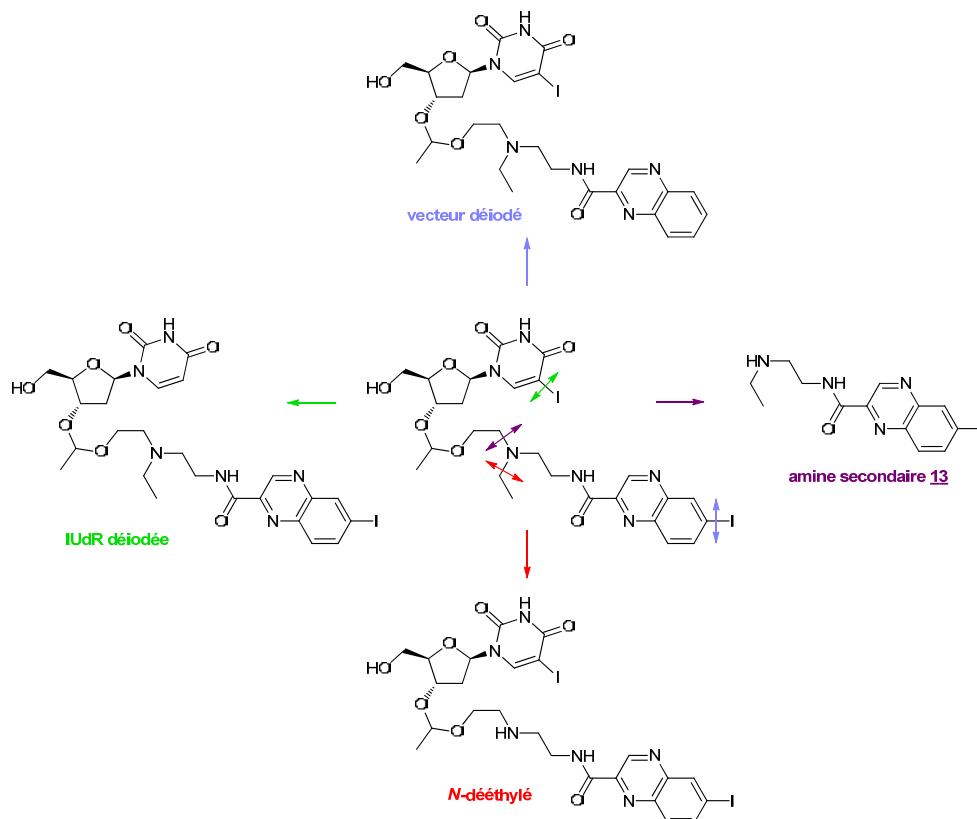


Figure 47 : Métabolites identifiés issus de la prodrogue « acétal » 2

Cette prodrogue étant stable dans les milieux **MR** et **MI**, il peut être affirmé que les produits de dégradation identifiés sont bien des métabolites. Ils résultent de la déiodation du vecteur (en bleu) ou de l'IUdR (en vert) et des *N*-déalkylations de l'amine tertiaire : soit par perte de la chaîne éthyle (en rouge) soit par coupure côté IUdR (en violet), cette dernière générant l'amine secondaire **13**. La **Figure 48** suivante présente l'évolution des concentrations normalisées (rapport des surfaces sous la courbe (SSC) de chaque pic) de la prodrogue et des différents métabolites en fonction du temps de contact avec les microsomes.

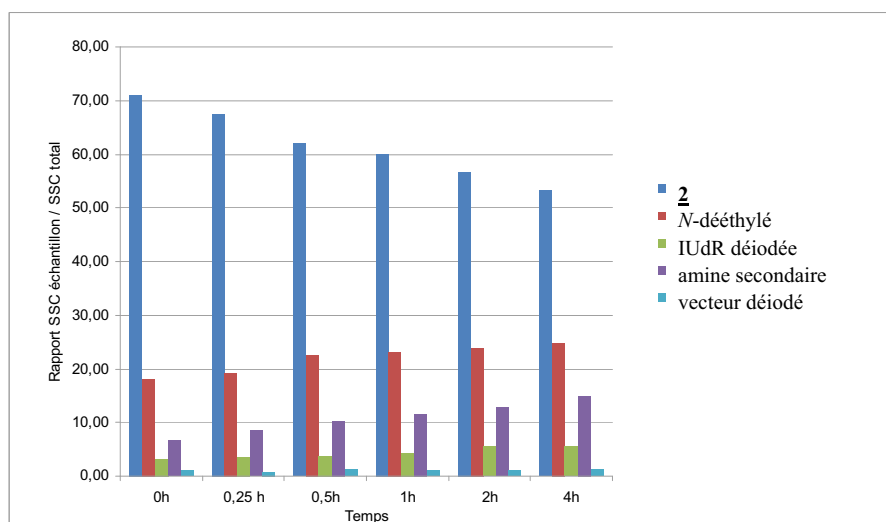


Figure 48 : Profil métabolique de la prodrogue « acétal » 2 en présence de microsomes hépatiques murins

La variation relative des concentrations des deux métabolites principaux (amine secondaire **13** et composé *N*-dééthylé) est représentée ci-dessous (**Figure 49**) :

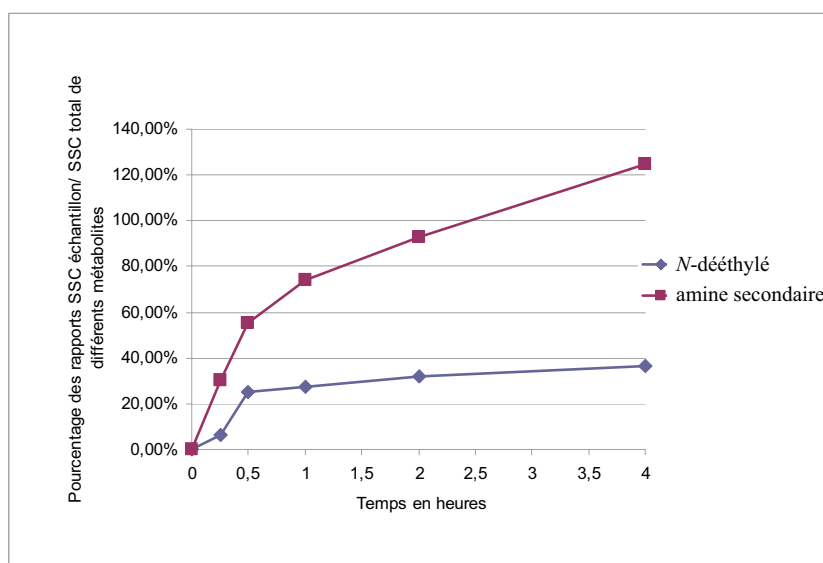


Figure 49 : Cinétique de formation des deux principaux métabolites de la prodrogue « acétal » **2**

Cette expérience permet de conclure que la cinétique de production de l'amine secondaire **13** est la plus rapide. Cette observation laisse présager une perte possible de vectorisation de la prodrogue *in vivo*. En effet, la production de l'amine secondaire étant liée à une coupure de l'espaceur reliant l'IUdR à l'édifice vecteur, le principe actif n'est plus vectorisé.

II.2.2. Prodrogue « carbamate » **3**

Quatre métabolites de la prodrogue « carbamate » **3** ont été identifiés. Ils proviennent des mêmes voies de métabolisme que ceux déterminés pour la prodrogue « acétal » **2**. La **Figure 50** suivante présente l'évolution des concentrations relatives de la prodrogue et des différents métabolites en fonction du temps de contact avec les microsomes :

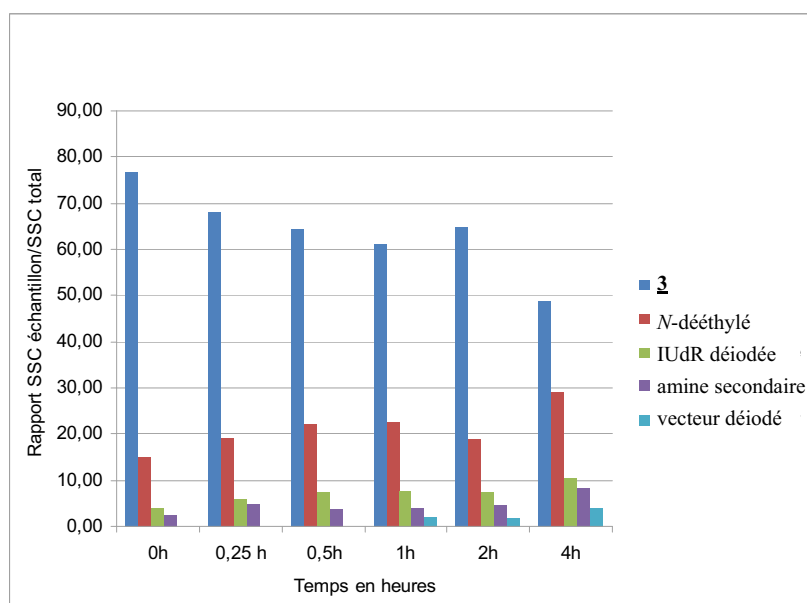


Figure 50 : Profil métabolique de la prodrogue « carbamate » **3** en présence de microsomes hépatiques murins

De même que précédemment, les métabolites principaux sont issus des *N*-déalkylations de l'amine tertiaire. La cinétique de formation de l'amine secondaire **13** est ici encore la plus rapide (**Figure 51**) :

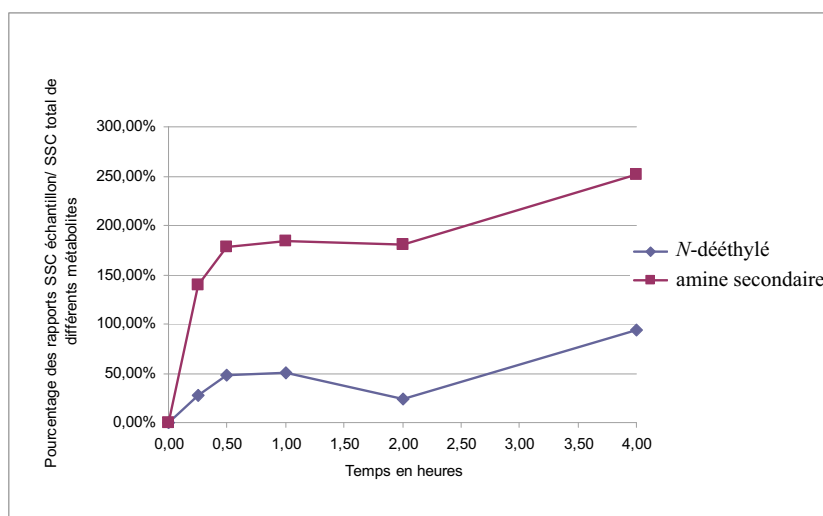


Figure 51 : Cinétique de formation des deux principaux métabolites de la prodrogue « carbamate » **3**

II.2.3. Conclusions

Cette étude de métabolisme *in vitro* sur microsomes hépatiques murins a permis de déterminer les principaux métabolites issus des prodrogues « acétal » **2** et « carbamate » **3**. Leur identification laisse présager que le principal point de fragilité des structures est l'amine tertiaire, pouvant conduire à une préjudiciable perte de vectorisation *via* une *N*-déalkylation libérant l'amine secondaire **13**. Dans une moindre mesure, une déiodation, principalement de l'IUDR, est observée *in vitro* et pourrait donc également se produire *in vivo*. Ces tendances doivent être confirmées par l'étude de biodistribution *in vivo* de ces prodrogues. La comparaison des résultats obtenus permettra de déterminer dans quelle mesure les études préliminaires de métabolisme sur microsomes hépatiques seraient prédictives du métabolisme *in vivo*.

III. Synthèse des précurseurs stannylés et radioiodations

La radioiodation à haute activité spécifique par l'iode 125 est réalisée par iodostannylation, méthode douce adaptée aux molécules polyfonctionnelles fragiles et très largement décrite dans la littérature (*cf.* chapitre 1 - paragraphe II.3.). Ceci nécessite la synthèse des dérivés stannylés **30** et **31**, précurseurs des prodrogues **2** et **3**, représentés ci-dessous (**Figure 52**).

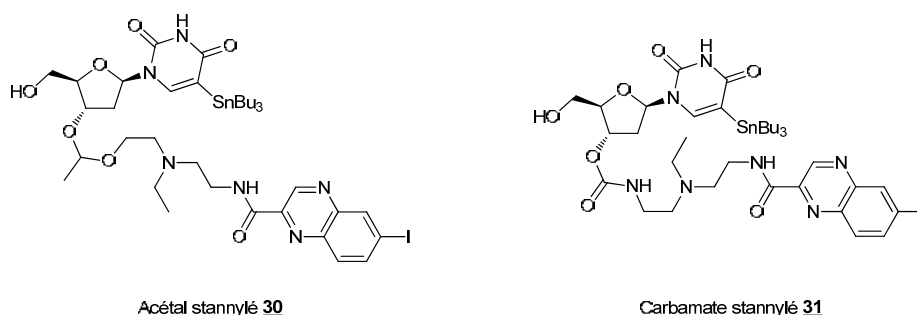


Figure 52 : Précurseurs stannylés **30** et **31**

III.1. Synthèse des précurseurs stannylés

L'introduction du groupement trialkylstannyle est en règle générale réalisée le plus tard possible dans les voies de synthèse. Mais, pour les molécules envisagées dans notre approche, le couplage de Stille (évoqué lors du chapitre 1) permettant la déiodostannylation de l'IUdR doit impérativement être réalisée avant le couplage au vecteur, qui présente également un iode échangeable, et après les étapes susceptibles de dégrader les stannyles, en raison des conditions réactionnelles employées.

III.1.1. « Acétal tributylstannyle » **30**

Les groupements tributylstannyles sont généralement sensibles aux milieux acides. Dans la voie de synthèse de la prodrogue « acétal », il doit donc être incorporé après la formation de la fonction acétal qui nécessite la présence catalytique d'un acide fort. En tenant compte de ces paramètres, la rétrosynthèse proposée est la suivante (**Schéma 26**) :

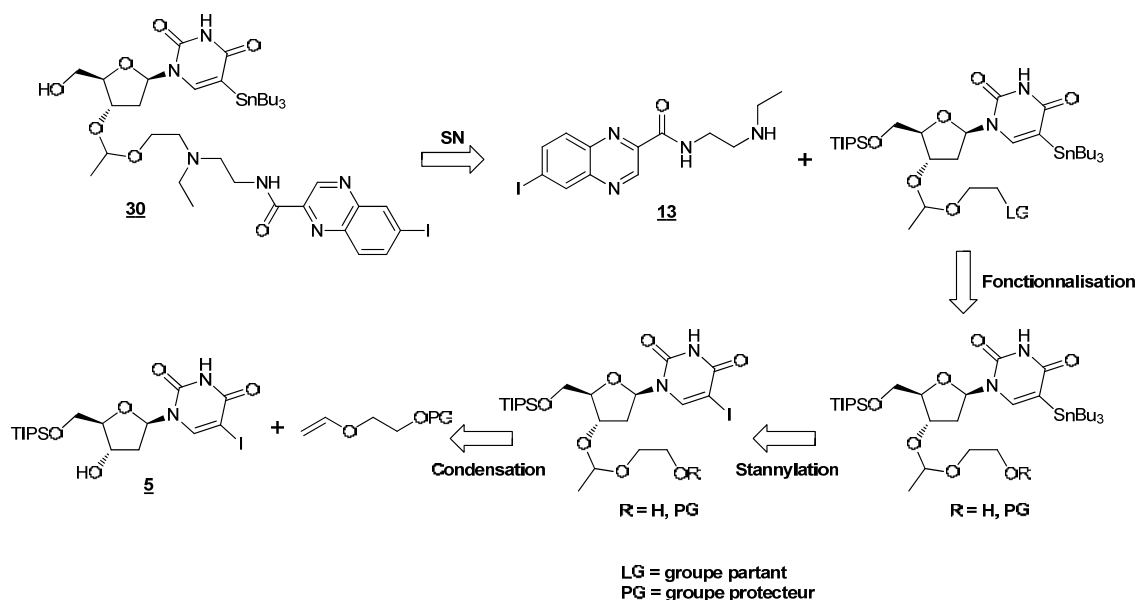
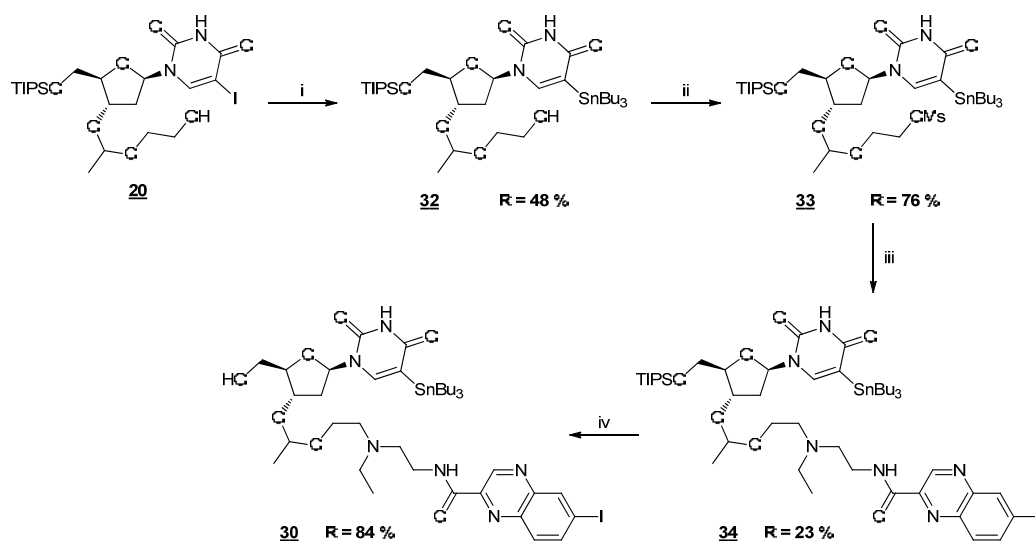


Schéma 26 : Rétrosynthèse de l'« acétal tributylstannyle » **30**

Les étapes principales sont identiques à celles mises au point pour la prodrogue « acétal » **2**, et la formation du groupement tributylstannyle est envisagée après la condensation de l'éther de vinyle sur l'IUdR protégée, et avant fonctionnalisation du bras espaceur.

La synthèse est réalisée à partir de l'alcool **20**, préalablement développé pour accéder à la prodrogue « acétal » **2** (**Schéma 27**) :



Réactifs et conditions : (i) Sn_2Bu_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, dioxane, Δ , 5 h ; (ii) (a) MsCl , pyridine, DMAP (cat.), CH_2Cl_2 , TA, 7 h ;
(iii) **13**, DIPEA, acétonitrile, 55°C, 6 h ; (iv) TBAF, THF, TA, 4 h

Schéma 27 : Synthèse de l'« acétal tributylstannyle » **30**

La première étape correspondant à un couplage de Stille catalysé par le palladium a nécessité l'optimisation des conditions réactionnelles, en particulier le choix du solvant (dioxane, toluène) et du catalyseur palladié ($\text{Pd(II)Cl}_2(\text{PPh}_3)_2$ et $\text{Pd(0)(PPh}_3)_4$). Le solvant ne semblant pas être à l'origine d'une différence de réactivité, le dioxane a été choisi pour sa meilleure capacité de solubilisation du produit de départ. Le palladium est généralement utilisé au degré d'oxydation 0 pour ce type de réactions. Cependant, le palladium tétrakistriphénylphosphine est relativement instable et doit être fraîchement préparé pour une réactivité optimale. Afin de s'affranchir de cette contrainte, son homologue oxydé, souvent utilisé pour les réactions de stannylation de l'IUdR^{[187],[200]} a donc été employé dans le dioxane à reflux, conduisant au stannylé **32** (R = 48 %). L'alcool **32** est ensuite converti en mésylate **33** (R = 76 %), le tosylate ayant été écarté en raison des faibles rendements obtenus lors de sa préparation.

Pour l'alkylation de l'amine secondaire **13**, la sensibilité du groupement tributylstannyle en milieu acide contraint à s'écarter des conditions optimales (sans base, acétonitrile, 50 °C) mises au point plus haut : une base, la DIPEA, est ainsi ajoutée. Le conjugué **34** est obtenu avec un rendement assez faible de 23 %. Il est en revanche efficacement déprotégé en « acétal tributylstannyle » **30** dans les conditions précédemment utilisées (TBAF, THF).

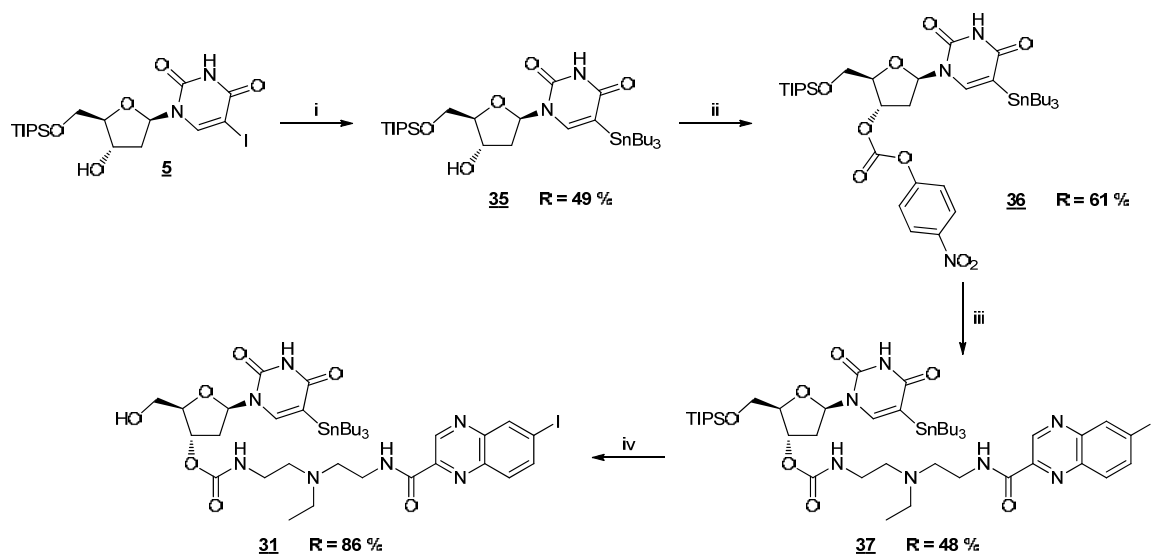
Eléments de détermination structurale :

- **32** RMN ^1H : blindage du signal du proton pyrimidique H_6 (de 8,04 à 7,12 ppm), apparition des signaux des chaînes butyles du groupement tributylstannyle (massifs de 0,89 à 1,61 ppm).
- **33** RMN ^1H : apparition du méthyle du mésylate (singulet à 3,04 ppm) et déblindage du signal des protons du CH_2 porteur du groupe partant (de 3,70 à 4,35 ppm).
- **34** RMN ^1H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition du signal du mésylate.
- **30** RMN ^1H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 0,99 à 1,11 ppm).
- **30** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 959,26$ et $957,26$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 959,43$ et $957,42$.

[200] Wigerinck P. *et al.*, Synthesis and antiviral activity of 5-thien-2-yl-2'-deoxyuridine analogs. *J. Med. Chem.* 1993, **36**, 538-543

III.1.2. « Carbamate tributylstannyle » **31**

Dans le cas du carbamate, le groupement tributylstannyle doit être introduit avant l'étape d'activation par le carbonate de *p*-nitrophénol, le carbonate activé risquant d'être dégradé par les conditions de la réaction de Stille. La synthèse est donc réalisée selon le **Schéma 28** suivant :



Réactifs et conditions : (i) SnBu_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, dioxane, Δ , 5 h 30 ; (ii) chloroformate de *p*-nitrophényle, pyridine, THF, TA, 3 h ; (iii) **25**, DMAP, CH_2Cl_2 , TA, 16 h ; (iv) TBAF, THF, TA, 1 h 30

Schéma 28 : Synthèse du « carbamate tributylstannyle » **31**

L'introduction du groupement tributylstannyle de l'IUdR protégée **35** est conduite dans des conditions identiques à celles utilisées pour la prodrogue « acétal tributylstannyle » **30** (catalyse par le palladium (II), dioxane, cf. paragraphe précédent), avec un rendement comparable (R = 49 %).

La fonction alcool en position 3' de l'IUdR est activée par la formation du carbonate de *p*-nitrophénol **36** avec un rendement de 61 %. Le rendement de l'étape de couplage avec l'amine primaire **25** déjà disponible (réactif utilisé pour la synthèse de la prodrogue « carbamate » **3**) est inférieur à celui observé pour l'obtention du conjugué **28** (48 % vs. 96 %). L'encombrement stérique apporté par le groupement tributylstannyle gêne probablement l'attaque de la DMAP sur le carbonate activé **36**. En effet, une quantité importante (environ 30 %) de carbonate activé **36** est isolé après purification.

La déprotection dans les conditions habituelles permet d'isoler le « carbamate tributylstannyle » **31** avec un très bon rendement.

Eléments de détermination structurale :

- **35** RMN ^1H : blindage du signal du proton pyrimidique H_6 (de 8,06 à 7,09 ppm), apparition des signaux des chaînes butyles du groupement tributylstannyle (massifs de 0,89 à 1,56 ppm).
- **36** RMN ^1H : apparition des signaux aromatiques du *p*-nitrophénol (doublets à 7,40 et 8,30 ppm) et déblindage du signal du proton en position 3' du déoxyribose (de 4,47 à 5,43 ppm).
- **37** RMN ^1H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition des signaux du *p*-nitrophénol.
- **31** RMN ^1H : disparition des signaux du groupement TIPSOS (massif de 1,00 à 1,11 ppm).
- **31** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 958,24 / [\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 958,29$.

III.2. Radioiodations

La radiodémallation des organostannyles implique une réaction de substitution électrophile aromatique (SE_{ar}) par l'iodonium $[^{125}I] I^+$. Il est généré *in situ* par oxydation en milieu acide ou proche de la neutralité d'une solution de $[^{125}I] NaI$ dans la soude 10^{-5} M. Divers milieux réactionnels (tampons, solution HCl) et différents oxydants (acide peracétique, chloramine T) ont été testés pour la mise au point de la réaction de radioiodation suivante (**Schéma 29**) :

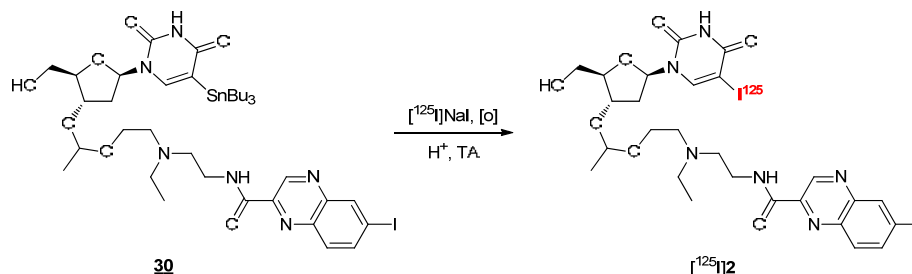


Schéma 29 : Radioiodation de l'« acétal tributylstannyle » **30**

III.2.1. Mise au point de la radioiodation

Les radioiodations de l'IUDR à l'iode 125 sont généralement réalisées dans le chloroforme avec comme oxydant l'acide peracétique. L'influence de l'hétérogénéité du milieu a été vérifiée par des essais utilisant l'éthanol à la place du chloroforme. Ces conditions ont donc tout d'abord été testées :

- 100 μ L de solution de **30** dans le **solvant** étudié (1 mg / mL),
- 1,3 μ L de $[^{125}I]NaI$ (100 μ Ci),
- **quantité variable d'oxydant.**

Les réactions sont stoppées à **différents temps** (de 1 à 10 min) en réduisant l'oxydant, le diiode volatil et les iodoniums en iodures par ajout de :

- 100 μ L de $Na_2S_2O_5$ (20 mg / mL H_2O) et
- 400 μ L de NaOH (**0,25 ou 0,5 N**, voir ci-dessous).

Le suivi a été réalisé par CLHP (phase inverse C_{18} , t_R ($[^{125}I]I^-$) = 2,7 min, t_R ($[^{125}I]2$) = 9,8 min et t_R (**30**) = 17,2 min). La quantification des composés radioactifs du milieu réactionnel ont été déterminés par un détecteur de radioactivité Raytest en sortie de CLHP (**Tableau 8**) :

Essai	Solvant	Oxydant	Temps	Base	% $[^{125}I]I^-$ - % $[^{125}I]2$
1	$CHCl_3$	5 μ L H_2O_2 25 % / AcOH (1/3)	1'	NaOH 0,25 N	96,8 - 3,2
2	$CHCl_3$	5 μ L H_2O_2 25 % / AcOH (1/3)	3'	NaOH 0,25 N	ND
3	$CHCl_3$	5 μ L H_2O_2 25 % / AcOH (1/3)	5'	NaOH 0,25 N	ND
4	$CHCl_3$	5 μ L H_2O_2 25 % / AcOH (1/3)	10'	NaOH 0,25 N	95,4 - 4,6
5	EtOH	5 μ L H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	5'	NaOH 0,5 N	96 - 4
6	EtOH	5 μ L H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	10'	NaOH 0,5 N	96 - 4
7	EtOH	10 μ L H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	5'	NaOH 0,5 N	94,5 - 5,5
8	EtOH	10 μL H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	10'	NaOH 0,5 N	93,8 - 6,2
9	EtOH	10 μ L H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	15'	NaOH 0,5 N	97,6 - 2,4
10	EtOH	10 μ L H_2O_2 50 % / AcOH (1/3)	20h	NaOH 0,5 N	91,7 - 4,3

Tableau 8 : Essais de radioiodation de l'« acétal tributylstannyle » **30** avec l'acide peracétique

Ces conditions sont inefficaces pour la radioiodation envisagée : les meilleures conditions (essai 8) ne produisent que 6,2 % de l'« acétal » $[^{125}\text{I}]\mathbf{2}$. Un autre agent oxydant couramment utilisé pour des réactions de radiodémétallation de biomolécules a alors été testé : la chloramine T monohydratée (CAT, **Figure 53**).

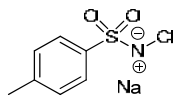


Figure 53 : Structure de la chloramine T

A l'exception de l'oxydant utilisé en solution dans l'eau, le protocole utilisé pour les essais suivants est le même que précédemment, l'acidité du milieu étant assurée par un tampon :

- 100 μL de solution de **30** dans EtOH (1 mg / mL),
- 1,3 μL de $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ (100 μCi),
- 100 μL de tampon citrate pH = 4,
- **quantités variées de CAT** (1 mg / mL H_2O).

Les mélanges sont ensuite « **quenchés** » de **diverses manières** résumées dans le **Tableau 9** suivant, le métabisulfite de sodium étant toujours à une concentration de 20 mg / mL :

Essai	Quantité d'oxydant	Temps	« Quench »	% $[^{125}\text{I}]\text{I}^-$ - % $[^{125}\text{I}]\mathbf{2}$
11	20 μL	5'	100 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 400 μL NaOH 0,25 N	60,9 - 39,1
12	20 μL	20'	100 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 400 μL NaOH 0,25 N	56,8 - 43,2
13	20 μL	20'	Aucun	30,2 - 64,3
14	40 μL	20'	100 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 400 μL NaOH 0,25 N	60 - 39,9
15	60 μL	20'	100 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 400 μL NaOH 0,25 N	64,9 - 35,1
16	40 μL	20'	Aucun	28,5 - 65,3
17	40 μL	50'	Aucun	24,2 - 69,8
18	40 μL	20'	100 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	69,6 - 30,4
19	40 μL	20'	100 μL NaOH 0,25 N	29,8 - 70,3

Tableau 9 : Essais de radioiodation de l'« acétal tributylstannyle » **30** avec la CAT, influence du « quench »

Ces conditions sont bien meilleures que les précédentes : dès le premier essai (essai 11), 39 % de $[^{125}\text{I}]\mathbf{2}$ ont été obtenus. La quantité de CAT, toujours en très large excès est peu influante (essai 12 vs. 14 ou 15), une plus grande quantité tendant même à diminuer le rendement. Un temps de réaction de 20 minutes semble optimal (essai 16 vs. 17) : une différence de quelques % sur le rendement est observée avec 30 minutes supplémentaires, associée à l'apparition de produits de dégradation (relevés en UV).

L'influence majeure semble être liée à la concentration en métabisulfite de sodium et en soude : les meilleurs taux de conversion sont observés en absence de ces derniers. Cependant, les chiffres peuvent être trompeurs, car le diiode est volatil et en l'absence de réducteur, il peut ne pas être détecté sous forme d'iodures (essais 13, 16 et 17). L'action du réducteur seul (essai 18) redonne des pourcentages équivalents à ceux observés auparavant, tandis que la base seule (essai 19) est à l'origine du meilleur résultat. Il faut noter que le diiode et les iodoniums ne peuvent exister en milieu basique. Une conversion à hauteur de 70 % n'étant pas satisfaisante, l'optimisation de la réaction a été poursuivie.

Les essais suivants ont été réalisés dans les conditions données ci-dessous :

- 100 µL de **30** dans EtOH (1 mg / mL),
- 1,4 µL de [¹²⁵I]NaI (100 µCi),
- 100 µL de solution acide (**tampon citrate pH = 4 ou HCl 0,1 N**, voir ci-après),
- **quantités variables de CAT** (1 mg / mL H₂O).

Les milieux sont ensuite « **quenchés** » de **différentes manières** (résumées dans le **Tableau 10**), avec le métabisulfite de sodium 40 fois moins concentré (1 mg / 2 mL H₂O) ou le thiosulfate de sodium Na₂S₂O₃ (1 mg / 2 mL H₂O). Afin d'adoucir les conditions de « quench », la concentration en soude a également été diminuée à 0,1 N, concentration suffisante pour l'obtention d'un pH basique.

Essai	Acide	CAT	Temps	Quench	% [¹²⁵ I]I - % [¹²⁵ I]2
20	Tampon 4	100 µL	20'	200 µL Na ₂ S ₂ O ₅ + 100 µL NaOH 0,1 N	44,3 - 55,7
21	Tampon 4	75 µL	20'	200 µL Na ₂ S ₂ O ₅ + 100 µL NaOH 0,1 N	45,8 - 54,2
22	Tampon 4	40 µL	20'	100 µL Na ₂ S ₂ O ₃ + 100 µL NaOH 0,1 N	53,4 - 46,6
23	HCl 0,1 N	40 µL	10'	100 µL Na ₂ S ₂ O ₅ + 200 µL NaOH 0,1 N	21 - 79
24	HCl 0,1 N	40 µL	20'	100 µL Na₂S₂O₅ + 200 µL NaOH 0,1 N	18,8 - 81,2
25	HCl 0,1 N	100 µL	10'	100 µL Na₂S₂O₅ + 200 µL NaOH 0,1 N	18,7 - 81,3

Tableau 10 : Optimisation de la radioiodation de l'« acétal tributylstannyle » **30**

La concentration plus faible en métabisulfite de sodium permet d'améliorer sensiblement le rendement brut (essais 20 et 21) par rapport aux essais précédents, tandis que l'utilisation de thiosulfate de sodium (essai 22) conduit à une dégradation plus importante et donc à un rendement plus faible. Dans un premier temps, il semble inconcevable d'utiliser de l'acide chlorhydrique pour acidifier le milieu : à une concentration de 0,1 N, le pH est de la solution est de 1. Même si la fonction acétal a démontré *in vitro* une plus grande stabilité en milieu acide que celle escomptée, il paraissait risqué de la placer dans un milieu contenant un acide fort. Cependant, les essais de marquage réalisés dans ces conditions permettent d'augmenter largement le taux de conversion (essais 23 à 25). Le temps de réaction très court est certainement insuffisant pour observer une dégradation, mais l'utilisation d'acide chlorhydrique en conditions oxydantes implique la formation de dichlore et de chloronium qui peut également participer à la substitution électrophile. Ce phénomène est à l'origine de la formation d'une impureté non radioactive (visible en UV) inséparable en chromatographie. Toutefois, la quantité ainsi produite est très faible et ne diminue que légèrement l'activité spécifique.

Le rendement radiochimique permet d'envisager la radioiodation à plus grande échelle pour les études de biodistribution chez l'animal.

III.2.2. Synthèse de la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2

Ce sont donc les conditions de l'essai 24 qui ont été appliquées pour la radioiodation du précurseur stannylé **30**. Le milieu réactionnel brut est purifié par CLHP semi-préparative. L'« acétal » [¹²⁵I]2 est alors isolé avec un rendement radiochimique de 71 % et une pureté radiochimique supérieure à 99 %.

III.2.3. Synthèse de la prodrogue « carbamate » [¹²⁵I]3

Un essai de radioiodation du précurseur stannylé **31** a conduit au « carbamate » [¹²⁵I]3 dans des conditions identiques à celles utilisées pour le précurseur **30**, avec un rendement brut de radioiodation légèrement plus faible (environ 65 %). Après purification par CLHP, le « carbamate » [¹²⁵I]3 est obtenu avec un rendement radiochimique de 45 % et une pureté radiochimique supérieure à 99 %.

Ces deux dérivés marqués à l'iode 125 ont alors été engagés dans une étude de biodistribution *in vivo* sur un modèle de souris porteuse de tumeur mélanique.

IV. Evaluations *in vivo*

Ces études ont été réalisées après accord du Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale en Auvergne (CEMEEA, saisine agréée sous le numéro d'enregistrement CE18-09), dans le cadre défini par la législation relative à l'expérimentation animale. Le modèle utilisé est un modèle de souris C57Bl6J âgées de 6 semaines porteuses sur le flanc de xénogreffes de tumeur de mélanome murin B16F0. La lignée cellulaire utilisée pour l'induction de la tumeur provient de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules sont décongelées et cultivées dans le milieu D-MEM Glutamax, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Puis, après trypsination, une suspension cellulaire est préparée (3.10⁶ cellules / mL de PBS) et inoculée aux animaux par voie sous-cutanée à raison de 300 000 cellules sur le flanc droit de chaque animal. Après dix jours, les tumeurs sont palpables et mesurables avec un pourcentage de prise de 98-100%. Après 14 jours de croissance tumorale, les prodrogues radiomarquées à l'iode 125 sont injectées aux animaux par voie intraveineuse (100 µCi par animal dans la veine caudale) après reprise dans le sérum physiologique contenant 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d'éthanol. La localisation tumorale sur le flanc permet une quantification aisée de la fixation par imagerie γ plane.

Après acquisition, les images obtenues sont analysées : (i) qualitativement afin d'identifier les principaux organes cibles et (ii) quantitativement par la définition de région d'intérêt (ROI) localisées au niveau des organes cibles, notamment la tumeur et les yeux, et du bruit de fond (généralement le muscle). La taille de chaque ROI est calculée en mm² et l'activité radioactive de chaque ROI est alors obtenue en terme de radioactivité totale en coups / minute (cpm) et en activité surfacique (cpm / mm²). Après correction de la décroissance radioactive, la biodistribution et la cinétique tumorale sont déterminées selon la méthodologie préalablement validée par le laboratoire ^[201].

[201] Miot-Noirault E. *et al.*, The use of [¹²⁵I] scintigraphic *in vivo* imaging in melanoma-bearing mice for a rapid prescreening of vectors to melanoma tissue. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 629-636

Parallèlement, une étude de biodistribution par prélèvement d'organes a été réalisée sur le même modèle expérimental : les animaux sont sacrifiés à des temps précoces (5 min, 1 h et 3 h) et tardif (24 h) post-injection (p.i.) et les organes d'intérêt (sang, muscle, foie, reins, rate, yeux, thyroïde + glandes sous-maxillaires (GSM) et tumeur) sont prélevés, pesés et leur radioactivité quantifiée par un compteur gamma de type Packard. Après correction de la décroissance radioactive, la distribution a été exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe (% DI / g).

IV.1. Prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2

➤ Imagerie scintigraphique

L'étude de cette prodrogue radioiodée par imagerie TEMP après injection à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffes de tumeur mélanique B16F0 permet d'accéder aux images suivantes (**Figure 54**) :

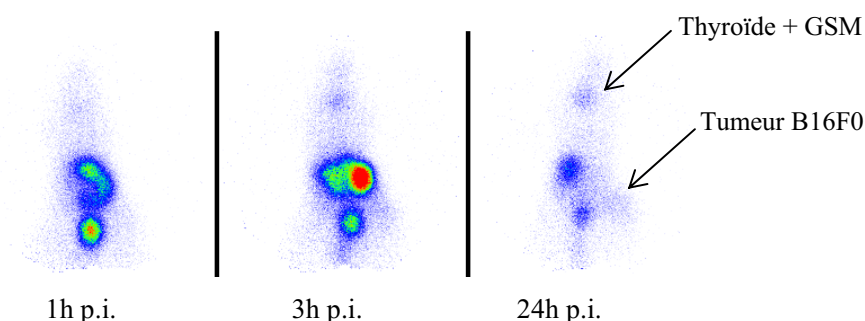


Figure 54 : Scintigraphies après injection de la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2 à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffes de tumeur mélanique B16F0

Dès le temps 1 h p.i. une accumulation radioactive est détectée au niveau du tissu digestif et de la vessie. Il est très difficile de mettre en évidence une concentration au niveau tumoral : il faut attendre une élimination des organes non cibles au temps 24 h pour distinguer légèrement la tumeur.

Les valeurs de pourcentage de dose injectée par gramme de tumeur déterminées à partir des scintigraphies sont résumées dans le **Tableau 11** suivant :

Temps post-injection	% DI / g de tumeur
1 h	1,01 ± 1,43
3 h	0,60 ± 0,70
24 h	0,24 ± 0,30

Tableau 11 : Concentration tumorale (% DI / g de tumeur) après injection de la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2 à des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

➤ Prélèvements

L'étude de biodistribution par sacrifices des animaux, prélèvements d'organes et quantification par compteur gamma permet d'obtenir les données résumées dans le **Tableau 12** suivant.

% DI / g	5 min <i>p.i.</i>	3 h <i>p.i.</i>	24 h <i>p.i.</i>
Tumeur	1,21	1,91	0,49
Sang	ND	ND	ND
Muscle	0,62	0,22	0,06
Yeux	0,78	1,24	0,50
Foie	4,54	1,66	0,15
Reins	13,93	1,13	0,18
Rate	ND	ND	ND
Thyroïde + GSM	ND	ND	ND
Tumeur / muscle	1,95	8,60	8,59
Tumeur / sang	ND	ND	ND
Yeux / muscle	1,26	5,64	8,33

Tableau 12 : Biodistribution de la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]**2** sur des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

Dès 5 minutes *p.i.*, une forte accumulation rénale et hépatique est mise en évidence, confirmant l'élimination rapide pressentie à la lecture des images précédentes. Les rapports tumeur / muscle et yeux / muscle sembleraient indiquer une augmentation de la sélectivité au cours du temps, mais l'absence de prélèvement sanguin ne permet pas de confirmer cette tendance par le rapport tumeur / sang.

IV.2. Prodrogue « carbamate » [¹²⁵I]**3**

➤ Imagerie scintigraphique

L'étude de cette prodrogue radioiodée par imagerie TEMP après injection à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffes de tumeur mélanique B16F0 conduit aux images suivantes (**Figure 55**) :

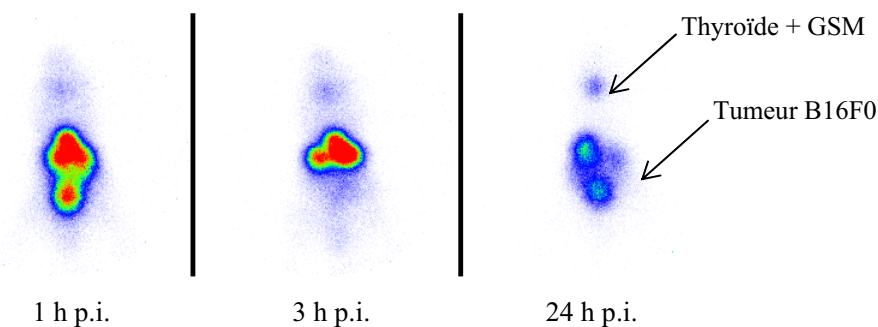


Figure 55 : Scintigraphies après injection de la prodrogue « carbamate » [¹²⁵I]**3** à des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

Dès 1 h p.i., une accumulation radioactive est détectée au niveau du tissu digestif, de la vessie et de la région « thyroïde / glandes sous-maxillaires ». Il est très difficile de mettre en évidence une activité dans les tumeurs, non visibles sur les images obtenues, rendant la quantification par imagerie impossible.

➤ Prélèvements

L'étude de biodistribution par sacrifices des animaux, prélèvements d'organes et quantification par compteur gamma permet d'obtenir les données résumées dans le **Tableau 13** suivant :

% DI / g	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Tumeur	1,34	1,47 ± 0,03	0,61 ± 0,05
Sang	1,31	1,48 ± 0,18	0,49 ± 0,16
Muscle	0,37	0,40 ± 0,07	0,09 ± 0,01
Yeux	0,78	0,92 ± 0,01	0,59 ± 0,19
Foie	2,97	1,59 ± 0,06	0,40 ± 0,06
Reins	1,98	1,46 ± 0,08	0,33 ± 0,08
Rate	1,06	1,53 ± 0,19	0,69 ± 0,23
Thyroïde + GSM	2,41	5,44 ± 1,40	3,42 ± 0,62
Tumeur / muscle	3,62 ± 0,95	3,68 ± 0,72	6,78 ± 0,71
Tumeur / sang	0,95 ± 0,10	1,00 ± 0,14	1,23 ± 0,33
Yeux / muscle	2,02 ± 0,08	2,35 ± 0,38	6,43 ± 2,10

Tableau 13 : Biodistribution de la prodrogue « carbamate » $[^{125}\text{I}]\mathbf{3}$ sur des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

Une forte accumulation est observée au niveau de l'estomac et de la thyroïde dès le temps 1 h p.i., indiquant une probable déiodation *in vivo* et confirmant l'observation issue des scintigraphies. Le rapport tumeur / sang étant de l'ordre de 1, l'activité tumorale correspond donc à l'activité du sang circulant.

IV.3. Discussion et conclusions

L'ensemble de ces expériences permet de tirer les conclusions suivantes :

➤ L'élimination des prodrogues radioiodées est très rapide (signal faible à 24 h) et une très importante fixation abdominale (foie, estomac, rate) est rapidement constatée (au bout de 5 à 10 minutes), suivie d'une fixation dans les organes d'élimination (reins). Ces données semblent indiquer une métabolisation très rapide et l'élimination subséquente des prodrogues. Un prélèvement sanguin effectué 15 minutes après injection de la prodrogue radioiodée révèle après analyse CLHP que seulement 4 % de la dose injectée correspond à la prodrogue inchangée, alors que les 96 % restants représentent plusieurs composés très polaires. Ceci confirme l'hypothèse d'une métabolisation rapide, pressentie par l'étude *in vitro* réalisée sur les microsomes hépatiques.

➤ Aucune fixation tumorale n'a été observée. Dans le cas des deux prodrogues radioiodées étudiées, un rapport tumeur / sang aux alentours de 1 a été déterminé pour les trois temps. Ces observations sont par ailleurs cohérentes avec l'absence d'accumulation au niveau des yeux des animaux, organes fortement pigmentés dans notre modèle.

➤ L'absence de vectorisation est certainement liée à la métabolisation très rapide des prodrogues. Le principal point de fragilité semble résider dans l'amine tertiaire qui subit diverses *N*-déalkylations, provoquant notamment la séparation entre principe actif et vecteur, empêchant ainsi toute vectorisation tumorale.

➤ De ces résultats, nous pouvons également conclure que les expériences menées *in vitro* sur microsomes hépatiques étaient prédictives de l'étude *in vivo* : perte précoce de l'édifice vecteur de la prodrogue *via* une *N*-déalkylation qui nécessiterait cependant d'être confirmée par une étude complète de métabolisme *in vivo*.

A ce stade, une pharmacomodulation est nécessaire pour tenter d'endiguer le métabolisme de l'amine tertiaire observé pour les prodrogues **2** et **3**. La protection de ce talon d'Achille pourrait ainsi permettre à celles-ci de résister au premier passage hépatique.

L'instabilité en milieu aqueux de la prodrogue « ester » **1** observée *in vitro* doit être corrigée par le renforcement de la liaison ester, tandis que l'absence d'hydrolyse de la prodrogue « acétal » **2** en milieu acide constitue également une source de préoccupation devant être résolue.

CHAPITRE 3

*Prodrogues à espaceur « classique »,
deuxième génération*

I. Synthèses de la deuxième génération de prodrogues

Les données obtenues lors des évaluations précédemment décrites nous ont engagés à poursuivre nos investigations en apportant des modifications susceptibles d'améliorer le ciblage tumoral des conjugués. Ainsi, quatre nouvelles prodrogues représentées ci-dessous (**Figure 56**) ont été envisagées.

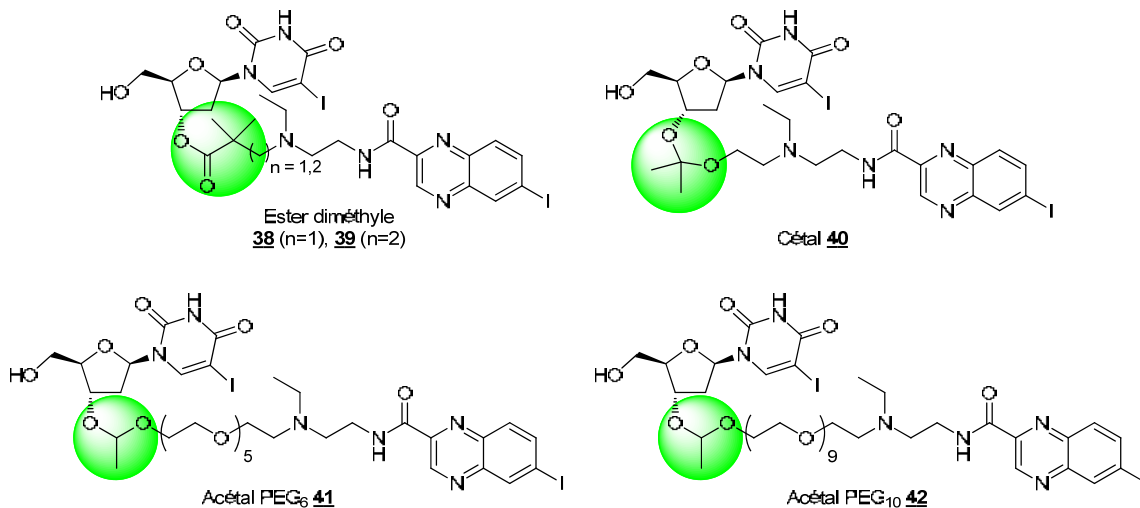


Figure 56 : Structures des prodrogues de deuxième génération

La trop grande instabilité de la prodrogue « ester » **1** pourrait être corrigée par l'ajout de deux groupements méthyle portés par le carbone en α du groupe carbonyle (prodrogues **38** et **39**). En effet, cette modification est connue pour améliorer la stabilité en milieu aqueux (par effet inductif stabilisant des méthyles) et la stabilité métabolique (action des estérases et des cytochromes) par augmentation de l'encombrement stérique ^[202].

La prodrogue « acétal » **2** est en revanche trop stable : aucune hydrolyse n'a été observée entre pH = 3 à 7. Il a été démontré qu'un cétal était plus facilement hydrolysé que l'acétal correspondant ^{[203],[204]}. Cet ajustement structural (prodrogue **40**) a ainsi été appliqué dans l'espoir d'observer une libération de la drogue pour des valeurs de pH plus proches de celles rencontrées dans les mélanosomes (pH = 5 à 6).

Pour améliorer la stabilité métabolique des prodrogues étudiées *in vivo*, le bras espaceur a été modifié par l'introduction de chaînes polyéthylène glycol (PEG). Cette approche déjà exploitée au laboratoire a notamment permis d'améliorer comparativement à ses homologues éthyle ou propyle la biodistribution d'un traceur radiofluoré ciblant les mélanines (Billaud *et al.*, travaux en cours de publication). Dans notre approche, deux longueurs de chaînes PEG ont été choisies : 6 et 10 unités (prodrogues **41** et **42**).

La rétrosynthèse générale de ces prodrogues est identique à celle décrite pour la synthèse des prodrogues de première génération (*cf.* chapitre 1 - paragraphe III.).

[202] Barreiro E. J. *et al.*, The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215-5246

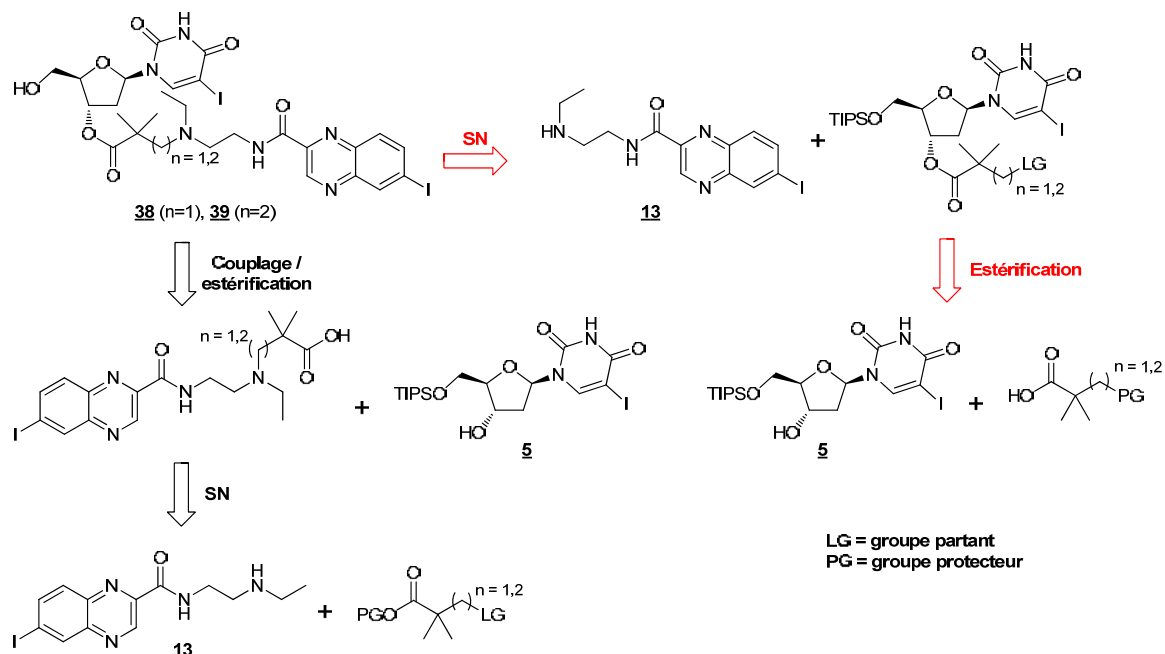
[203] Jain R. *et al.*, Synthesis and degradation of pH-sensitive linear poly(amidoamine)s. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457

[204] Kwon Y. J. *et al.*, Directed antigen presentation using polymeric microparticulate carriers degradable at lysosomal pH for controlled immune responses. *Mol. Pharmaceut.* **2005**, *2*, 83-91

1.1. Prodrogues « esters diméthyles »

1.1.1. Rétrosynthèse

La synthèse des prodrogues « ester diméthyle » **38** et **39** a été envisagée selon les deux méthodes décrites ci-dessous (**Schéma 30**).



Comme pour la prodrogue « ester » **1**, deux approches convergentes pouvant mener à ces prodrogues sont possibles :

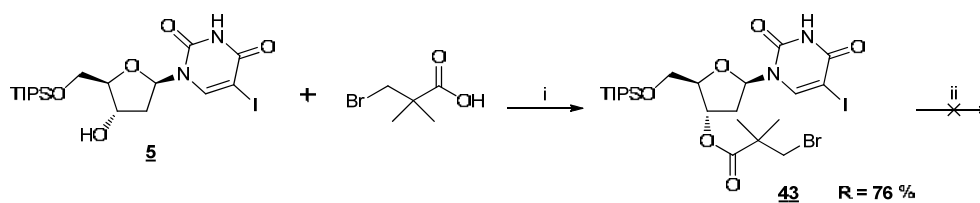
- **en noir**, l'alkylation de l'amine secondaire **13** par le fragment correspondant à l'espaceur puis un couplage de l'amine tertiaire fonctionnalisée ainsi obtenue avec l'IUdR protégée **5**,

- **en rouge**, l'estérification de l'IUdR protégée **5** suivie de la substitution nucléophile par l'amine secondaire **13**.

1.1.2. Synthèse

➤ Prodrogue « ester diméthyle » **38** ($n = 1$)

La synthèse de cette prodrogue a été initiée selon la stratégie décrite **en rouge** :



Réactifs et conditions : (i) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → TA, 48 h ; (ii) **13**, base, solvant, 1

L'estérification de l'IUDR protégée **5** par l'acide 3-bromo-2,2-diméthylpropanoïque commercial dans les conditions développées pour la prodrogue « ester » **1** conduit au bromoester **43** avec un bon rendement (*Schéma 31*). Les différentes tentatives de substitution nucléophile de ce dernier par l'amine secondaire **13** n'ont pas abouti, et ce quelles que soient les conditions utilisées : variations de la nature de la base (NEt₃, DIPEA, DBU) et/ou du solvant (DMF, acétonitrile, EtOH). Dans le cas suivant : DBU, DMF, 80 °C pendant 3 jours, un produit majoritaire a été isolé et clairement identifié par RMN ¹H, ¹³C et 2D ainsi que par spectrométrie de masse. Par analogie avec les précédents sous-produits obtenus, nous avons pu conclure à une cyclisation intramoléculaire entre la base pyrimidique et la fonction bromée (*Figure 57*).

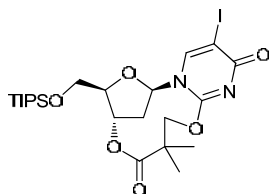
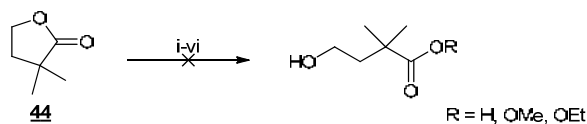


Figure 57 : Produit obtenu lors de la substitution nucléophile entre **43** et **13**

L'absence de réaction dans la plupart des autres conditions employées peut être expliquée par l'encombrement stérique important autour du groupe partant, qui empêche l'approche et donc la substitution par le nucléophile. Pour réduire le phénomène d'encombrement, il a donc été envisagé d'augmenter la distance entre le brome et les groupements méthyles par homologation de la chaîne carbonée.

➤ Prodrogue « ester diméthyle » **39** (n = 2)

La même stratégie que précédemment a été mise en oeuvre (**voie rouge**). L'acide 4-bromo-2,2-diméthylbutanoïque n'étant pas commercial, l' α, α -diméthyl- γ -butyrolactone **44** commerciale a été choisie comme réactif de départ de cette synthèse. Parmi les nombreuses méthodes de solvolysse d'une lactone, six ont été testées (*Schéma 32*) :



Réactifs et conditions : (i) NEt₃, MeOH, TA ; (ii) K₂CO₃, MeOH, TA ; H₂SO₄ (cat.), MeOH, ν ;
(iv) HCl (cat.), MeOH, ν ; (v) MeONa, MeOH, TA ; (vi) EtONa, EtOH, ν

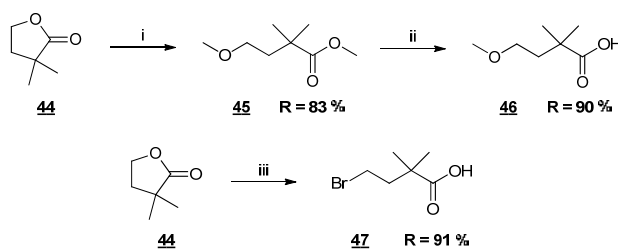
Schéma 32 : Essais d'ouverture de la butyrolactone **44**

Toutes les tentatives se sont soldées par un échec, vraisemblablement en raison de l'effet inductif des groupements méthyles qui stabilisent fortement la liaison lactone et ralentissent ainsi les attaques nucléophiles d'alcools et même d'alcooates. De plus, il est reconnu que les lactones α -substituées contenues dans un cycle à 5 ou 6 centres sont sujettes à la recyclisation spontanée après solvolysse ^[205]. Pour éviter ce phénomène, l'équilibre doit être déplacé en réalisant une ouverture fonctionnalisante. Deux conditions issues de la littérature ^{[206],[207]} ont ainsi été appliquées avec succès (*Schéma 33*) :

[205] Smith M. B. *et al. March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms and Structure 6th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey **2007**, 479, 1400, 1420

[206] King S. A., Orthoester-dependent alcoholysis of lactones. Facile preparation of 4-alkoxybutanoates and 5-alkoxypentanoates. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2253-2256

[207] Cortizo L. *et al.*, Synthesis and antidopaminergic activity of some 3-(aminomethyl)tetralones as analogs of butyrophenone. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2242-2247



Réactifs et conditions : (i) orthoformiate de méthyle, H₂SO₄ (cat.), MeOH, 50°C, 17 h
(ii) NaOH, H₂O, EtOH, Δ, 2 h 30 ; (iii) HBr 45 % dans AcOH, 80°C, 5 h

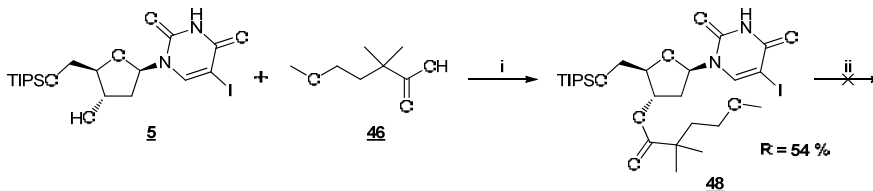
Schéma 33 : Ouvertures fonctionnalisantes de la butyrolactone **44**

L'acide **46** est ainsi obtenu en deux étapes : ouverture de cycle par action du triméthyl orthoformiate catalysée en milieu acide et saponification de l'ester **45**. Le bromoacide **47** est produit directement à partir de la butyrolactone **44** par traitement par l'acide bromhydrique en solution dans l'acide acétique. Dans les deux cas, le déplacement de l'équilibre est lié au blocage de la fonction alcool soit sous forme d'éther méthylique soit par conversion en dérivé bromé.

Eléments de détermination structurale :

- **45** RMN ¹H : apparition des singulets des méthyles de l'éther et de l'ester (3,26 et 3,65 ppm).
- **46** RMN ¹H : disparition du signal de l'ester méthylique.
- **47** RMN ¹³C : apparition du signal caractéristique de la fonction CH₂-Br (28,1 ppm).

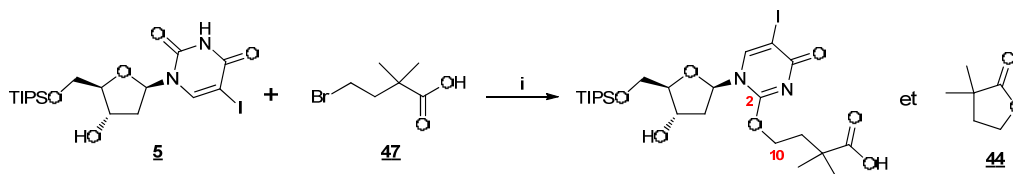
La suite de la synthèse a d'abord été envisagée à partir de l'acide **46** (**Schéma 34**) :



Réactifs et conditions : (i) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, TA, 17 h ; (ii) BBr₃, CH₂Cl₂, -78 °C

Schéma 34 : Synthèse avortée de la prodrogue « ester diméthyle » **39**

L'IUdR protégée **5** est estérifiée par l'acide **46** selon les conditions déjà plusieurs fois employées (réactifs de Steglich). Cette méthodologie permet d'accéder à l'ester **48** avec toutefois un rendement moyen. Cependant, la tentative de déprotection de l'éther méthylique en bout de chaîne par le tribromoborane conduit à la dégradation totale du produit de départ **48**. Face à cet échec, nous avons tenté de remplacer l'éther **46** par le bromoacide **47**, qui présente l'avantage d'être déjà fonctionnalisé pour l'alkylation à venir. Cependant, l'estérification par les réactifs de Steglich n'a pas permis d'obtenir le produit attendu : seuls les sous-produits majoritaires représentés **Schéma 35** ont été isolés.

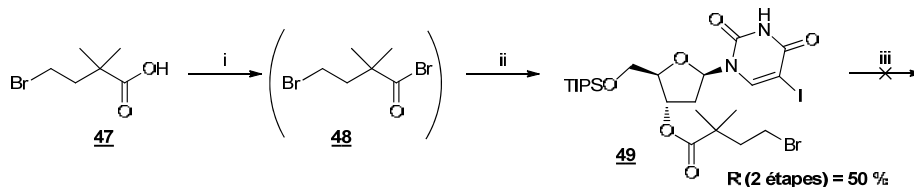


Réactifs et conditions : (i) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C->TA, 22 h

Schéma 35 : Sous-produits identifiés lors de l'estérification de l'IUdR protégée **5** par le bromoacide **47**

Parmi ces sous-produits, la lactone **44** est observée, indiquant une cyclisation spontanée du bromoacide **47** en milieu basique, qui corrobore les échecs répétés de l'ouverture de cette dernière en milieux alcalins. Une fois encore, une *O*-alkylation en position 2 de l'IUDR est mise en évidence par un couplage longue distance entre le carbone 2 et les protons 10 en RMN 2D (HMBC, corrélation proton-carbone longue distance).

L'activation de la fonction acide carboxylique de **47** par des réactifs de couplage n'étant pas suffisante, une conversion en bromure d'acide a été envisagée pour l'estérification directe de l'IUDR protégée **5** (Schéma 36) :



Réactifs et conditions : (i) bromure d'oxalyle, DMF (cat.), 0°C->TA, 16 h ; (ii) **5**, DIPEA, DMAP (cat.), CH₂Cl₂, 3 h ; (iii) **13**, DIPEA, MeCN, 50°C

Schéma 36 : Estérification de l'IUDR protégée **5**

Le bromure d'acide **48** est obtenu et directement mis en réaction (après évaporation de l'excès de bromure d'oxalyle) avec l'IUDR protégée **5** pour former le bromoester **49** avec un rendement correct de 50 %. Cependant, la substitution nucléophile par l'amine secondaire **13** dans les conditions précédemment développées pour ce type de réaction s'est soldée par un échec (aucune conversion ou dégradation des produits de départ dans les différents essais).

Éléments de détermination structurale :

- **49** RMN ¹H : apparition des signaux de l'espaceur (massif de 2,11 à 2,35 ppm et triplet à 3,35 ppm) et déblindage du doublet du proton en position 3' du déoxyribose (de 4,55 à 5,34 ppm).

Suite à ces échecs successifs, nos efforts se sont tournés vers la **voie noire** rétrosynthétique envisagée précédemment. Cette voie consiste à fonctionnaliser le vecteur puis le coupler à l'IUDR protégée **5** (Schéma 37) :

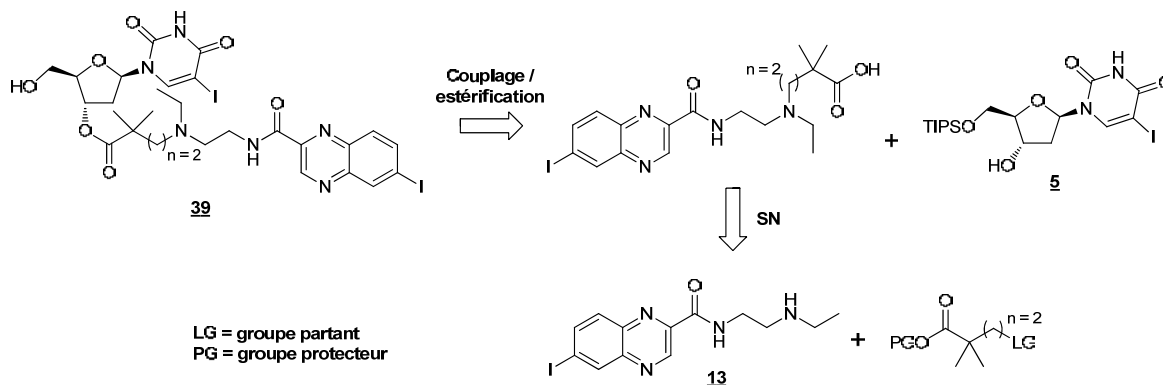


Schéma 37 : Rétrosynthèse de la prodrogue **39**, voie noire

Afin de minimiser les éventuelles réactions secondaires lors de la substitution nucléophile, la fonction acide carboxylique du bromoacide **47** est protégée sous forme d'ester méthylique. L'estérification doit être réalisée en absence de base ou d'agents de couplage, sous peine d'observer la re-cyclisation en lactone **44**.

Ainsi, des conditions ^[208] générant *in situ* un puissant alkylant, le diazométhane CH₂N₂, ont été appliquées (**Schéma 38**) :

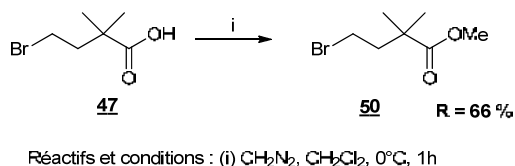


Schéma 38 : Estérification du bromoacide **47** par le diazométhane

Le diazométhane est obtenu par décomposition du *N*-nitroso-*N*-méthyl-*p*-toluènesulfonamide (Diazald™) par de la soude selon la méthode expérimentale décrite ci-dessous (**Figure 58**) :

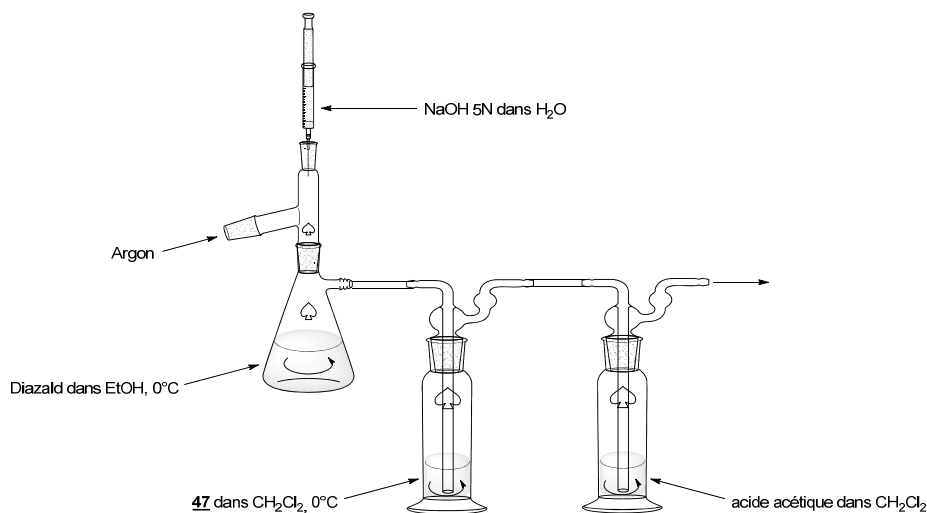


Figure 58 : Montage utilisé pour l'estérification du bromoacide **47** par le diazométhane

Au Diazald™ en solution dans l'éthanol est ajoutée goutte à goutte une solution de soude concentrée sous un courant d'argon. Le diazométhane gazeux ainsi libéré est transféré par bullage dans une solution de bromoacide **47** dans le dichlorométhane pour y réaliser l'estérification, tandis que l'excès d'alkylant n'ayant pas réagi est détruit par une solution d'acide acétique dans le dichlorométhane. Le bromoester **50** est ainsi obtenu avec un rendement de 66 %. La réaction de substitution nucléophile par l'amine secondaire **13** a alors été tentée, mais seul un produit est isolé, dont la structure envisagée après étude RMN est représentée ci-dessous (**Schéma 39**) :

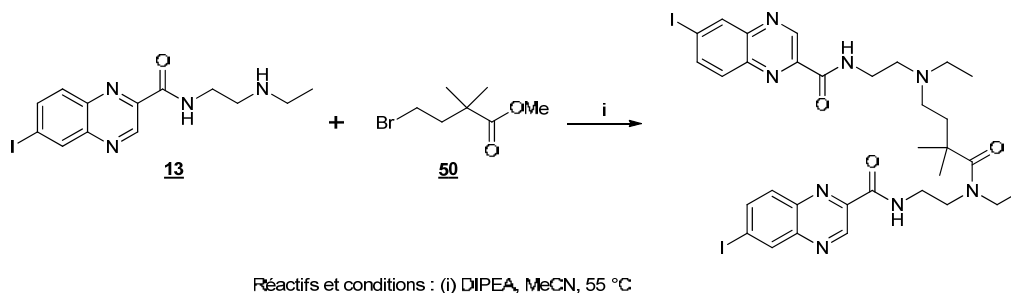


Schéma 39 : Substitution nucléophile du bromoester **50** par l'amine secondaire **13**

Aucun intermédiaire réactionnel (amide tertiaire bromé ou amine tertiaire attendue) n'a pu être observé dans les conditions chromatographiques utilisées. Cette réactivité très particulière de l'amine secondaire **13** s'ajoute aux difficultés rencontrées précédemment pour son alkylation.

Compte tenu de ces observations, la réaction de substitution a été tentée sur la chaîne éthyléthylène diamine du vecteur, destinée à être couplée par la suite à l'ester activé **12** (**Schéma 40**) :

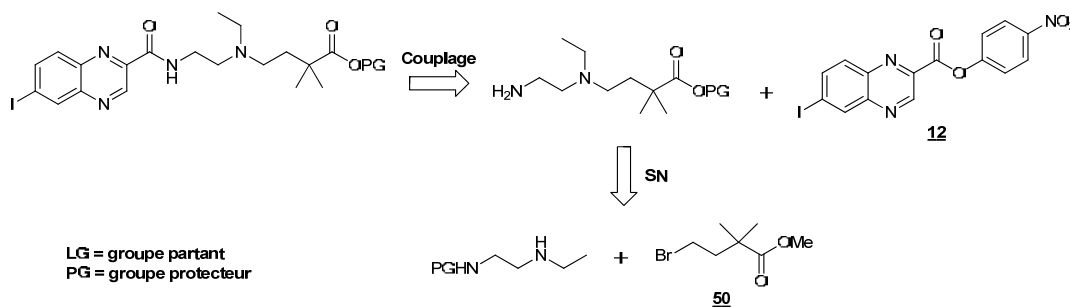


Schéma 40 : Modification apportée au **Schéma 30**

La chaîne diamine est obtenue en quatre étapes selon la synthèse de Gabriel décrite **Schéma 41** :

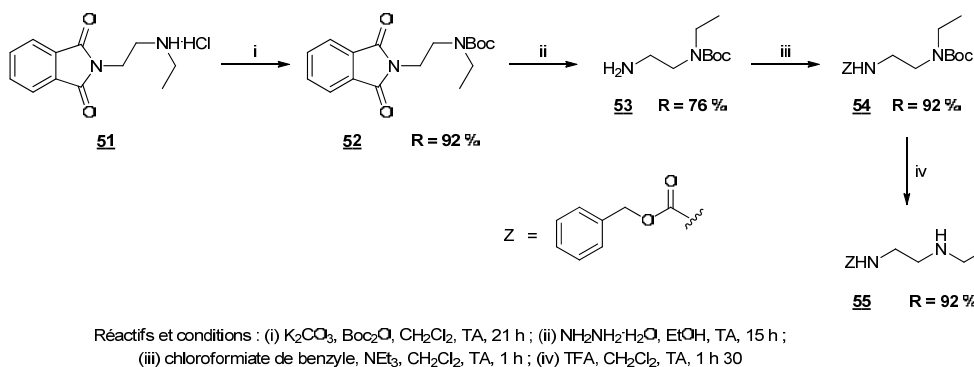


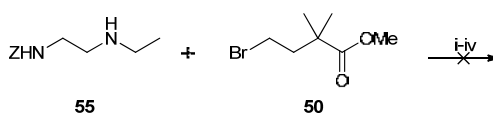
Schéma 41 : Obtention de la chaîne éthyléthylène diamine **55**

Le phtalimide **51**, disponible en grande quantité au laboratoire, est très efficacement protégé par un groupement Boc puis l'amine primaire **53** est libérée par action de l'hydrazine monohydratée. La fonction amine primaire est alors protégée en carbamate de benzyle **54**, clivable par hydrogénation catalytique, puis l'amine secondaire est déprotégée en milieu acide pour générer la diamine **55**.

Eléments de détermination structurale :

- **52** RMN 1H : apparition du singulet du groupement Boc (1,29 ppm).
- **53** RMN 1H : disparition des signaux aromatiques du phtalimide.
- **54** RMN 1H : apparition des signaux du benzyle (singulet à 5,09 ppm, multiplet de 7,32 à 7,38 ppm).
- **55** RMN 1H : disparition du singulet des méthyles du groupement Boc (1,44 ppm).

Différents essais d'alkylation du dérivé bromé **50** par **55** ont ensuite été mis en œuvre (**Schéma 42**) :



Réactifs et conditions : (i) DIPEA, MeCN, TA ; (ii) DIPEA, MeCN, 50 °C ;
(iii) DIPEA, MeOH, 50 °C ; (iv) DIPEA, MeOH, Δ

Schéma 42 : tentatives d'alkylation de la diamine **55**

Malheureusement, aucune des conditions testées n'a conduit à la formation de l'amine tertiaire attendue. Les seules conditions ayant donné lieu à une conversion importante (conditions (ii)) ont mené à la formation de l'amide suivant (**Figure 59**) :

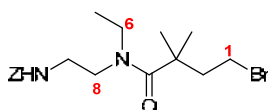


Figure 59 : Produit formé lors de la réaction entre le bromoester **50** et l'amine secondaire **55**

La détermination structurale par RMN ^1H (déblindage des signaux relatifs aux protons 6 et 8 par rapport aux signaux correspondants de l'amine secondaire **55**) et ^{13}C (déplacement du signal du carbone 1 identique à celui du bromoester **50**) a permis cette identification : le brome est toujours présent, et un amide a été formé.

Devant ces échecs répétés et malgré les efforts consentis ainsi que les nombreuses voies explorées, la synthèse de la prodrogue « ester diméthyle » **39** a dû être abandonnée.

1.2. Prodrogue « cétal » **40**

1.2.1. Rétrosynthèse

La synthèse de la prodrogue « cétal » **40** est envisagée selon la même méthode que celle employée pour la prodrogue « acétal » **2** (**voie rouge**) (**Schéma 43**) :

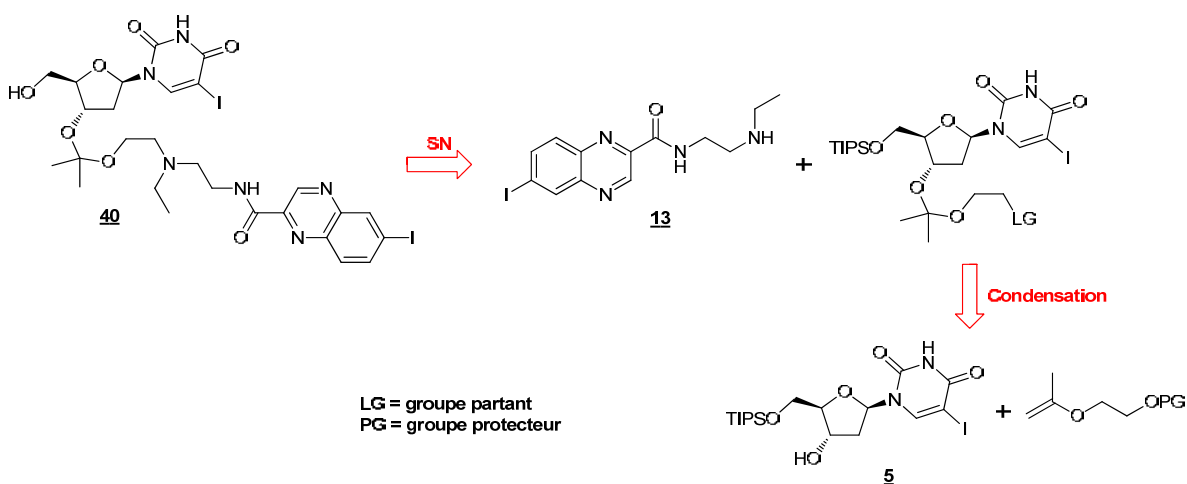
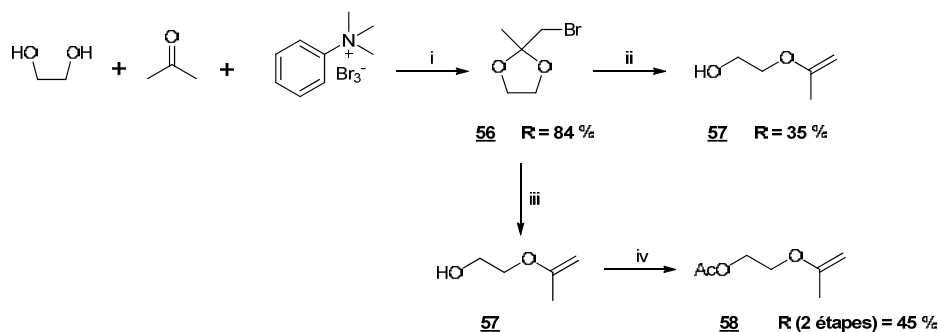


Schéma 43 : Rétrosynthèse de la prodrogue « cétal » **40**

Cette synthèse utilise à nouveau comme précurseurs l'IUDR protégée **5** et l'amine secondaire **13**. Elle se distingue de la synthèse de la prodrogue « acétal » **2** par la nature de l'éther de vinyle dérivé de l'éthylène glycol, qui possède ici un groupement méthyle en α de l'oxygène vinylique.

1.2.2. Synthèse du précurseur vinylique

L'éther de vinyle méthylé (protégé ou non) précédemment évoqué n'est pas commercialement disponible, donc une voie d'accès originale de ce dernier a été développée. Dans la littérature, ce type de composés [209-212] est généralement obtenu à partir de dioxolanes bromés subissant une ouverture de cycle *via* la formation d'intermédiaires organométalliques. L'application de l'une de ces méthodes permet d'isoler les éthers de vinyle **57** et **58** désirés (*Schéma 44*) :



Réactifs et conditions : (i) THF, TA, 22 h ; (ii) (a) Mg, THF, Δ, 1 h, (b) NH₄Cl, NH₃(aq.), glace ; (iii) (a) Mg, THF, Δ, 1 h, (b) NH₄Cl, NH₃(aq.), glace ; (iv) Ac₂O, pyridine, DMAP (cat.), TA, 3 h

Schéma 44 : Synthèse des précurseurs vinyliques **57** et **58**

Le dioxolane bromé **56** est obtenu dans les conditions « one-pot » décrites par la littérature [213] et isolé par distillation sous pression réduite avec un bon rendement. L'éther de vinyle **57** est obtenu par la formation de l'organomagnésien à partir du dioxolane bromé **56** suivie d'une hydrolyse ammoniacale. Cependant, le rendement de 35 % obtenu lors d'un premier essai sur une faible quantité n'a pu être transposé à plus grande échelle. Cette chute de rendement est en grande partie due à la formation concomitante de 2,2-diméthyl-dioxolane (*Schéma 45*). La formation de ce dernier peut résulter soit (i) de l'hydrolyse de l'organomagnésien (réaction acido-basique), soit (ii) de la cyclisation intramoléculaire de **57** lors de la purification (*i.e.* sur colonne de silice ou lors de la distillation) :

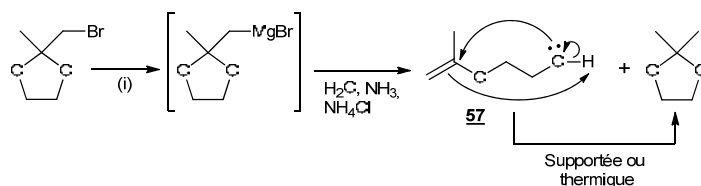


Schéma 45 : Réactions secondaires conduisant au 2,2-diméthyl-dioxolane

En tenant compte de ces hypothèses, une tentative pour piéger l'alcool **57** sous forme d'acétate avant toute purification a été réalisée. L'éther de vinyle **57** brut est mis en réaction avec l'anhydride acétique pour générer l'acétate **58**. Cependant, différents obstacles diminuent drastiquement le rendement de cette réaction, soit lors de sa purification sur colonne de silice qui conduit au clivage du groupement éther de vinyle, soit lors des phases

[209] Piantadosi C. *et al.*, Plasmalogens. I. The synthesis of 1-alkenyl ethers of glycerol 1,2. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2425-2428

[210] Craig J. C. *et al.*, Studies directed toward the synthesis of plasmalogens. I. Alkenylglycerols 1. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 907-910

[211] Westera G. *et al.*, The reaction of Grignard reagents with 1,3-dioxolanes : III. A novel synthetic route to β-hydroxyalkyl enol ethers. *J. Organomet. Chem.* **1978**, *144*, 291-301

[212] Feugas C., Organométalliques alkoxylés : Action du magnésium sur les cétales cycliques de cétones halogénées saturées. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1963**, *421*, 2568-2579

[213] Visweswariah S. *et al.*, One-pot α-bromoacetalization of carbonyl compounds. *Synthesis* **1982**, *1982*, 309,310

d'évaporation des solvants du fait du faible point d'ébullition de l'acétate **58**. Une méthode de séparation par distillation a alors été appliquée. Malheureusement, elle conduit à une décomposition du milieu. Les faibles rendements obtenus ne permettaient pas de produire les grandes quantités d'acétate **58** nécessaires pour la synthèse de la prodroge « cétal » **40** qui comporte de nombreuses étapes, dont une généralement limitante (*i.e.* la substitution nucléophile par l'amine secondaire **13**).

Devant le manque de reproductibilité, les faibles rendements associés à cette voie de synthèse et le manque de fiabilité des méthodes de formation d'éthers de vinyle plus récentes ^{[214],[215]}, nous avons décidé de reprendre la méthodologie précédente dans le but d'augmenter sa robustesse et sa reproductibilité.

1.2.3. Méthodologie

Les conditions réactionnelles permettant d'accéder à l'éther de vinyle **57** ont été analysées point par point. Le problème ne semblait pas venir de la formation de l'organomagnésien : en effet lors de cette étape, une coloration caractéristique (rouge bordeaux profond) du milieu réactionnel et la disparition du magnésium ont été observés, comme décrit dans la littérature ^[212]. Cette étape ne semblant pas être le facteur critique, seul restait le traitement ammoniacal. Différents essais de solvolyses à partir du même milieu réactionnel ont alors été effectués dans des tubes à hémolyse et analysés par CLHP analytique (RP₁₈, MeOH / H₂O 0,2 % NH₄OH, 35/65 v/v, t_R (**57**) = 8,0 min) pour quantifier l'éther de vinyle **57** formé. La linéarité de la réponse UV est vérifiée au préalable par étalonnage pour les trois composés. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 14** suivant :

Conditions de solvolyses				
Entrée	Etat physique de l'eau	Réactif	Milieu réactionnel	Quantité relative de 57
1	13,2 g de glace	4 éq. NH ₄ Cl + 5 éq. NH ₃ (aq)	6 mL	1
2	2,2 g de glace	4 éq. NH ₄ Cl + 5 éq. NH ₃ (aq)	1 mL	2,01
3	2 mL d'eau	4 éq. NH ₄ Cl + 5 éq. NH ₃ (aq)	1 mL	3,54
4	2 mL d'eau	2 éq. HCl	1 mL	0
5	2 mL d'eau		1 mL	0

Tableau 14 : Essais de solvolyses de l'organomagnésien

La non-reproductibilité observée avec des quantités plus importantes (entrée 1 vs. 2) est cohérente avec les observations précédentes et peut être reliée à la présence de glace, à l'origine d'une hétérogénéité critique du milieu de solvolyses. Quand de l'eau froide est utilisée à sa place (entrée 3 vs. 2), la conversion relative est bien meilleure. Une solvolyses basique semble également être nécessaire à l'ouverture de cycle : les milieux acide et neutre (entrée 4 et 5 respectivement) conduisent en effet à la formation du 2,2-diméthylidioxolane *via* hydrolyse de l'organomagnésien.

Afin de mieux comprendre le rôle tenu par la base pour l'ouverture du cycle, une autre série d'expériences est réalisée. Diverses bases (selon Lewis et/ou Brønsted) sont testées alors que les meilleures conditions obtenues précédemment (entrée 3) sont utilisées en tant que référence (**Tableau 15**) :

[214] Gassman P. G. *et al.*, General method for the synthesis of enol ethers (vinyl ethers) from acetals. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5574-5576

[215] Park H. S. *et al.*, Facile synthesis of enol ethers by cleavage of α -bromoacetals and α -bromoketals mediated by SmI₂. *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 3729-3732

Conditions de solvolyse		
Entrée	Réactif	Quantité relative de 57
3	4 eq. NH ₄ Cl + 5 éq. NH ₃ (aq)	1
6	NEt ₃ *	1,16
7	K ₂ CO ₃ *	0
8	Diéthyl triamine*	1,07
9	Aniline*	0,75
10	Pyridine*	1,09
11	DIPEA*	1,15
12	<i>t</i> -BuOH*	1,06

* : 3 équivalents

Tableau 15 : Comparaison des bases utilisées

La triéthylamine (entrée 6) démontre la meilleure capacité d'ouverture de cycle. Des résultats similaires sont obtenus avec les autres amines aliphatiques telles que la diéthyltriamine (entrée 8) et la DIPEA (entrée 11), ou encore avec la pyridine (entrée 10) et le *tert*-butanol (entrée 12). L'utilisation d'aniline (entrée 9) conduit à la formation plus limitée de l'éther de vinyle **57**, alors que la base minérale (carbonate de potassium, entrée 7) conduit à l'hydrolyse du réactif de Grignard.

Les données obtenues semblent indiquer que la basicité de Lewis des bases utilisées est la force motrice du processus d'ouverture de cycle du dioxolane. En effet, les amines aliphatiques et la pyridine donnent de meilleurs résultats que l'aniline, dont la paire d'électrons non-liants de l'atome d'azote est moins disponible. De manière inattendue, le *tert*-butanol permet d'obtenir l'éther de vinyle avec un rendement comparable à ceux obtenus avec les bases azotées. Bien que le *tert*-butanol soit un acide de Brønsted faible ($pK_a = 19$) et devrait conduire à l'hydrolyse du réactif de Grignard, c'est également une base de Lewis pouvant agir comme meilleur ligand du magnésium (II) que les bases azotées (oxophilicité du magnésium). Dans ce cas, il semble que l'eau (acide de Brønsted plus fort, $pK_a = 14$) est responsable de l'hydrolyse du réactif de Grignard tandis que le *tert*-butanol est ligand du magnésium.

Ainsi, deux phénomènes de cinétiques comparables semblent être en compétition dans l'eau : la destruction de l'organomagnésien et l'ouverture de cycle. Les données rassemblées permettent d'avancer que les forces motrices conduisant préférentiellement vers l'un ou l'autre sont l'acidité selon Brønsted et la basicité selon Lewis (ou la nucléophilie), tel que schématisé ci-dessous (**Schéma 46**) :

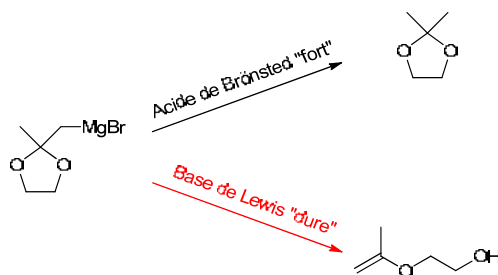


Schéma 46 : Mécanismes en compétition lors de la solvolyse

Ces données permettent de proposer le mécanisme réactionnel d'ouverture de cycle présenté ci-dessous (**Schéma 47**) :

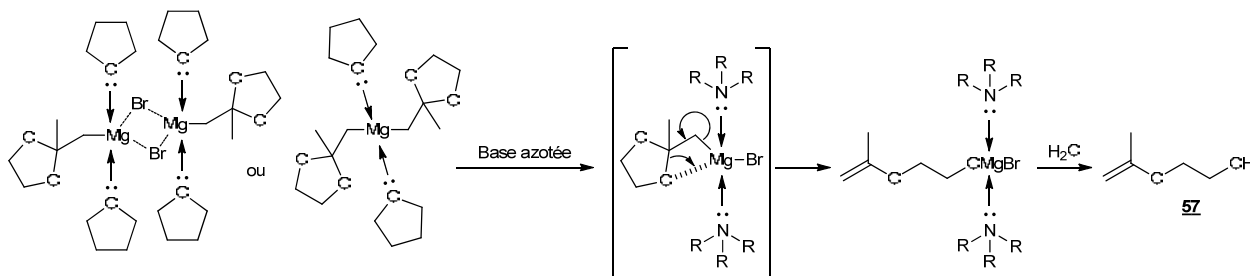


Schéma 47 : Mécanisme proposé pour l'ouverture du dioxolane en présence d'une base azotée

Bien que la structure et l'organisation des réactifs de Grignard en solution est toujours sujet à controverses, de nombreuses études ont démontré l'existence d'un équilibre appelé « *équilibre de Schlenk* »^[216], entre les espèces monomères RMgX et dimères $\text{R}_2\text{Mg}:\text{MgX}_2$. La position de l'équilibre dépend de la nature de R et X, du solvant, de la concentration et de la température^[217,218]. Le facteur principal est le solvant : la constante d'équilibre de ce réarrangement est la plus faible dans la triéthylamine (dans laquelle l'espèce prédominante est RMgX), plus haute dans l'éther diéthylique et encore plus élevée dans le THF. De moindre manière, de fortes concentrations ($> 1 \text{ M}$) favorisent la forme dimérique. Dans notre cas (hautes concentrations, solution dans le THF), la forme dimérique est vraisemblablement prédominante avant l'addition de triéthylamine, qui cause probablement la dissociation en monomère RMgX . Certains cas particuliers ont permis de démontrer que ces espèces monomériques étaient plus réactives que les dimères (décrits comme un complexe formé entre deux réactifs de Grignard).

Ces investigations ont permis de définir des conditions d'hydrolyse reproductibles pour l'obtention de l'éther de vinyle **57**. Cependant, le mécanisme réactionnel de l'ouverture décrit ci-dessus est en compétition avec l'hydrolyse directe de l'organomagnésien cyclique évoquée **Schéma 46 p125**, limitant ainsi les rendements d'ouverture de cycle. La possibilité de provoquer cette cyclisation directement dans le milieu réactionnel anhydre a donc été évaluée : la triéthylamine est ajoutée après formation du magnésien et le mélange est agité pendant 1 h puis simplement versé dans l'eau. Les résultats obtenus ont été comparés à la solvolysse de l'organomagnésien par la triéthylamine dans l'eau et sont résumés dans le **Tableau 16** suivant :

Entrée	Nombre d'équivalents de NEt_3 ajoutés au milieu réactionnel	Conditions d'ouverture	Quantité relative de 57
13	0	3 éq. $\text{NEt}_3 / \text{H}_2\text{O}$	1
14	1	H_2O	1,49
15	3	H_2O	1,53
16	5	H_2O	1,45

Tableau 16 : Essais d'ouverture du cycle en milieu anhydre

[216] Smith M. B. *et al.* *March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms and Structure 6th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey **2007**, 260-261

[217] Salinger R. M. *et al.*, Infrared spectral studies of Grignard solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1782-1786

[218] Ashby E. C. *et al.*, Composition of grignard compounds. VII. Composition of methyl- and *tert*-butylmagnesium halides and their dialkylmagnesium analogs in diethyl ether and tetrahydrofuran as inferred from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1206-1213

La tendance observée est conforme aux prévisions : l'ouverture en milieu anhydre provoquée par l'addition de triéthylamine suivie d'une hydrolyse permet d'augmenter d'un facteur 1,5 la quantité relative de **57** obtenue. Un plateau semble être atteint pour trois équivalents de base. Au-delà (6 équivalents), la formation de produits secondaires non identifiés a été constatée, expliquant le rendement relatif plus faible.

L'addition de triéthylamine au milieu anhydre permet donc bien une augmentation du rendement brut. Cependant, nous avons vu que la purification du produit formé conduisait à la re-cyclisation spontanée en 2,2-diméthyl-dioxolane. Ce problème devait être résolu afin d'augmenter le rendement après purification. Il a alors été envisagé de procéder à une étape de protection de la fonction alcool directement après l'ouverture du cycle, afin de générer un composé moins volatil et de purification plus aisée. Ainsi, une réaction « one-pot » en trois étapes (formation du magnésien, ouverture de cycle puis protection) a été testée (**Schéma 48**). Elle a été déclinée avec deux types de groupements protecteurs (ester benzoïque et un organosilane : le *tert*-butyldiphénylsilyle TBDPS) afin de vérifier la compatibilité de la méthode avec différentes protections :



Réactifs et conditions : (i) (a) Mg, THF, Δ , 1 h, (b) NEt₃, Δ , 1 h, (c) BzCl, THF, 0°C->TA, 16 h
 (ii) (a) Mg, THF, Δ , 1 h, (b) NEt₃, Δ , 1 h, (c) TBDPSCI, imidazole, THF, TA, 16 h

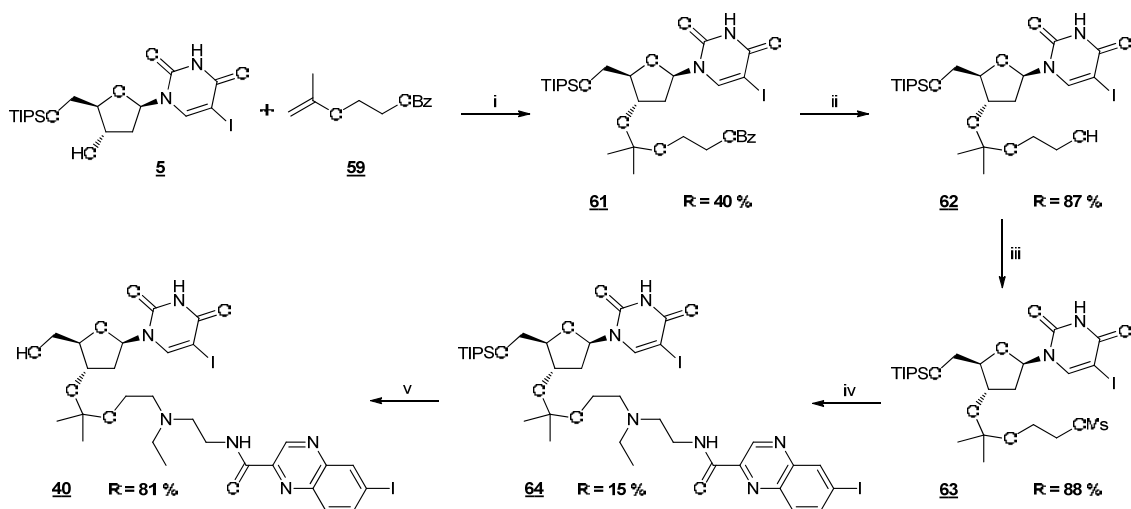
Schéma 48 : Obtention des éthers de vinyle **59** et **60** par réaction « one-pot »

Les éthers de vinyle **59** et **60** sont générés avec des rendements très corrects (55 et 66 %) pour une réaction « one-pot » impliquant trois étapes distinctes. La réaction de silylation implique l'ajout d'imidazole (en quantité stœchiométrique) en plus de la triéthylamine. La pertinence de l'utilisation de cette base pour l'ouverture du cycle devra être vérifiée pour remplacer la triéthylamine et ainsi simplifier le mode opératoire.

Cette méthode a été étendue pour l'ouverture de six autres dioxolanes bromés (dérivés de benzophénone, pinacolone, 3-pentanone, cyclopentanone, cyclohexanone et cycloheptanone). L'ensemble de ce travail de méthodologie a fait l'objet d'une publication dans la revue « Tetrahedron Letters ».

1.2.4. Synthèse de la prodrogue « cétal » **40**

Le précurseur éther de vinyle **59** ayant été obtenu en larges quantités, la synthèse permettant d'accéder à la prodrogue « cétal » **40** a été poursuivie suivant le **Schéma 49** ci-dessous :



Réactifs et conditions : (i) ACS (cat.), THF, TA, 4 h ; (ii) LiOH, EtOH, TA, 4 h ; (iii) MsCl, DIPEA, DMAP (cat.), CH₂Cl₂, 20 h ; (iv) **13**, DIPEA, MeCN, 50°C, 96 h ; (v) TBAF, THF, TA, 4 h

Schéma 49 : Synthèse de la prodrogue « cétal » **40**

La condensation de l'éther de vinyle **59** sur l'IUDR protégée **5** conduit au benzoate **61** avec un rendement moyen qui peut être expliqué par l'hydrolyse partielle de ce dernier sur colonne de silice, légèrement acide. Ce désagrément a néanmoins l'avantage de prouver précocement la plus grande sensibilité de la prodrogue « cétal » **40** en présence d'acide comparativement à la prodrogue « acétal » **2**. La transestérification du benzoate **61** conduit à l'alcool **62**. Les essais de transformation en tosylate ayant conduit à de faibles rendements, ce dernier est converti en mésylate **63** qui est ensuite substitué par l'amine secondaire **13**. Les conditions utilisées lors de la synthèse de la prodrogue « acétal » **2** (acétonitrile, sans base, 55 °C) ne sont ici pas applicables sous peine de cliver la fonction cétal par l'acide libéré lors de la substitution. Un milieu basique est nécessaire pour prévenir cette hydrolyse, une base (la DIPEA) a donc été ajoutée au milieu réactionnel. Le conjugué **64** est ainsi obtenu avec un rendement cependant très faible. La déprotection finale dans les conditions habituelles (TBAF, THF) conduit à la prodrogue « cétal » **40** avec un très bon rendement.

Eléments de détermination structurale :

- **61** RMN ¹H : apparition du singulet des méthyles du cétal (1,37 ppm) et des signaux relatifs à l'espaceur (massifs de 3,73 à 3,86 ppm et de 4,40 à 4,53 ppm, massifs de 7,35 à 7,52 ppm et de 7,97 à 8,01 ppm).
- **62** RMN ¹H : disparition des signaux du benzoate (massifs en zone aromatique).
- **63** RMN ¹H : apparition du méthyle du mésylate (singulet à 3,02 ppm) et déblindage du signal du méthylène en α de ce groupement (de 3,72 à 4,32 ppm).
- **64** RMN ¹H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition du singulet du mésylate.
- **40** RMN ¹H : disparition des signaux du groupement TIPS.
- **40** spectrométrie de masse : [M+H]⁺_{th} = 809,07 / [M+H]⁺_{mes} = 809,11.

1.3. Prodrogues « acétal pegylé » **41** et **42**

Comme nous l'avons évoqué (chapitre 2 - paragraphe III.), les recherches autour de la prodrogue « acétal » **2** ont été poursuivies en tentant cette fois de moduler sa stabilité métabolique par l'introduction d'une chaîne oligoéthylène glycol (OEG) entre la fonction acétal et l'amine tertiaire du vecteur.

1.3.1. Rétrosynthèse

La voie de synthèse envisagée s'inspire de celle développée pour accéder aux prodrogues « acétal » **2** et « cétal » **40**, elle est représentée par le **Schéma 50** suivant :

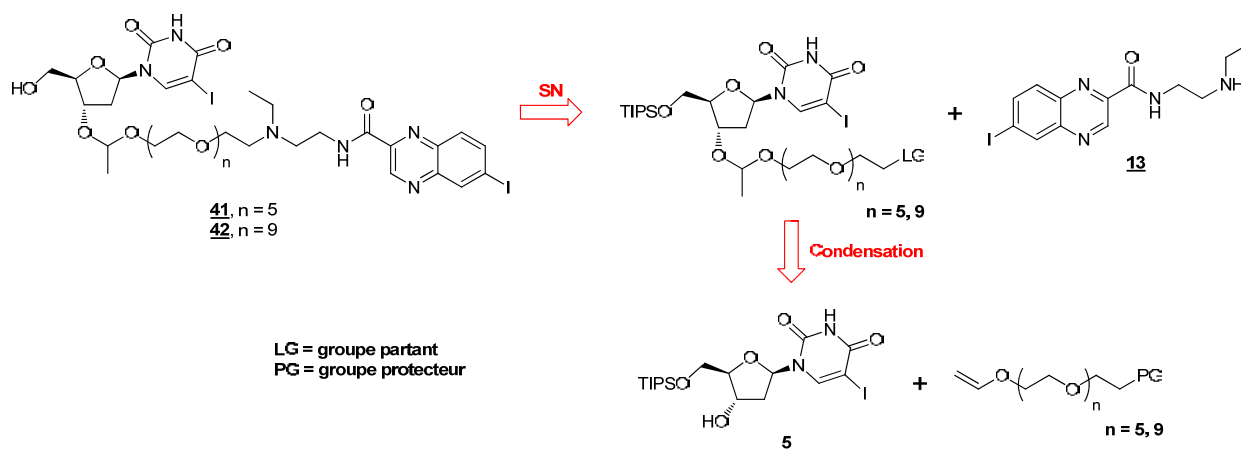


Schéma 50 : Rétrosynthèse des prodrogues « acétals pegylés » **41** et **42**

La fonction clivable en milieu acide sera générée par la condensation d'un éther de vinyle avec l'alcool secondaire en position 3' de l'IUDR protégée **5**. La fonctionnalisation par un groupe partant en bout de chaîne de l'espaceur permettra ensuite d'introduire le vecteur par alkylation de l'amine secondaire **13**.

Les OEG commerciaux comportant un éther de vinyle sont des dérivés de l'éthylène glycol (utilisé pour la synthèse de la prodrogue « acétal » **2**) et du diéthylène glycol (**Figure 60**) :

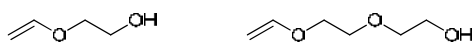


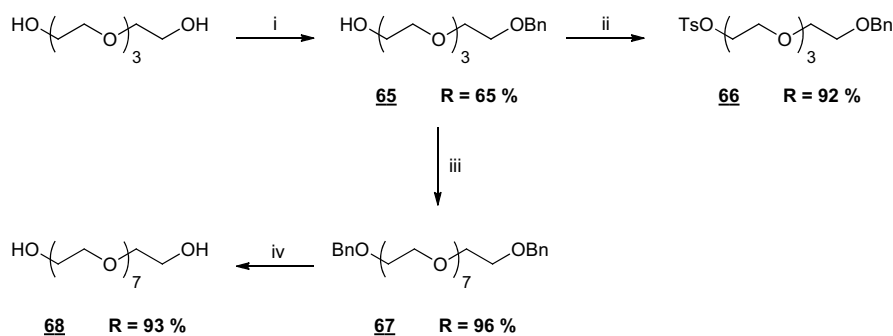
Figure 60 : Dérivés OEG - éther de vinyle commerciaux

Pour accéder aux OEG de 6 à 10 unités, il est possible de procéder à un allongement de chaîne de l'éther de vinyle du diéthylène glycol, par un tétraéthylène glycol (PEG₄) et un octaéthylène glycol (PEG₈). Ces deux OEG commerciaux présentent cependant une différence de prix (1 : 2000) et de pureté oligomérique (99 contre 95 %) importantes constatées chez les fournisseurs habituels. Pour ces raisons, une méthodologie permettant d'accéder au PEG₈ par dimérisation du PEG₄ a été développée.

I.3.2. Synthèse des OEG - éther de vinyle

➤ Synthèse du précurseur PEG₈

Le PEG₈ peut être synthétisé par dimérisation du PEG₄ (**Schéma 51**) selon une méthode adaptée de la littérature ^[219] permettant d'obtenir une pureté oligomérique finale proche de 99 %.



Réactifs et conditions : (i) Ag₂O, BnBr, CH₂Cl₂, TA, 18 h ; (ii) (a) K₂CO₃, TsCl, 10 min, (b) KOH, 3 min ; (iii) (a) NaH, THF, TA, 1 h ; (b) **66**, **65**, 18 h ; (iv) H₂ 1 atm, Pd/C 10%, EtOH, TA, 1 h 30

Schéma 51 : Synthèse du PEG₈ **68**

La première étape consiste à monoprotéger le PEG₄ par un groupement benzyle. Une partie du monobenzyle **65** obtenu est fonctionnalisé sous forme de tosylate **66** avec un excellent rendement dans des conditions originales, décrites par Kazemi *et al.* ^[220] : la réaction a lieu à sec, dans un mortier, sur support solide (K₂CO₃).

Le dimère dibenzylé **67** est obtenu par traitement du tosylate **66** par le dérivé monobenzylé **65** après déprotonation de ce dernier par l'hydrure de sodium dans le THF anhydre (96 %). Finalement, la débenzylation par hydrogénation catalytique du dimère **67** conduit au PEG₈ **68**.

Eléments de détermination structurale :

- **65** RMN ¹H : apparition des signaux du benzyle (singulet à 4,57 ppm, multiplet de 7,26 à 7,36 ppm), présence d'un signal de proton échangeable (large triplet à 2,48 ppm) attribuable à la fonction alcool.
- **66** RMN ¹H : apparition des signaux du tosylate (singulet à 2,44 ppm et doublets à 7,30 et 7,79 ppm).
- **67** RMN ¹H : disparition des signaux du tosylate de **66** et de la fonction alcool de **65**.
- **68** RMN ¹H : disparition des signaux des benzyles.

Pour l'ensemble des étapes permettant d'accéder au PEG₈, les purifications ont été facilitées par le faible nombre de produits secondaires formés, permettant le « scale-up » à des quantités de l'ordre de plusieurs dizaines de grammes. Même si la première étape de monobenzylation est limitante, le réactif PEG₄ est bon marché. L'unique réactif relativement onéreux est l'oxyde d'argent. Son remplacement par un réactif catalytique (l'acétylacétonate de cuivre Cu(acac)₂ ou le NaH) devrait permettre de réduire encore le coût de production du PEG₈ au laboratoire.

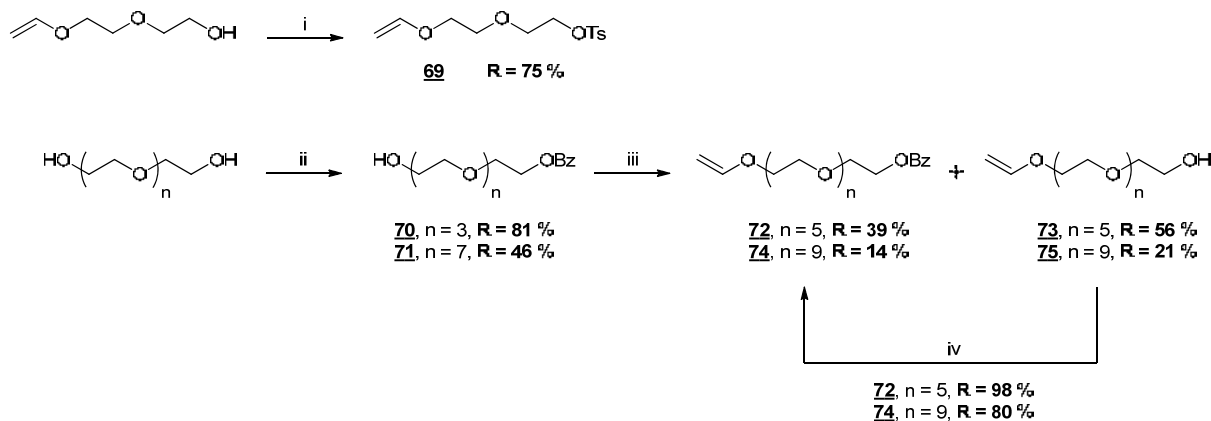
De plus, cette méthode mise au point peut également être appliquée et étendue à l'obtention d'OEG de longueurs variables (*e.g.* 12, 16, 20,...).

[219] Keegstra E. M. D. *et al.*, A highly selective synthesis of monodisperse oligo(ethylene glycols). *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6678-6680

[220] Kazemi F. *et al.*, Chemoselective and scalable preparation of alkyl tosylates under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5083-5087

➤ Synthèse des OEG - éther de vinyle

Le PEG₄ et le PEG₈ doivent être fonctionnalisés par un éther de vinyle et un groupement protecteur avant de subir la réaction de condensation avec l'IUdR protégée **5**. Ce groupement ne peut être un benzyle, car les conditions d'hydrogénation conduiraient à la déiodation de l'IUdR. Un ester benzoïque a donc été choisi. Le **Schéma 52** ci-après décrit leurs voies de synthèse :



Réactifs et conditions : (i) (a) K₂CO₃, TsCl, 5 min ; (b) KOH, 2 min ; (ii) BzCl, DMAP (cat.), DIPEA, CH₂Cl₂, TA, 16 h
(iii) (a) NaH, THF, TA, 1 h ; (b) **69**, 20 h ; (iv) BzCl, DMAP (cat.), NEt₃, CH₂Cl₂, TA, 15 h

Schéma 52 : Obtention des OEG - éther de vinyle

La voie de synthèse est identique pour les deux longueurs de chaîne. Le vinyltosylate **69** préparé dans les conditions décrites précédemment pour le tosylate **66** est mis en réaction avec alcoolates correspondants **70** et **71**. Dans les mêmes conditions réactionnelles (milieu très dilué, addition lente de chlorure de benzoyle), une dibenzoylation plus importante (à hauteur de 30 %) du PEG₈ par rapport au PEG₄ est observée et explique le rendement obtenu plus faible. La substitution nucléophile du tosylate **69** par les monobenzoates **70** et **71** conduit comme on pouvait le craindre à une hydrolyse partielle des groupements benzoates. Cependant, les vinylalcools **73** et **75** peuvent aisément être reconvertis en vinylbenzoates **72** et **74** avec de très bons rendements. Ainsi, le vinylbenzoate **72** a ainsi été isolé avec un rendement combiné de près de 95 %. Les plus faibles rendements obtenus pour l'ensemble des étapes permettant d'accéder au vinylbenzoate **74** peuvent s'expliquer par les difficultés rencontrées lors de la purification chromatographique des OEG de masses moléculaires élevées.

Eléments de détermination structurale :

- **69** RMN ¹H : apparition des signaux du tosylate (singulet à 2,44 ppm et doublets à 7,34 et 7,80 ppm).
- **70** et **71** RMN ¹H : apparition des signaux du benzoate (3 massifs en zone aromatique).
- **72** et **74** RMN ¹H : apparition des signaux du vinyle (3 doublets dédoublés à 4,00, 4,17 et 6,49 ppm).
- **73** et **75** RMN ¹H : disparition des signaux du benzoate comparativement à **72** et **74**.

1.3.3. Synthèse des prodrogues « acétal pegylé » **41** et **42**

Disposant des précurseurs éthers de vinyle, la synthèse des prodrogues « acétals pegylés » **41** et **42** est poursuivie selon la même voie que celle mise au point pour la prodrogue « cétal » **40** (Schéma 53) :

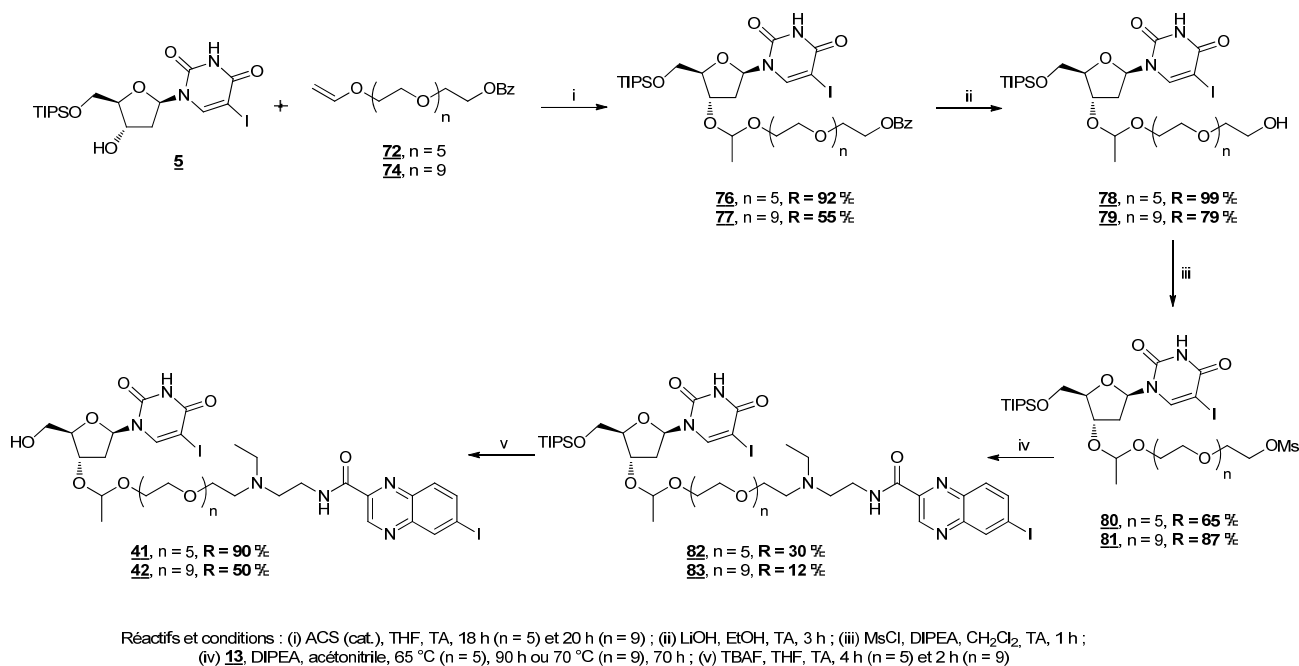


Schéma 53 : Synthèse des prodrogues « acétal pegylé » **41** et **42**

La première étape permet de former la fonction acétal par condensation de l'IUDR protégée **5** sur les vinylbenzoates **72** et **74** en présence catalytique d'acide camphorsulfonique. L'acétal **76** est ainsi obtenu avec un rendement similaire à l'acétate **19**. Pour l'acétal **77**, une diminution importante de rendement est observée en raison d'une dégradation partielle du groupement éther de vinyle du composé **74**. Les groupements benzoates de **76** et **77** sont ensuite déprotégés par l'hydroxyde de lithium avec d'excellents rendements. Les alcools **78** et **79** ainsi obtenus sont ensuite convertis en mésylates **80** et **81**.

Eléments de détermination structurale :

- **76** et **77** RMN ¹H : apparition des signaux de l'acétal (doublet à 1,32 ppm et quadruplet à 4,82 ppm), de l'espaceur pegylé (massif de 3,53 à 3,79 ppm) et du benzoate (3 massifs en zone aromatique).
- **78** et **79** RMN ¹H : disparition des signaux du benzoate.
- **80** et **81** RMN ¹H : apparition du singulet du méthyle du mésylate (3,08 ou 3,11 ppm).

Les mésylates **80** et **81** sont engagés dans une substitution nucléophile par l'amine secondaire **13**. Dans un premier essai selon les mêmes conditions réactionnelles que celles utilisées précédemment, aucune conversion n'a été observée. Afin de comprendre cette absence de réactivité, une étude de modélisation moléculaire a été entreprise. Elle n'a pu être réalisée pour les mésylates **80** et **81** pour des raisons informatiques et logicielles. Cependant, des molécules similaires (**ICF15002** et **ICF15038** constituées par le vecteur ICF01012 et une chaîne pegylée fluorée sur l'amine tertiaire) ont été simulées avec le logiciel Sybyl-X 1.2 (champ MMFF94, en phase gaz (ramenées à 300K), avec constante diélectrique de l'eau : 78,5), montrant que dans sa configuration la plus stable, la chaîne pegylée d'**ICF15038** tend à s'enrouler sur elle-même (Figure 61).

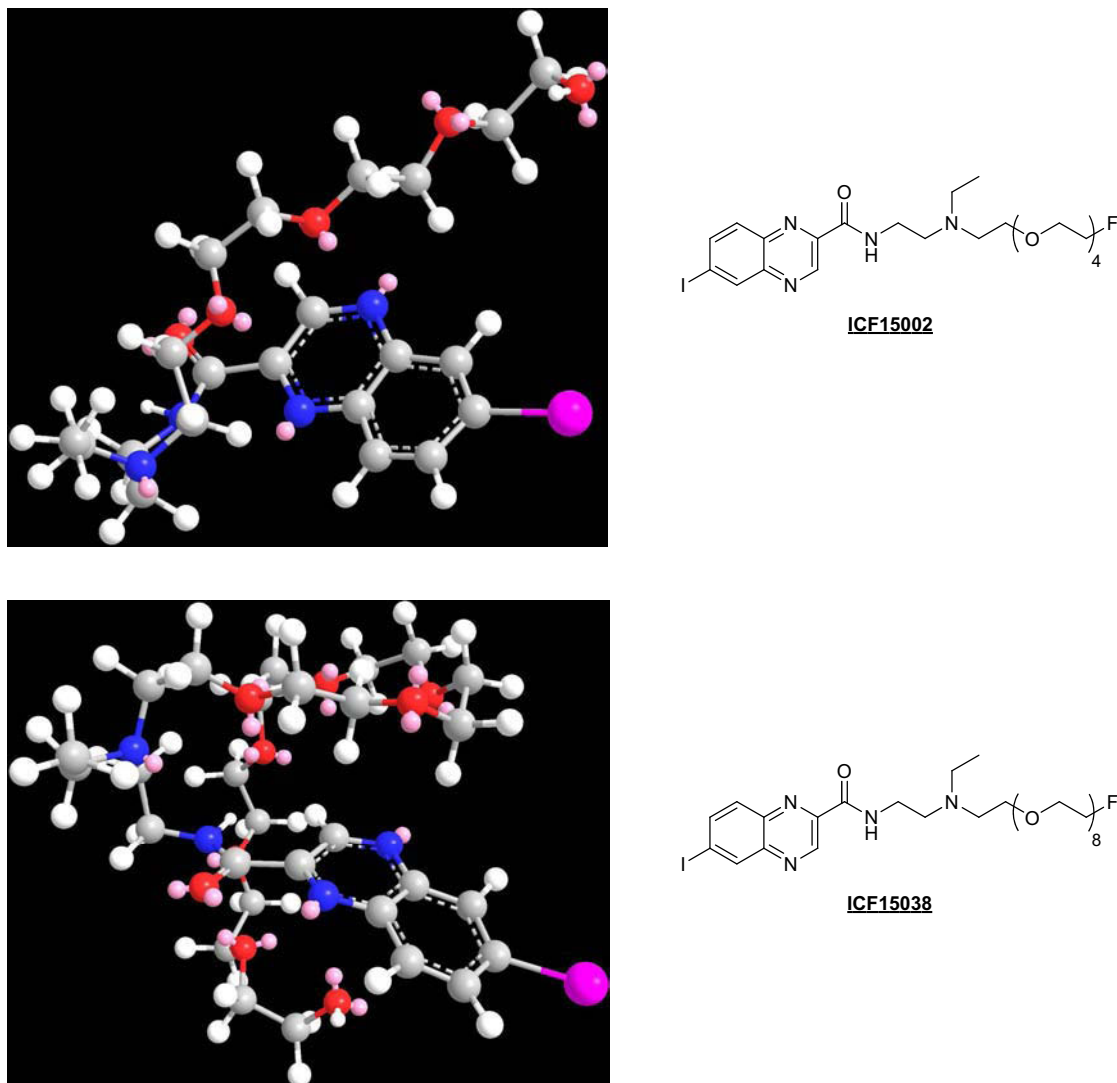


Figure 61 : Représentation d'ICF15002 et ICF15038 par modélisation moléculaire (Sybyl-X 1.2)

Le différentiel entre **ICF15002** et **ICF15038** est très net : la chaîne pegylée la plus longue (8 chaînons) se comporte très différemment de la chaîne plus courte (4 chaînons). Dans le cas des mésylates **80** et **81**, il peut être avancé que ce même phénomène d'enroulement pourrait être retrouvé, *a fortiori* pour le composé **81**. L'encombrement stérique généré par la chaîne pegylée rendrait alors le groupement partant mésylate en bout de chaîne moins accessible.

L'expérience corrèle avec ces observations : la substitution nucléophile du mésylate **80** nécessite une activation thermique supplémentaire. Le conjugué PEG₆ **82** est alors obtenu avec un rendement de 30 % honorable, compte tenu des difficultés rencontrées précédemment pour cette réaction. Il est finalement déprotégé en prodrogue « acétal PEG₆ » **41** avec un très bon rendement.

Le rendement de la synthèse du conjugué PEG₁₀ **83** suivant la même méthodologie est en revanche très bas. Une température de 65 °C appliquée pour la substitution nucléophile du mésylate **81** par l'amine secondaire **13** s'avère insuffisante pour produire le conjugué **83** tandis qu'une température plus élevée, la formation de nombreux produits secondaires est observée. Les faibles réactivités constatées tout au long de cette voie de synthèse n'ont pas permis d'accéder à des quantités importantes de prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42**.

- **82** et **83** RMN ^1H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition du singulet du mésylate.
- **41** et **42** RMN ^1H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 0,94 à 1,27 ppm).
- **41** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 1015,18$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 1015,25$.
- **42** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 1191,29$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 1191,33$.

1.4. Conclusions

Sur les cinq prodrogues visées, seules les trois modulant la prodrogue « acétal » **2** ont été synthétisées (**Figure 62**) :

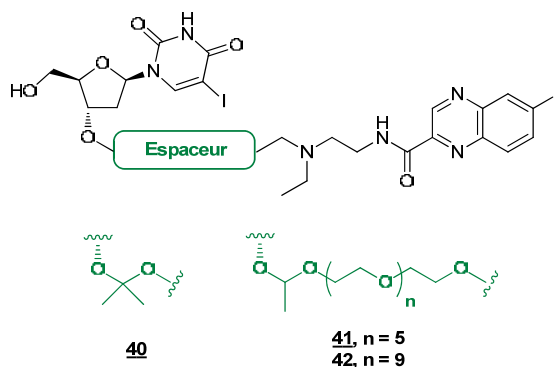


Figure 62 : Structures des prodrogues à espaceurs « classiques » de deuxième génération synthétisées

Les voies de synthèse mises au point ont permis d'accéder aux différentes prodrogues avec les rendements globaux indiqués ci-dessous :

- Prodrogue « cétal » **40** : 1,5 %, 8 étapes.
- Prodrogue « acétal PEG₆ » **41** : 8 %, 10 étapes.
- Prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42** : 0,2 %, 10 étapes.

L'ensemble des mises au point effectuées lors des synthèses des prodrogues de la première génération ont grandement facilité la synthèse de ces nouveaux analogues. Dans le cas des prodrogues « esters diméthyles » **38** et **39**, de nouveaux problèmes ont été rencontrés (lors de la préparation de synthons de départ ou des substitutions nucléophiles par exemple) et n'ont pu être levés malgré de nombreuses variations des conditions réactionnelles ou bien encore des voies de synthèse. La synthèse des prodrogues « cétal » **40** et « acétals pegylés » **41** et **42** a offert l'opportunité de développer des méthodologies originales, dont certaines sont désormais utilisées pour d'autres approches de vectorisation au sein de l'unité.

II. Evaluations *in vitro* de la deuxième génération de prodrogues

Les prodrogues « acétal PEG₆ » **41** et « acétal PEG₁₀ » **42** ont été conçues dans le but d'améliorer la stabilité métabolique de la prodrogue-mère « acétal » **2**. L'évaluation de leur stabilité physico-chimique ne semble ainsi pas essentielle, la même fonction espaceur étant impliquée. En revanche, la prodrogue « cétal » **40** a été synthétisée dans le but d'améliorer la libération du principe actif en milieu acide. Or, nous avons pu voir que les principaux points de fragilité métabolique semblent indépendants de la fonction espaceur (*N*-déalkylations et déiodations observées pour l'ensemble des prodrogues de première génération). L'évaluation de cette prodrogue sur des critères de stabilité métabolique n'apportera donc *a priori* aucune information supplémentaire. Ainsi, seuls les résultats obtenus selon l'évaluation sur des critères de stabilité physico-chimique sont présentés pour la prodrogue « cétal » **40**, tandis que les résultats de l'évaluation des prodrogues « acétal PEG₆ » **41** et « acétal PEG₁₀ » **42** sur des critères de stabilité métabolique *in vitro* par action des microsomes hépatiques sont présentés. Dans les deux cas, ces évaluations sont comparées à la prodrogue-mère « acétal » **2**.

II.1. Stabilité physico-chimique

La prodrogue « cétal » **40** a été évaluée selon la même méthodologie que les prodrogues de première génération (PBS, MEM, plasma humain et tampons acides). Les résultats obtenus par exemple avec le milieu tampon pH = 5 sont présentés dans la **Figure 63** ci-après :

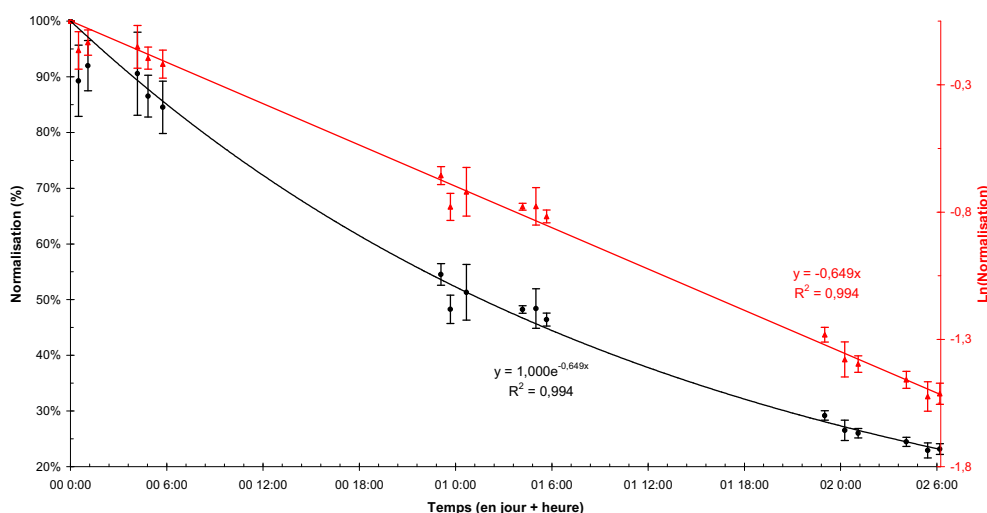


Figure 63 : Evolution de la concentration de la prodrogue « cétal » **40** dans le tampon pH = 5 en fonction du temps

Contrairement à la prodrogue « acétal » **2**, cette prodrogue est dégradée en présence d'un tampon pH = 5. L'ensemble des temps de demi-vie obtenus pour la prodrogue « cétal » **40** dans les différents milieux sont résumés et comparés avec ceux obtenus pour la prodrogue « acétal » **2** dans le **Tableau 17** suivant :

Temps de demi-vie	PBS	pH = 6	pH = 5	pH = 4	pH = 3	MEM	Plasma humain
« Cétal » 40	5 j et 6 h	31 h	25 h	4 h 46	0 h 44	4 j et 21 h	28 h
« Acétal » 2	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 3 j	Stable à 2 j	42 h

Tableau 17 : Temps de demi-vie des prodrogues « cétal » **40** et « acétal » **2** dans les différents milieux étudiés

Le différentiel entre les deux prodrogues est très net et indique la pertinence d'introduire une fonction cétal en tant qu'espaceur clivable en milieu acide : relative stabilité en milieu neutre (plus de 5 jours dans le PBS) et demi-vies comprises entre 25 h et 31 h pour des pH légèrement acides tels que ceux du milieu intramélanosomal (pH = 5 à 6).

II.2. Stabilité métabolique

L'ajustement structural envisagé pour améliorer la stabilité métabolique des prodrogues réside dans l'insertion des chaînes pegylées entre la fonction espaceur et l'amine tertiaire du vecteur, destinée à ralentir la dégradation de cette dernière. Les résultats de métabolisme *in vitro* sur microsomes hépatiques réalisées sur les prodrogues « acétal PEG₆ » **41** et « acétal PEG₁₀ » **42** sont présentés dans les paragraphes suivants.

II.2.1. Prodrogue « acétal PEG₆ » **41**

Les expériences conduites avec cette prodrogue ont abouti à l'identification de six métabolites principaux (**Schéma 54**) :

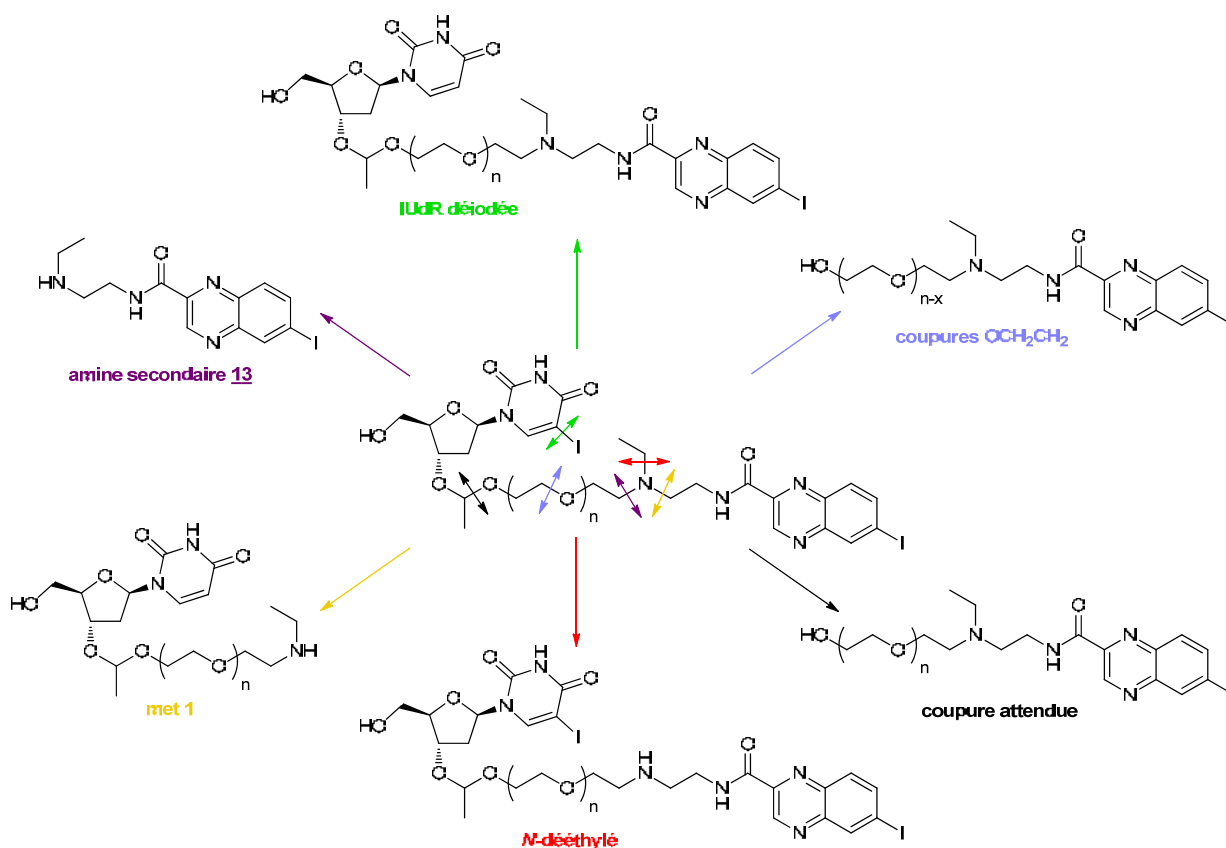


Schéma 54 : Métabolites identifiés issus des prodrogues « acétal PEG » **41** et **42**

Parmi ces métabolites, quatre sont identiques à ceux identifiés pour les prodrogues de première génération. Ils proviennent de la déiodation de l'IUDR (en vert) et des *N*-déalkylations de l'amine tertiaire (en violet, rouge et orange). Le métabolite généré par la coupure représentée en orange correspond à la coupure attendue en milieu acide de la fonction acétal. La coupure représentée en rose représente quant à elle tous les clivages possibles de la chaîne pegylée, notées « coupures OCH₂CH₂ ».

La **Figure 64** suivante présente l'évolution des concentrations relatives de la prodrogue et des différents métabolites en fonction du temps de contact avec les microsomes hépatiques :

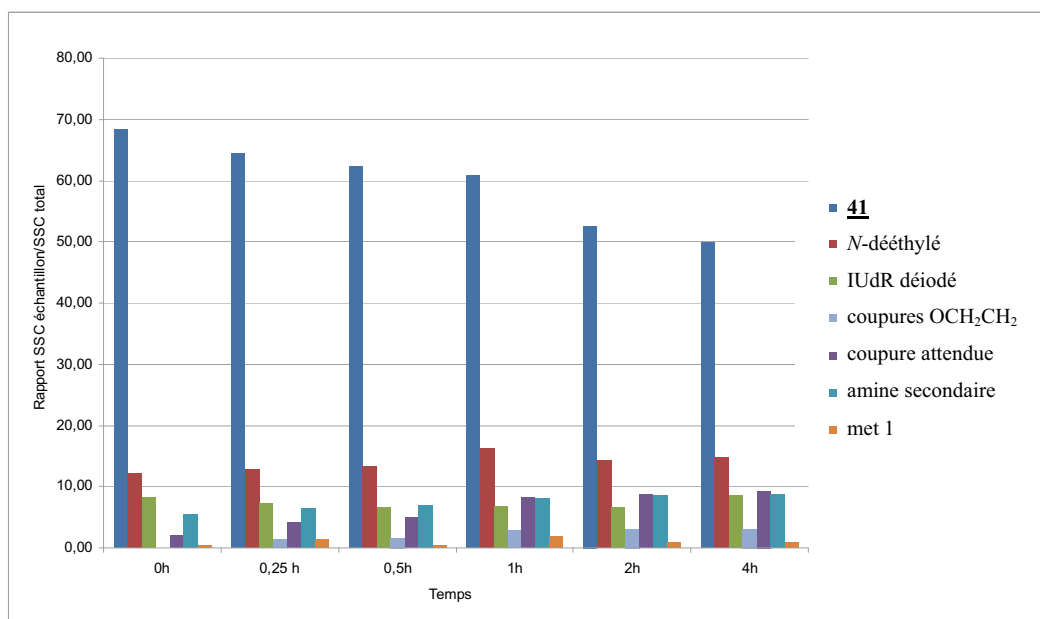


Figure 64 : Profil métabolique de la prodrogue « acétal PEG₆ » **41** en présence de microsomes hépatiques murins

Comme pour les prodrogues de première génération, les métabolites majoritaires sont ceux issus des différentes *N*-déalkylations (amine secondaire et composé *N*-dééthyly). Les cinétiques de formation de ces différents métabolites ainsi que de ceux issus des « coupures OCH₂CH₂ » de la chaîne pegylée sont représentées **Figure 65**.

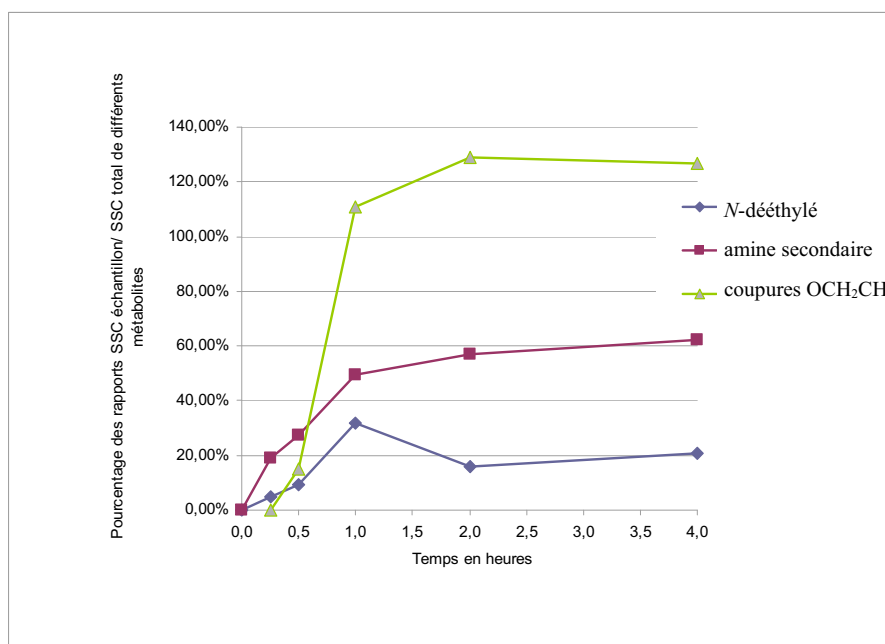


Figure 65 : Cinétique de formation des principaux métabolites issus de la prodrogue « acétal PEG₆ » **41**

Les différentes coupures de la chaîne pegylée sont les réactions métaboliques les plus rapides. Cependant, leur quantité relative est beaucoup plus faible que celles provenant des *N*-déalkylations (**Figure 64**). En revanche,

comparativement à la prodrogue « acétal » **2**, les *N*-déalkylations conduisant notamment à l'amine secondaire **13** sont beaucoup moins rapides (+ 30 % contre + 60 % au temps 30 minutes) et quantitatives (plateau à + 60 % pour la prodrogue **41** contre + 120 % et toujours en augmentation au temps 4 h pour la prodrogue **2**). Cette donnée indique que la pharmacomodulation (insertion d'une chaîne pegylée) semble pertinente : l'enroulement des chaînes pegylées observé en modélisation moléculaire pourrait être responsable d'un encombrement accru autour de l'amine tertiaire, rendant celle-ci moins accessible aux systèmes enzymatiques et donc moins sensible à la métabolisation.

II.2.2. Prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42**

Les métabolites identifiés lors de l'étude de cette prodrogue sont identiques à ceux déterminés pour la prodrogue précédente. La **Figure 66** suivante présente l'évolution des concentrations relatives de la prodrogue et des différents métabolites en fonction du temps de contact avec les microsomes hépatiques :

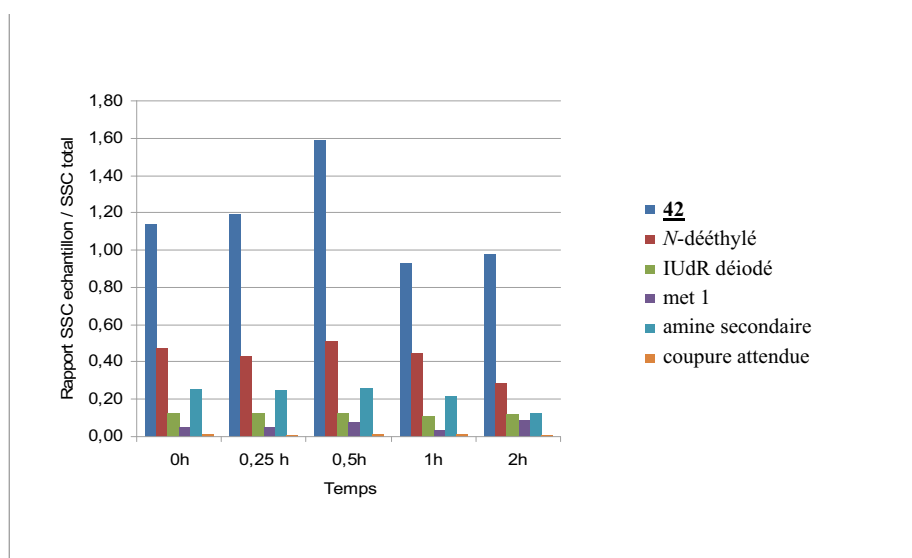


Figure 66 : Profil métabolique de la prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42** en présence de microsomes hépatiques murins

Pour cette prodrogue, aucune tendance très nette ne peut être dégagée : contrairement au dérivé pegylé précédent, les concentrations en métabolites identifiés ne suivent pas de tendance claire de diminution ou d'augmentation.

II.2.3. Conclusions

Les expériences menées sur la prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42** ne permettant pas de tirer de conclusions générales. En revanche, la comparaison entre la prodrogue de première génération « acétal » **2** et la prodrogue de deuxième génération « acétal PEG₆ » **41** semble indiquer que le choix de modification structurale (insertion d'une chaîne pegylée) est pertinent pour accroître sa stabilité métabolique. Cette tendance doit être confirmée par l'étude *in vivo* de la prodrogue modifiée « acétal PEG₆ » **41** comparativement à la prodrogue-mère « acétal » **2**. La prodrogue « acétal PEG₁₀ » **42** sera également évaluée *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* étant aberrants.

III. Synthèse des précurseurs stannylés et radioiodations

III.1. Synthèse des précurseurs stannylés

L'évaluation *in vivo* des prodrogues pegylées de deuxième génération (**41** et **42**) nécessite au préalable de disposer des précurseurs de radioiodation organostannylés. Comme pour la prodrogue « acétal » **2**, l'introduction du groupement organométallique doit être envisagée après la formation de la fonction acétal et avant l'alkylation de l'amine secondaire **13** (Schéma 55). Les intermédiaires éligibles pour cette séquence sont alors les benzoates **76** et **77**, ainsi que les alcools **78** et **79** précédemment décrits :

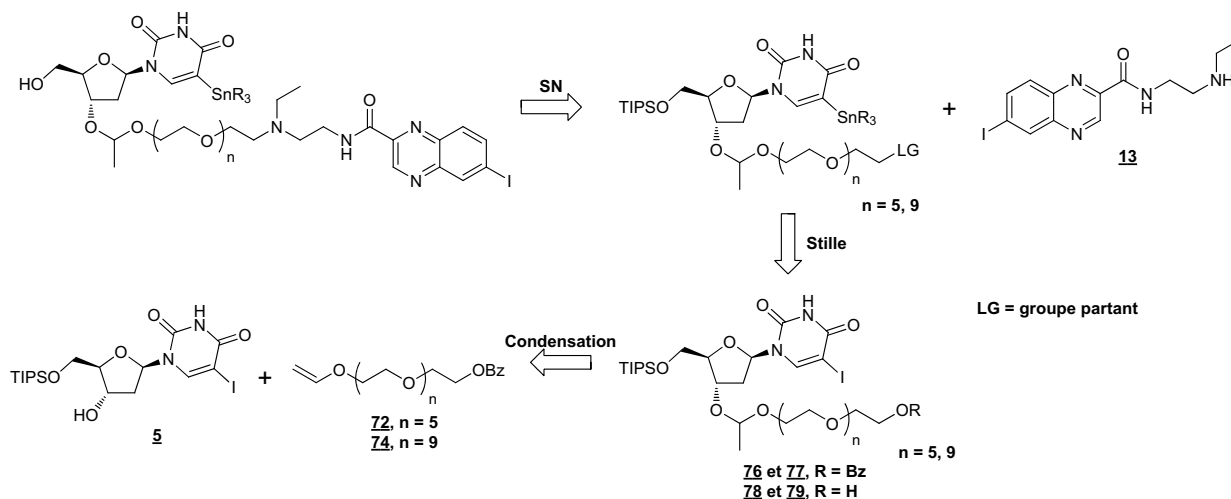


Schéma 55 : Rétrosynthèse des précurseurs stannylés

Les conditions utilisées lors de la synthèse de la prodrogue « acétal tributylstannyle » **30** ont été appliquées en premier lieu à l'alcool **78** (Schéma 56) :

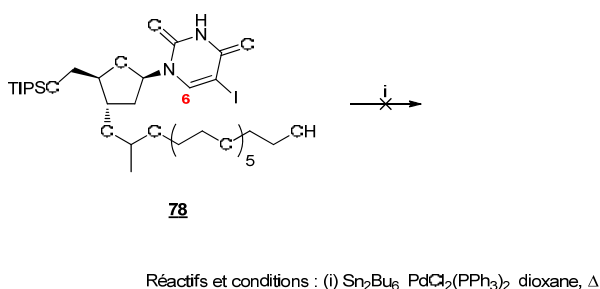
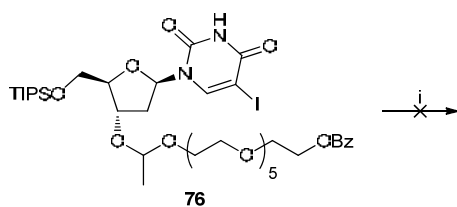


Schéma 56 : Tentative de stannylation de l'alcool **78**

Les conditions réactionnelles utilisées pour ce couplage de Stille se sont soldées par un échec. Lors de cette réaction une dégradation complète de l'alcool **78** a été observée, accompagnée de la formation d'un produit non désiré majoritaire. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN ^1H) de ce composé permet de conclure à une déiodation de **78** : le signal correspondant au proton 6, habituellement un singulet aux alentours de 8 ppm est déplacé vers les champs forts (blindage) sous forme de doublet. L'apparition d'un autre doublet avec la même constante de couplage aux alentours de 6,5 ppm valide l'hypothèse de la déiodation. Ceci indique que l'addition oxydative du dérivé iodé sur le palladium n'est pas l'étape limitante, mais bien la transmétallation par l'hexabutyldiétain. D'autres essais à partir du benzoate **76** (Schéma 57) impliquant le palladium (0) tétrakistriphénylphosphine dans le dioxane ou le toluène ont été réalisés.

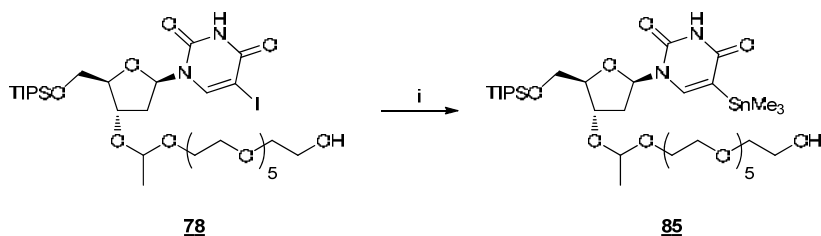


Réactifs et conditions : (i) Sn_2Bu_6 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, dioxane ou toluène, \

Schéma 57 : Tentatives (bis) de stannylation du benzoate **76**

Si la réaction conduite dans le toluène est inefficace (pas de conversion), celle réalisée dans le dioxane fournit après purification trois produits identifiés par RMN ^1H : le benzoate de départ **76**, le produit déiodé et, de façon minoritaire, le stannylé attendu. L'obtention de traces du composé espéré associée à une importante déiodation confirment que l'insertion du distannane dans l'édifice catalytique constitue l'étape limitante de la réaction. L'enroulement de la chaîne PEG orientée vers la base pyrimidique est peut-être à l'origine d'un encombrement stérique qui s'ajoute à celui du palladium complexé par des ligands eux-mêmes volumineux. Il est donc probable que l'hexabutyldiétain ne puisse accéder au complexe. Pour contourner ce phénomène, l'hexaméthyl-diétain Sn_2Me_6 d'encombrement stérique plus faible a ensuite été testé. Ce type de dérivés triméthylstannyles sont particulièrement toxiques par voie orale et cutanée, et sont difficilement manipulables. Les réactions ont donc été conduites par prudence en ballon scellé.

Le premier essai conduit avec le palladium tétrakistriphénylphosphine comme catalyseur s'est soldé par un échec : les trois produits obtenus précédemment (produit de départ, déiodé et stannylé attendu) sont retrouvés. La déiodation demeure le processus majoritaire. Dans le but de diminuer encore l'encombrement autour de l'édifice catalytique, le catalyseur à base de palladium (II) est de nouveau utilisé (**Schéma 58**) :



Réactifs et conditions : (i) Sn_2Me_6 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, dioxane, \

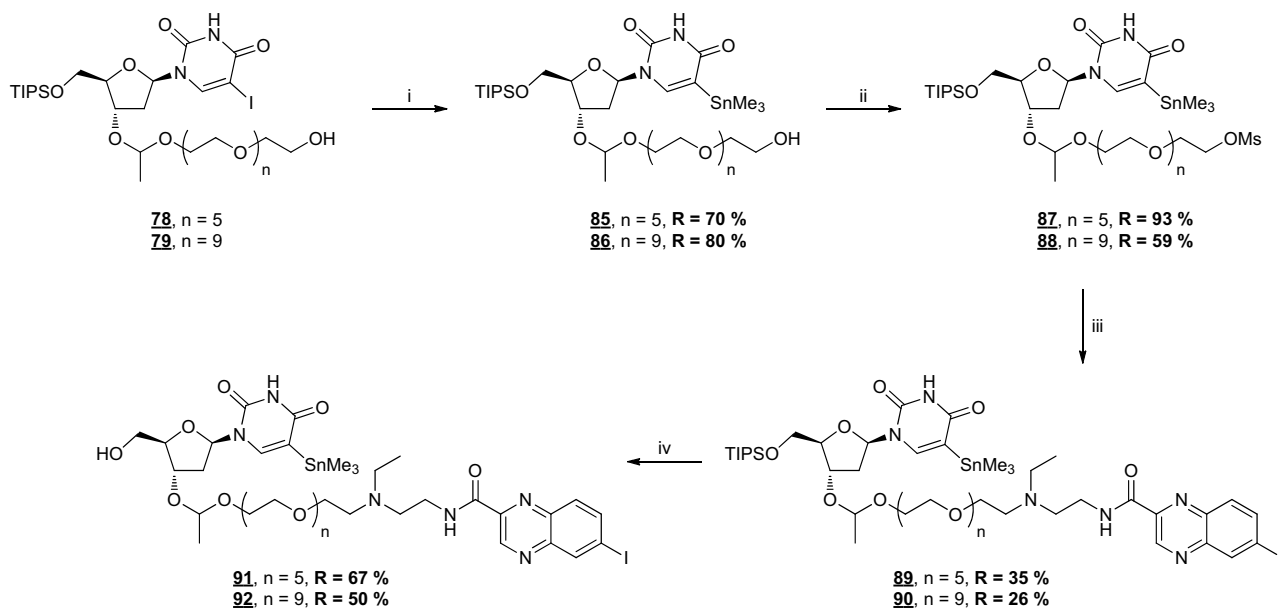
Schéma 58 : Stannylation de l'alcool **78**

Conformément à nos attentes, cet essai conduit sur de faibles quantités permet d'obtenir le triméthylstannyle **85**, en mélange avec l'alcool **78** (très minoritaire). Ces derniers n'ont pu être séparés malgré les nombreuses conditions chromatographiques étudiées. L'essai suivant est conduit selon les mêmes conditions réactionnelles, avec un temps de réaction allongé. La conversion alors totale permet d'isoler le triméthylstannyle **85**, avec un rendement de 46 %.

Eléments de détermination structurale :

- **85** RMN ^1H : blindage du signal du proton pyrimidique (de 8,04 à 7,20 ppm), apparition des signaux relatifs aux méthyles du groupement triméthylstannyle (singulet à 0,27 ppm).

La stannylation ayant été mise au point, la suite de la voie de synthèse est réalisée (**Schéma 59**) :



Réactifs et conditions : (i) Sn_2Me_6 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, dioxane, Δ , 5 h (iii) MsCl , DIPEA, CH_2Cl_2 , TA, 1 h ; (iv) **13**, DIPEA, acétonitrile, 65 °C (n = 5), 90 h ou 70 °C (n = 9), 72 h ; (v) TBAF, THF, TA, 4 h (n = 5) ou 2 h (n = 9)

Schéma 59 : Synthèses des précurseurs de radioiodation **91** et **92**

La reprise des conditions mises au point juste auparavant sur les alcools **78** et **79** génère les deux triméthylstannyles **85** et **86** correspondants avec des rendements jamais égalés lors des synthèses précédentes pour cette réaction de déiodostannylation. La suite de la voie de synthèse est conduite selon les conditions développées lors de la synthèse des prodrogues « acétal pegylé » **41** et **42**. Pour les produits de la série PEG₆, les rendements obtenus sont très satisfaisants jusqu'à l'obtention de la prodrogue stannylée **91**, tandis que ceux de la série PEG₁₀ sont comparativement moindres, notamment en raison des purifications fastidieuses.

Eléments de détermination structurale :

- **86** RMN ¹H : blindage du signal du proton pyrimidique (de 8,03 à 7,18 ppm), apparition des signaux relatifs aux méthyles du groupement triméthylstannyle (singulet à 0,26 ppm).
- **87** et **88** RMN ¹H : apparition du singulet relatif au méthyle du mésylate (3,08 ou 3,07 ppm).
- **89** et **90** RMN ¹H : apparition des signaux du vecteur (massifs en zone aliphatique et signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline) et disparition du singulet relatif au méthyle du mésylate.
- **91** et **92** RMN ¹H : disparition des signaux du groupement TIPS (massif de 1,01 à 1,12 ppm).
- **91** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 1053,25$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 1053,37$.
- **92** spectrométrie de masse : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 1229,36$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 1229,40$.

III.2. Radioiodations

Pour ces marquages, des essais avec une faible activité ont été réalisés, en appliquant les conditions mises au point pour les précédents (100 µL de solution de précurseur stannylé dans EtOH, 1,4 µL de [¹²⁵I]NaI, 100 µL d'HCl 0,1 N, 40 µL de CAT 1 mg / mL, 20 minutes de réaction, quench avec 100 µL de Na₂S₂O₅ à 1 mg / 2 mL et 200 µL de NaOH 0,1 N). Dans ces conditions, une importante dégradation a été détectée en UV comme en radioactivité. Les prodrogues iodée **41** et stannylée **91** ont alors été mis en contact avec les différents réactifs utilisés, et analysés par CLHP après 20 minutes. Les principales informations tirées de ces expériences sont : (i) une dégradation du triméthylstannyle **91** par HCl 0,1 N, par le métabisulfite et par la CAT, ainsi que (ii) une dégradation de la prodrogue **41** principalement par le métabisulfite et dans une moindre mesure par la CAT.

III.2.1. Synthèse de la prodrogue « acétal PEG₆ » [¹²⁵I]**41**

Les données précédemment obtenues ont conduit à la modification des conditions réactionnelles : le métabisulfite de sodium est abandonné, l'acide chlorhydrique est utilisé plus dilué et la quantité de CAT est réduite :

- 100 µL de solution de **91** dans EtOH (1 mg / mL)
- 52 µL de [¹²⁵I]NaI (4,77 mCi)
- 100 µL d'HCl 0,01 N
- 20 µL de CAT (1 mg / mL H₂O)

Après 20 minutes de réaction, le mélange est quenché avec 200 µL de NaOH 0,01 N puis purifié par CLHP semi-préparative. La prodrogue radioiodée [¹²⁵I]**41** est obtenue avec un rendement radiochimique de 39 % et une radiopureté supérieure à 99 %.

III.2.2. Synthèse de la prodrogue « acétal PEG₁₀ » [¹²⁵I]**42**

Des conditions réactionnelles identiques (avec 70 µL, 5,08 mCi de [¹²⁵I]NaI) ont été appliquées au triméthylstannyle **92**, permettant d'isoler après purification la prodrogue radioiodée [¹²⁵I]**42** avec un rendement radiochimique de 21 % et une radiopureté supérieure à 99 %.

Les deux prodrogues radioiodées [¹²⁵I]**41** et [¹²⁵I]**42** sont ensuite utilisées pour une étude de biodistribution sur souris porteuse de tumeur.

IV. Evaluations in vivo

Les évaluations des prodrogues de deuxième génération ont été conduites selon les mêmes procédures que celles utilisées pour les prodrogues de première génération (cf. page 108).

IV.1. Prodrogue « acétal PEG₆ » [¹²⁵I]41

➤ Imagerie scintigraphique

L'étude de cette prodrogue radioiodée par imagerie TEMP après injection à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffe de tumeur mélanique B16F0 permet d'obtenir les images suivantes (**Figure 67**) :

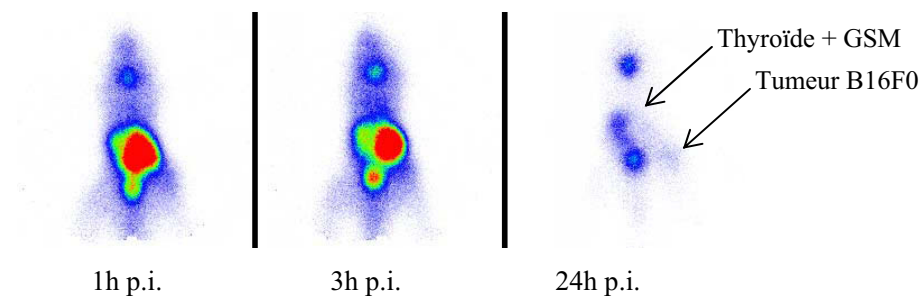


Figure 67 : Scintigraphies après injection de la prodrogue « acétal PEG₆ » [¹²⁵I]41 à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffe de mélanome B16

Dès 1 h p.i., une accumulation radioactive est détectée au niveau du tissu digestif, de la vessie et de la région « thyroïde / glandes sous-maxillaires ». Il est très difficile de mettre en évidence une activité au niveau tumoral : il faut attendre une élimination des organes non cibles pour que celle-ci soit visible.

Les valeurs de pourcentage de dose injectée par gramme de tumeur déterminées à partir des scintigraphies sont résumées et comparées aux valeurs obtenues pour la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2 dans le **Tableau 18** suivant :

	[¹²⁵ I]41	[¹²⁵ I]2
Temps post-injection	% DI / g de tumeur	% DI / g de tumeur
1 h	3,76 ± 0,64	1,01 ± 1,43
3 h	4,37 ± 1,32	0,60 ± 0,70
24 h	1,68 ± 1,11	0,24 ± 0,30

Tableau 18 : Concentration tumorale (% DI / g de tumeur) après injection des prodrogues « acétal PEG₆ » [¹²⁵I]41 et « acétal » [¹²⁵I]2 à des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

La concentration tumorale est plus importante que celle précédemment relevée pour la prodrogue-mère « acétal » 2 (1,01 et 0,60 % DI / g de tumeur à 1 h et 3 h p.i. respectivement).

➤ Prélèvements

L'étude de biodistribution par sacrifices des animaux, prélèvements d'organes et quantification par compteur gamme permet d'obtenir les données résumées dans le **Tableau 19** suivant :

% DI / g	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Tumeur	2,74 ± 0,73	1,82	1,31
Sang	1,93 ± 0,42	1,04	0,37
Muscle	0,59 ± 0,03	0,20	0,07
Yeux	1,43 ± 0,61	0,90	0,65
Foie	1,69 ± 0,04	0,04	0,25
Reins	2,76 ± 0,08	0,94	0,31
Rate	1,50 ± 0,24	2,20	0,40
Thyroïde + GSM	7,05 ± 0,16	4,24	13,01
Tumeur / muscle	4,65 ± 1,48	8,49 ± 1,13	19,05
Tumeur / sang	1,49 ± 0,70	1,84 ± 0,12	3,52
Yeux / muscle	2,44 ± 1,16	4,26 ± 0,44	9,42

Tableau 19 : Biodistribution de la prodrogue « acétal PEG₆ » [¹²⁵I]41 sur des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

La quantification des scintigraphies indique une accumulation tumorale de l'ordre de 4 % DI / g, confirmée par l'étude sur prélèvements. Par ailleurs, le rapport tumeur / sang est supérieur à 1 dès le temps 1 h p.i. et augmente au cours du temps, indiquant une accumulation au niveau tumoral, non liée au sang circulant.

IV.2. Prodrogue « acétal PEG₁₀ » [¹²⁵I]42

➤ Imagerie scintigraphique

L'étude de cette prodrogue radioiodée par imagerie TEMP après injection à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffe de tumeur mélanique B16F0 permet d'obtenir les images suivantes (**Figure 68**) :

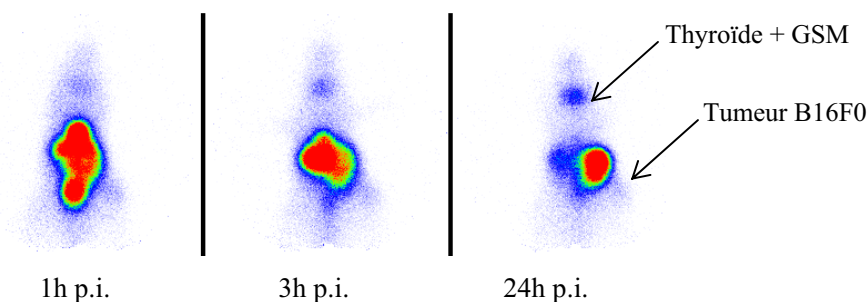


Figure 68 : Scintigraphies après injection de la prodrogue « acétal PEG₁₀ » [¹²⁵I]42 à des souris C57Bl6 porteuses de xénogreffes de mélanome B16

Dès 1 h p.i., une accumulation radioactive est retrouvée au niveau du tissu digestif et de la vessie. Il est très difficile de mettre en évidence une activité au niveau tumoral, même au temps 24 h p.i..

Les valeurs de pourcentage de dose injectée par gramme de tumeur déterminées à partir des scintigraphies sont résumées et comparées aux valeurs obtenues pour la prodrogue « acétal » [¹²⁵I]2 dans le **Tableau 20** suivant :

	$[^{125}\text{I}]\underline{42}$	$[^{125}\text{I}]\underline{2}$
Temps post-injection	% DI / g de tumeur	% DI / g de tumeur
1 h	2,03 ± 0,49	1,01 ± 1,43
3 h	2,08 ± 0,50	0,60 ± 0,70
24 h	1,98 ± 0,66	0,24 ± 0,30

Tableau 20 : Concentration tumorale (% DI / g de tumeur) après injection de la prodrogue « acétal PEG₁₀ » $[^{125}\text{I}]\underline{42}$ à des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

Les valeurs de concentration tumorale sont de l'ordre de 2 % DI / g sont légèrement plus hautes que celles obtenues pour la prodrogue « acétal » $\underline{2}$, mais plus faibles que pour la prodrogue pegylée précédente.

➤ Prélèvements

L'étude de biodistribution par sacrifices des animaux, prélèvements d'organes et quantification par compteur gamme permet d'obtenir les données résumées dans le **Tableau 21** suivant :

% DI / g	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Tumeur	0,64 ± 0,06	0,50 ± 0,05	0,38 ± 0,14
Sang	0,55 ± 0,01	0,37 ± 0,07	0,27 ± 0,08
Muscle	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Yeux	0,46 ± 0,10	0,34 ± 0,01	0,31 ± 0,06
Foie	0,74 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,28 ± 0,13
Reins	0,62 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,18 ± 0,05
Rate	0,39 ± 0,01	0,41 ± 0,06	0,27 ± 0,09
Thyroïde + GSM	1,60 ± 0,13	3,15 ± 1,09	2,94 ± 1,17
Tumeur / muscle	5,76 ± 0,38	6,98 ± 0,40	7,98 ± 1,55
Tumeur / sang	1,16 ± 0,03	1,37 ± 0,13	1,47 ± 0,34
Yeux / muscle	4,10 ± 1,10	4,89 ± 0,93	6,68 ± 1,13

Tableau 21 : Biodistribution de la prodrogue « acétal PEG₁₀ » $[^{125}\text{I}]\underline{42}$ sur des souris porteuses de xénogreffe de mélanome B16

La quantification par imagerie indique une accumulation tumorale moindre, de l'ordre de 1 à 2 % DI / g, confirmée par l'étude sur prélèvements. Une accumulation importante est notable au niveau de l'ensemble « thyroïde / glandes sous-maxillaires », et tend à suggérer une déiodation *in vivo*. Le rapport tumeur / sang est peu différent de 1 et n'augmente pas au cours du temps, indiquant une accumulation tumorale non spécifique, probablement due à l'activité du sang circulant.

IV.3. Discussion

Les données obtenues pour l'évaluation des prodrogues de deuxième génération restent modestes comparativement à celles correspondant à la biodistribution du vecteur de référence ICF01012. Cependant, la comparaison entre les deux générations de prodrogues permet de conclure à un gain en terme de ciblage actif apporté par l'insertion d'une chaîne pegylée.

En effet, nous avons vu précédemment la différence de stabilité métabolique *in vitro* observée entre les prodrogues « acétal » **2** et les prodrogues « acétal PEG₆ » **41** et « acétal PEG₁₀ » **42**. Cette différence semble se confirmer également *in vivo*, plusieurs arguments pouvant être avancés en faveur de cette hypothèse :

➤ Les distributions tumorales sont supérieures à celle obtenue pour la prodrogue de première génération. Le profil de distribution met en évidence un maximum d'accumulation 1 h et 3 h post-injection. Ce profil concorde avec celui obtenu pour le traceur de référence ICF01012.

➤ Les prodrogues de première génération sont rapidement métabolisées (seulement 4 % de produit inchangé dans le sang 10 minutes post-injection pour la prodrogue « acétal » **2**), provoquant un clivage précoce du principe actif et du vecteur. Pour les prodrogues de deuxième génération, et particulièrement pour la prodrogue « acétal PEG₆ » **41**, plusieurs paramètres semblent indiquer que ce tropisme est en partie conservé: (i) la distribution tumorale à 24 h est plus importante, (ii) les rapports tumeur / sang et tumeur / muscle augmentent très nettement au cours du temps pour atteindre des valeurs importantes pour les deux prodrogues pegylées, *a contrario* des prodrogues de première génération pour lesquelles ces rapports restaient faibles et sans évolution, (iii) la concentration dans les organes de métabolisme et d'élimination est beaucoup plus faible aux temps courts.

➤ Le profil de distribution pour la prodrogue « acétal PEG₆ » **41** est similaire au niveau des yeux et de la tumeur, tous deux pigmentés. Ces données sont en accord avec une affinité de cette prodrogue pour les mélanines. La prodrogue « acétal PEG₆ » **41** resterait donc plus largement sous forme inchangée après le premier passage métabolique, ce qui lui permettrait d'atteindre sa cible. Une étude de métabolisme *in vivo* de cette prodrogue est cependant nécessaire pour confirmer ces hypothèses.

CHAPITRE 4

*Prodrogues activées par la tyrosinase et
espaceurs auto-clivables*

Jusqu'à présent, le travail réalisé avait pour but de valider ou d'infirmer la possibilité de vectoriser sélectivement un principe actif anticancéreux sous forme de prodrogue vers le mélanome. Dans ce cadre, le vecteur assurant à lui seul la sélectivité, des espaceurs simples ont été étudiés, ne permettant pas une libération contrôlée de la drogue sélectivement au niveau tumoral. En parallèle de cette étude, la conception de prodrogues incluant un espaceur susceptible de libérer la drogue de manière spécifique au niveau des mélanocytes après distribution tumorale par le vecteur a été initiée. Ce concept s'inspire de la stratégie MDEPT (Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy) qui utilise la tyrosinase (enzyme clé de la mélanogénèse) comme gâchette (*Figure 69*) :

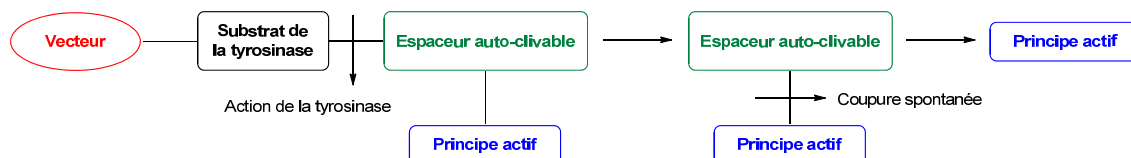


Figure 69 : Stratégie MDEPT

Afin de valider le concept de libération et devant la complexité des structures envisagées ainsi que la grande variété des espaceurs auto-clivables disponibles, une démarche progressive a été adoptée (*Figure 70*) :

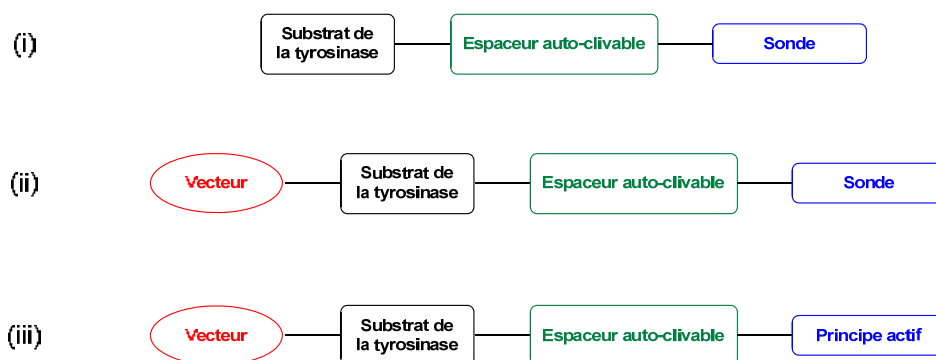


Figure 70 : Processus d'étude en trois étapes

- (i) synthèse et étude de conjugués simples au sein desquelles le principe actif est remplacé par une sonde dont la libération est quantifiable par différentes méthodes (CLHP, mesure de densité optique, RMN du fluor). Cette investigation portera sur quatre conjugués comportant chacun un espaceur différent. Les structures seront composées de trois parties : le substrat de la tyrosinase (phénol ou catéchol) qui assure la sélectivité de la libération, la sonde et un espaceur auto-clivable qui permet une libération en cascade de cette dernière.

- (ii) synthèse et étude d'un conjugué auquel le vecteur est ajouté. Cette étape permettra de valider l'action de la tyrosinase sur un substrat plus encombré.

- (iii) synthèse et étude du conjugué basé sur la structure précédente pour laquelle la sonde est remplacée par l'IUdR.

La partie constituée du substrat de la tyrosinase est le point central de l'échafaudage structural : l'ensemble espaceur auto-clivable-sonde ainsi que le vecteur lui seront directement liés. Pour plus de clarté, le code couleur utilisé sera conservé tout au long de cette partie : en noir la partie substrat de la tyrosinase, en vert l'espaceur, en bleu la sonde et en rouge, le vecteur.

Concernant la première étape de notre démarche, les espaceurs envisagés sont inspirés des motifs auto-clivables décrits dans la partie bibliographique (*cf.* chapitre 6 - paragraphe II.5.). Des espaceurs de type benzyliques, aliphatique et cinnamique susceptibles de libérer une structure respectivement par élimination benzylique (1,4) et (1,6), par cyclisation intramoléculaire (formation d'urée) et par élimination cinnamique (1,8) seront évalués (**Figure 71**) :

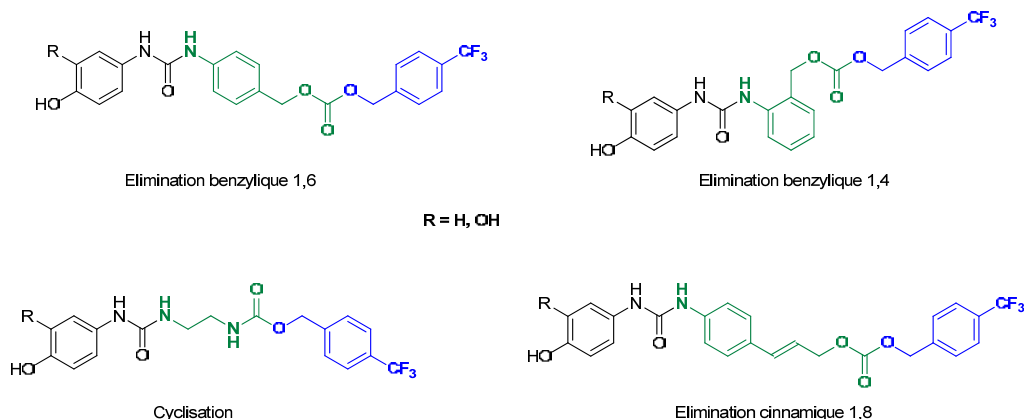


Figure 71 : Structures envisagées des « prosondes »

Quatre espaceurs auto-clivables différents sont développés et pour chacun, les substrats sont déclinés dans leur version phénol et catéchol. Les structures de ces premiers conjugués correspondent donc à la combinaison de quatre espaceurs (éthyle, benzyles et cinnamyle) et de deux substrats (phénol et catéchol).

Il est important de préciser une fois encore que les conjugués synthétisés dans cette partie vont incorporer dans leur structure une sonde permettant d'évaluer la libération par l'action de la tyrosinase. Par analogie avec le terme « prodrogue », les structures seront baptisées « prosondes ». Les voies de synthèse employées doivent également tenir compte que la sonde est par la suite destinée à être remplacée par un principe actif (**Schéma 60**) :

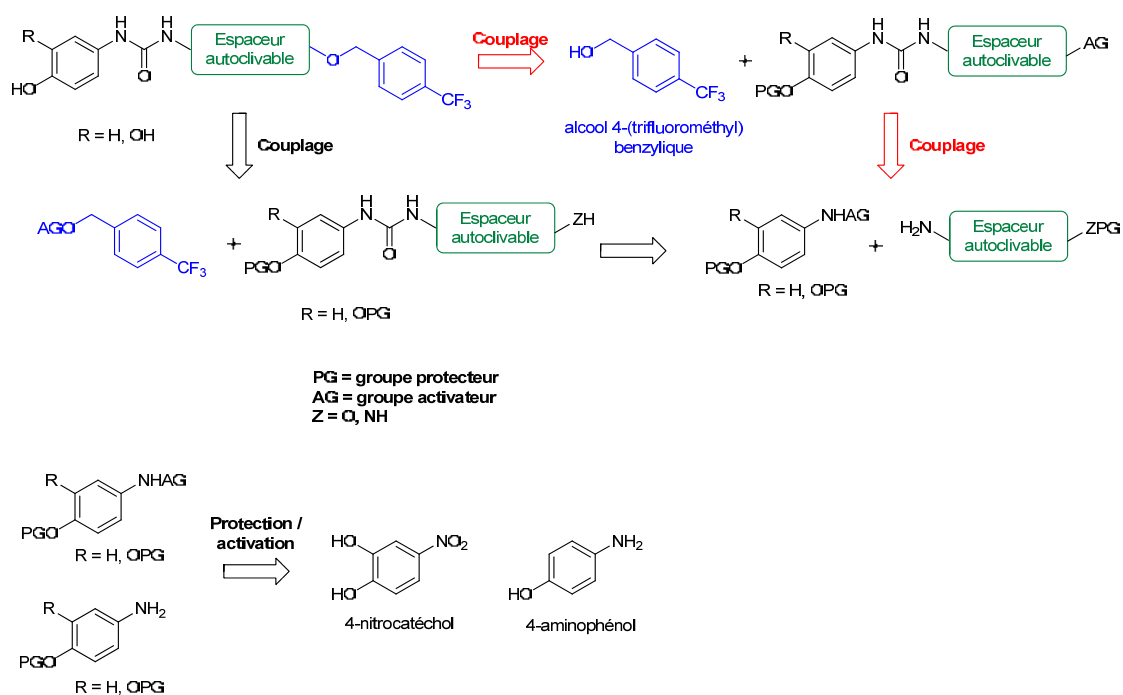


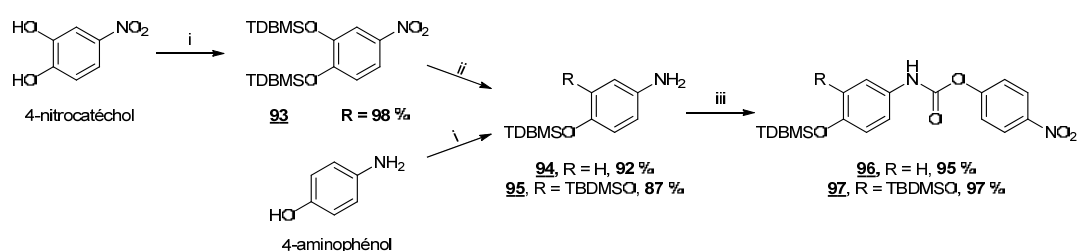
Schéma 60 : Rétrosynthèse des prosondes activables par la tyrosinase

La fonction urée est obtenue par l'attaque de l'espaceur aminé sur un carbamate activé du substrat de la tyrosinase. Hormis cette étape commune, deux voies convergentes sont envisageables pour l'obtention des prosondes finales. Dans les deux cas, l'espaceur auto-clivable est lié au substrat de la tyrosinase puis cet ensemble est couplé à la sonde. Les voies diffèrent uniquement par les positions d'activation (sur la sonde ou sur le bras espaceur). Les synthons proviennent de la protection / fonctionnalisation de deux composés commerciaux : le 4-nitrocatéchol et le 4-nitrocatechol. Ces derniers permettent la préparation de précurseurs communs à toutes les structures envisagées, décrite dans le paragraphe suivant.

I. Synthèse des précurseurs communs

I.1. Partie substrat de la tyrosinase

La synthèse de ces précurseurs a été réalisée selon la voie suivante (**Schéma 61**) :



Réactifs et conditions : (i) TBDMSCl, imidazole, THF, TA, 3 h 30 ; (ii) H₂ 1 atm, Pd/C 10%, EtOH, TA, 3 h ; (iii) chloroformiate de *p*-nitrophényle, pyridine, THF, TA, 1 h 30 (**94**) ou 3 h (**95**)

Schéma 61 : Synthèse des fragments substrat de la tyrosinase

Cette voie s'appuie le 4-aminophénol et le 4-nitrocatechol commerciaux. La protection des fonctions phénols est réalisée par un groupement organosilane. La grande maniabilité de ces groupements protecteurs, essentielle pour la suite de la synthèse a motivé ce choix. Le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS), plus labile, a été préféré au TIPS précédemment utilisé pour la synthèse des prodrogues à espaceurs « classiques ». Les rendements associés à cette étape de protection (92 et 98 %) sont excellents. La synthèse du dérivé catéchol **97** nécessite une étape supplémentaire de réduction du dérivé nitré **93** en aniline **95** par hydrogénation catalytique.

La conversion de l'aniline **94** en carbamate activé **96** est réalisée dans un premier temps selon les conditions déjà utilisées dans le chapitre 2 pour l'obtention de **27** et **36** (pyridine, chloroformiate, THF), qui conduisent à un mélange inséparable du carbamate **96** attendu et du dimère suivant (ratio 2 : 1) (**Figure 72**) :

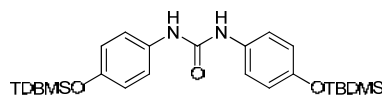


Figure 72 : Dimère obtenu lors de la synthèse du carbamate activé **96**

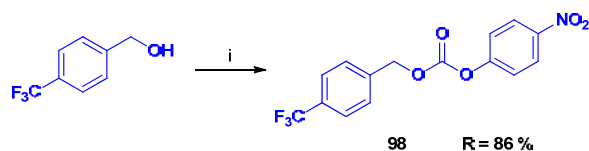
Lors de cette réaction, l'aniline **94** est en solution avec la pyridine dans le THF puis une solution de chloroformiate dans le THF est additionnée. Cependant, la réaction catalysée par la pyridine est si rapide que le carbamate activé **96** formé réagit instantanément avec l'aniline **94** non encore convertie. Pour pallier à ce problème, le chloroformiate est d'abord ajouté à la solution de l'aniline **94** dans le THF puis une solution de pyridine dans le THF est additionnée. Suivant cette méthodologie, les carbamates activés **96** et **97** sont isolés avec d'excellents rendements.

Eléments de détermination structurale :

- **93** RMN ¹H : apparition des signaux du groupement TBDMS (singulets à 0,25 et 0,99 ppm).
- **94** RMN ¹H : apparition des signaux du groupement TBDMS (singulets à 0,14 et 0,96 ppm).
- **95** RMN ¹H : glissement vers les champs forts des signaux aromatiques (de 6,87 à 6,21 ppm, de 7,71 à 6,27 ppm et de 7,77 à 6,64 ppm) et apparition d'un large singulet (NH₂) à 3,92 ppm.
- **96** et **97** RMN ¹H : disparition des singulets élargis (NH₂) et apparition des signaux aromatiques du *p*-nitrobenzène (doublets à 7,36 et 8,26 ppm ou 7,38 et 8,28 ppm).

1.2. Partie sonde

Les structures envisagées incluent une liaison carbonate ou carbamate entre l'espaceur et la sonde. L'activation préalable de la sonde (**voie noire** de la rétrosynthèse *p150*) permet d'obtenir un synthon commun pour accéder à ces fonctions, indépendamment des espaceurs. L'activation de la fonction alcool est une fois encore réalisée par un dérivé de *p*-nitrophénol. Le carbonate activé **98** est préparé en calquant les conditions développées juste auparavant pour l'obtention des carbamates activés **96** et **97** (**Schéma 62**) :



Réactifs et conditions : (i) chloroformate de *p*-nitrophényle, pyridine, THF, TA, 3 h

Schéma 62 : Synthèse de la sonde activée **98**

Eléments de détermination structurale :

- **98** RMN ¹H : apparition des signaux aromatiques du *p*-nitrobenzène (doublets à 7,39 et 8,28 ppm).
- **98** RMN ¹³C : apparition des signaux aromatiques du *p*-nitrobenzène (121,9, 125,5, 145,6 et 155,5 ppm) et du carbonyle (152,49 ppm).

1.3. Partie espaceur

Les deux « extrémités » des conjugués disponibles, les synthons centraux correspondant aux différents espaceurs sont préparés (**Schéma 63**). Ils doivent comporter une fonction amine (ou aniline) libre pour le premier couplage au substrat, et une seconde fonction, protégée, permettant ultérieurement la liaison avec la sonde :

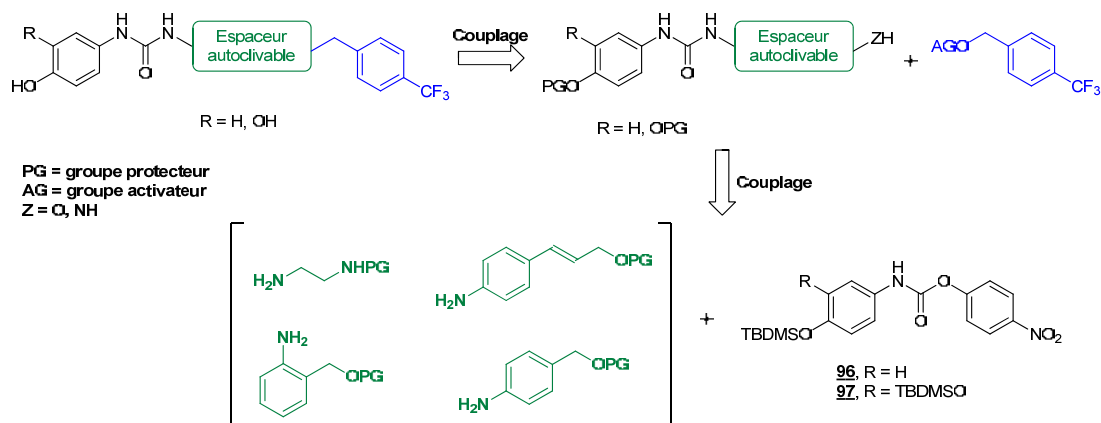
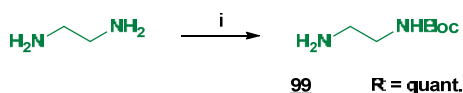


Schéma 63 : Rétrosynthèse des synthons espaceurs nécessaires

I.3.1. Espaceur aliphatique (libération par cyclisation intramoléculaire)

Le produit de départ est l'éthylène diamine, qui est monoprotégée (**Schéma 64**) par un groupement orthogonal aux dérivés silylés en vue d'une déprotection sélective ultérieure au premier couplage :



Réactifs et conditions : (i) Boc₂O, CH₂Cl₂, TA, 20 h

Schéma 64 : Monoprotection de l'éthylène diamine

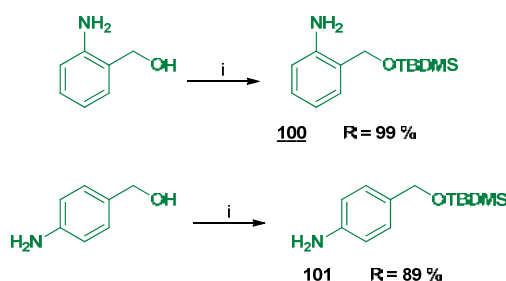
La protection est réalisée par un groupement Boc, déjà utilisé dans le chapitre 2. Le 2-aminoéthylcarbamate de *tert*-butyle **99** est obtenu quantitativement grâce à des conditions très diluées et une addition de Boc₂O très lente (8 h).

Eléments de détermination structurale :

- **99** RMN ¹H : large singulet à 1,12 ppm (NH₂) et apparition du singulet du groupement Boc (1,40 ppm).

I.3.2. Espaceurs benzyliques (libération par éliminations 1,4 et 1,6)

La fonction alcool, qui permettra ultérieurement la formation de la fonction carbonate avec la sonde, est protégée par un groupement TBDMS selon le **Schéma 65** suivant :



Réactifs et conditions : (i) TBDMSCl, imidazole, THF, TA, 2 h

Schéma 65 : Protection des espaceurs benzyliques

Les groupements TBDMS de la sonde et de l'espaceur diffèrent par la nature des alcools impliqués (phénols vs. alcools primaires). Cette différence structurale pourra être mise à profit pour déprotéger sélectivement l'une ou l'autre des fonctions.

Eléments de détermination structurale :

- **100** RMN ¹H : apparition des signaux du groupement TBDMS (singulets à 0,07 et 0,90 ppm).

- **101** RMN ¹H : apparition des signaux du groupement TBDMS (singulets à 0,08 et 0,92 ppm).

I.3.3. Espaceur cinnamique (libération par élimination 1,8)

La synthèse de ce fragment est plus délicate, car le précurseur commercial est relativement éloigné du produit désiré (**Schéma 66**) :

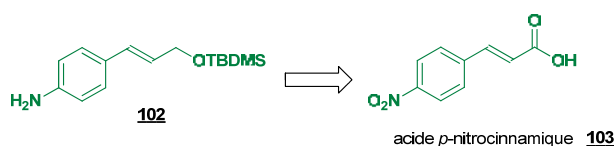
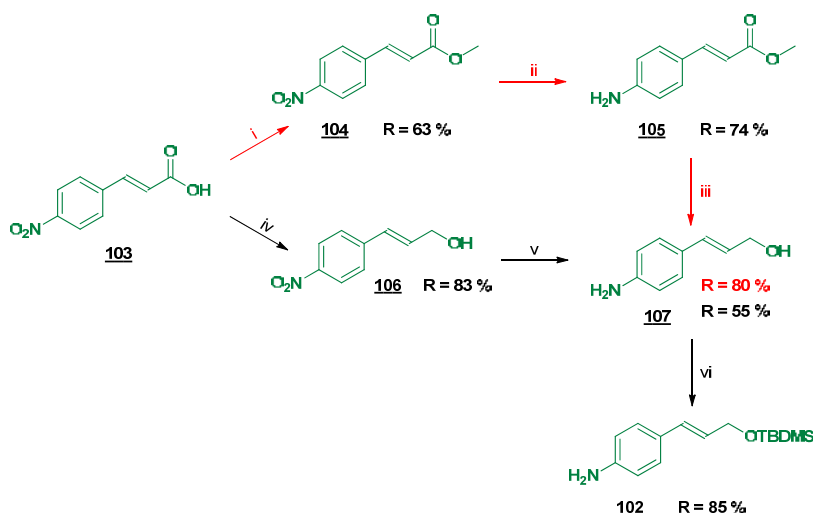


Schéma 66

En effet, l'un des seuls produits commerciaux disponibles en quantités importantes est l'acide *p*-nitrocinnamique. L'obtention de l'aniline **102** implique deux réductions : celle de la fonction acide en alcool et celle du nitrobenzène en aniline. Ces réactions devront également être sélectives vis-à-vis de la double liaison éthylénique. Ainsi, deux voies ont été menées parallèlement afin d'optimiser la synthèse de l'aniline **102** (**Schéma 67**) :



Réactifs et conditions : (i) H₂SO₄, MeOH, TA, 62 h ; (ii) SnCl₂·2H₂O, MeOH, Δ, 30 min ; (iii) LiAlH₄ 1M, THF, 0°C→TA, 1 h → 1 h ; (iv) (a) chloroformiate d'isobutyle, NEt₃, THF, -20°C, 1 h, (b) NaBH₄, H₂O, -20°C, 3 h ; (v) Fe, HCl (cat.), H₂O, EtOH, Δ, 30 min ; (vi) TBDMSCl, imidazole, THF, TA, 1 h

Schéma 67 : Synthèse de l'aniline **102**

➤ Voie « noire »

Cette voie implique la réduction de la fonction acide en alcool suivie de celle du nitrobenzène en aniline. La fonction acide est appauvrie en électrons par la formation *in situ* d'un anhydride mixte, qui est ensuite réduit en alcool par le borohydrure de sodium. L'hydrogénation catalytique n'étant pas envisageable en présence de la double liaison, le dérivé nitré **106** est réduit en aniline **107** par l'action du fer en milieu acide.

Eléments de détermination structurale :

- **106** RMN ¹H : apparition d'un méthylène aliphatique (multiplet à 4,41 ppm).
- **106** RMN ¹³C : absence de signal relatif à un carbonyle.
- **107** RMN ¹H : blindage des signaux aromatiques (de 8,19 à 6,64 ppm et de 7,52 à 7,17 ppm), apparition d'un large singulet à 3,71 ppm (NH₂).

➤ Voie « rouge »

Cette voie implique la réduction du nitrobenzène en aniline puis de la fonction acide (activée par une estérification) en alcool. L'acide commercial de départ est d'abord protégé sous forme de nitroester **104** avant d'être réduit en anilinoester **105** par l'action du chlorure d'étain. La fonction ester est ensuite réduite en présence d'hydruure de lithium aluminium avec un bon rendement en alcool **107**. La protection de ce dernier par un groupement TBDMS génère l'aniline **102** attendue.

Eléments de détermination structurale :

- **104** RMN ^1H : apparition du signal du méthyle de l'ester (singulet à 3,84 ppm).
- **105** RMN ^1H : blindage des signaux aromatiques (de 8,25 à 6,65 ppm et de 7,65 à 7,35 ppm), apparition d'un large singulet à 3,93 ppm (NH_2).
- **107** RMN ^1H : apparition d'un méthylène aliphatique (triplet à 4,27 ppm).
- **107** RMN ^{13}C : absence de signal relatif à un carbonyle.
- **102** RMN ^1H : apparition des signaux du groupement TBDMS (singulets à 0,10 et 0,93 ppm).

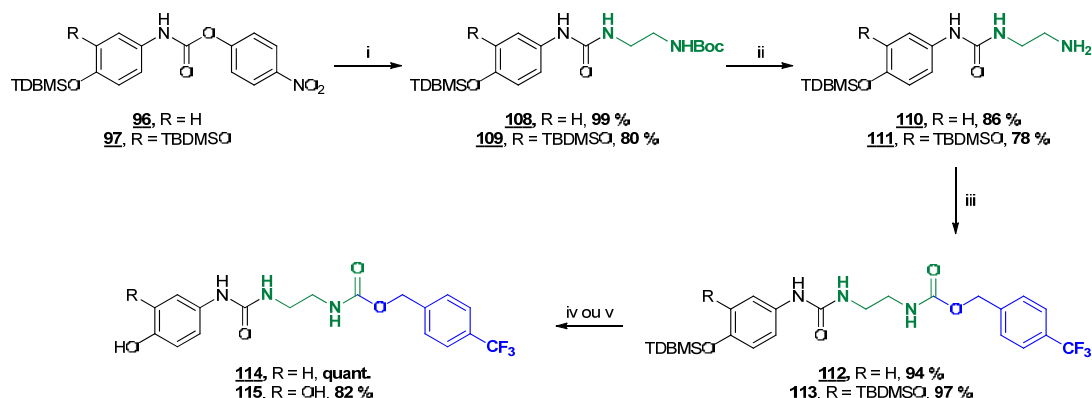
L'aniline **107** obtenue selon la **voie noire** contient même après purification des traces de sels de fer (coloration rouille) et les contraintes matérielles sont plus nombreuses (manipulation à basses températures, étapes (iv)(a) et (b) « one-pot »). Les rendements combinés de formation de l'aniline **107** (37 % vs. 46 %) sont comparables, mais l'étape additionnelle d'estérification (**voie rouge**) pourrait raisonnablement être optimisée pour atteindre un rendement quasi-quantitatif (qui induirait un rendement combiné projeté d'environ 60 %).

II. Synthèse des prosondes

Les différents fragments étant préparés, la synthèse des huit prosondes peut alors être envisagée. La partie substrat doit être couplée dans un premier temps à l'espaceur, et ce dans le but de greffer la sonde en dernière étape. Cette stratégie permettra l'insertion ultérieure aisée d'un principe actif en remplacement de la sonde.

II.1. Prosondes **114** et **115** comportant un espaceur aliphatique

La synthèse de ces prosondes a été réalisée selon la séquence réactionnelle ci-dessous (**Schéma 68**) :



Réactifs et conditions : (i) **99**, NEt₃, CH₂Cl₂, TA, 3 h (R = H) ou 1 h 30 (R = TBDMSO) ; (ii) TFA, CH₂Cl₂, TA, 2 h 30 (R = H) ou 4 h 30 (R = TBDMSO) ; (iii) **98**, NEt₃, CH₂Cl₂, TA, 2 h (R = H) ou 2 h 30 (R = TBDMSO) ; (iv) R = H, TBAF, THF, TA, 2 h ou (v) R = TBDMSO, ACS (cat.), MeOH, TA, 15 h

Schéma 68 : Synthèse des prosondes aliphatiques **114** et **115**

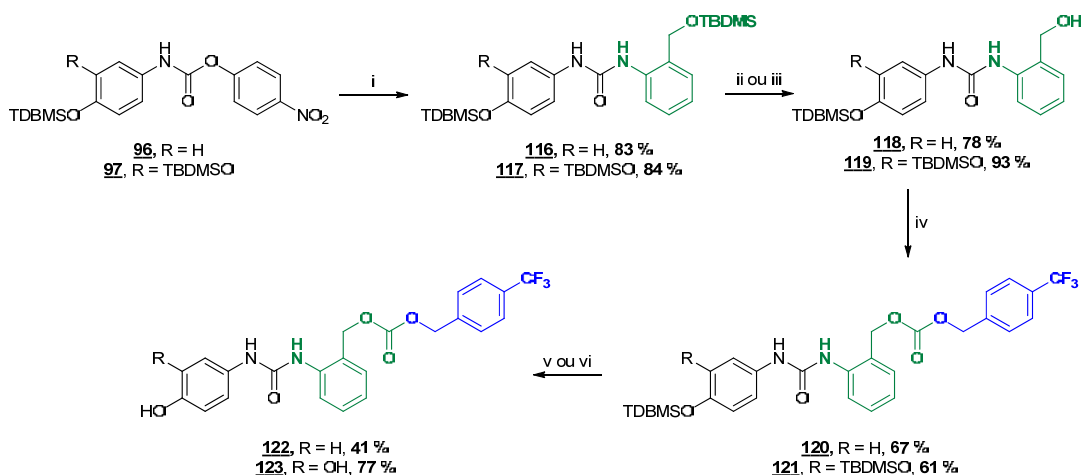
La première étape consiste à coupler le 2-aminoéthylcarbamate de *tert*-butyle **99** avec les carbamates activés **96** et **97** suivant une méthode déjà utilisée pour la synthèse du composé **28** (cf. chapitre 1, paragraphe 1.4.2). Les urées **108** et **109** sont obtenues avec de très bons rendements. La déprotection sélective du groupement Boc par l'acide trifluoroacétique (TFA) est possible grâce à la plus grande stabilité en milieu acide des groupements TBDMS phénoliques comparativement à leurs homologues aliphatiques. Les amines primaires **110** et **111** sont ensuite couplées au carbonate activé de la sonde **98** avec des rendements quasi-quantitatifs. La déprotection du carbamate **112** par le TBAF conduit quantitativement à la prosonde phénol **114**. La réaction impliquant le carbamate **113** dans les mêmes conditions conduit à une forte coloration du milieu réactionnel et une dégradation partielle du produit de départ. Cette coloration indique la formation d'une quinone, probablement en lien avec le milieu basique utilisé. Sur cette base, le TBAF a été remplacé par un acide fort, l'acide camphorsulfonique. Suivant cette méthodologie, la prosonde catéchol **115** est obtenue avec un rendement de 82 %.

Eléments de détermination structurale :

- **108** et **109** RMN ¹H : apparition des signaux de l'espaceur (massif de 3,22 à 3,35 ppm et singulet à 1,41 ppm), disparition des doublets du nitrobenzène.
- **110** et **111** RMN ¹H : disparition du signal du groupement Boc, apparition d'un large singulet (NH₂) à 1,28 ou 1,51 ppm.
- **112** et **113** RMN ¹H : disparition du large singulet (NH₂), apparition des doublets de la sonde (7,42 et 7,57 ppm ou 7,40 et 7,55 ppm).
- **112** et **113** RMN ¹³C : apparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate (156,9 ppm).
- **114** et **115** RMN ¹H : disparition des singulets des groupements TBDMS aromatiques.
- **114** spectrométrie de masse : [M-H]⁻_{th} = 396,12 / [M-H]⁻_{mes} = 396,17.
- **115** spectrométrie de masse : [M-H]⁻_{th} = 412,11 / [M-H]⁻_{mes} = 411,85.

II.2. Prosondes **122** et **123** comportant un espaceur benzylique (élimination 1,4)

La même stratégie de couplages séquentiels utilisée précédemment a été appliquée à la synthèse de ces prosondes :



Réactifs et conditions : (i) **100**, DMAP, CH₂Cl₂, TA, 72 h (R = H) ou 16 h (R = TBDMSO) ; (ii) R = H, TBDMSCl, NaI, H₂O, MeCN, TA, 5 h ou (iii) R = TBDMSO I₂, MeOH, TA, 2 h ; (iv) **98**, DMAP, CH₂Cl₂ (R = H), TA, 24 h ou THF (R = OTBDMS), TA, 5 h 30 ; (v) R = H, TBAF, THF, TA, 2 h ou (vi) R = TBDMSO, ACS (cat.), MeOH, TA, 15 h

Schéma 69 : Synthèse des prosondes **122** et **123**

La nucléophilie plus faible des anilines par rapport aux amines primaires implique une activation supplémentaire par la DMAP pour le couplage de l'aniline **100** aux carbonates activés **96** et **97**. Les urées **116** et **117** ainsi obtenues sont sélectivement déprotégées (groupement TBDMS aliphatique). Les conditions ^[221] appliquées à l'urée **116** (*i.e.* TBDMSCl, NaI, H₂O) conduisent à l'alcool **118** avec un très bon rendement. Cette réaction implique des quantités catalytiques de *tert*-butyldiméthylchlorosilane et d'iodure de sodium en présence d'eau. Les iodures substituent le chlore du silane et le iodosilane ainsi formé est hydrolysé, produisant ainsi de faibles quantités d'acide iodhydrique pour une déprotection quasi-quantitative. En revanche, aucune conversion n'est observée lorsque cette méthode est appliquée à l'urée **117**. La déprotection sélective des dérivés bis-silylés est toutefois envisageable par d'innombrables méthodologies ^[222]. Parmi celles-ci, l'action du diiode dans le méthanol ^[223], dont le mécanisme complexe n'a pas été totalement élucidé, permet d'obtenir l'alcool **119** avec un excellent rendement. Le couplage entre le carbonate activé **98** et les alcools **118** et **119** en présence de DMAP (les alcools primaires étant insuffisamment nucléophiles) conduit aux carbonates **120** et **121**. Lors de la déprotection du carbonate **120** par le TBAF conduisant à la prosonde phénol **122**, le milieu réactionnel s'est fortement coloré comme précédemment pour la prosonde catéchol **115**, expliquant le rendement assez faible. Le carbonate **121** est quant à lui déprotégé efficacement en prosonde catéchol **123** selon les conditions mises au point précédemment (acide camphorsulfonique).

Eléments de détermination structurale :

- **116** et **117** RMN ¹H : apparition des signaux de l'espaceur (massifs en zone aromatique et singulet à 4,67 ou 4,68 ppm), disparition des doublets du nitrobenzène.

[221] Grieco P. A. *et al.*, Selective deprotection of alkyl *t*-butyldimethylsilyl ethers in the presence of aryl *t*-butyldimethylsilyl ethers. *Tet. Lett.* **1999**, *40*, 665-666

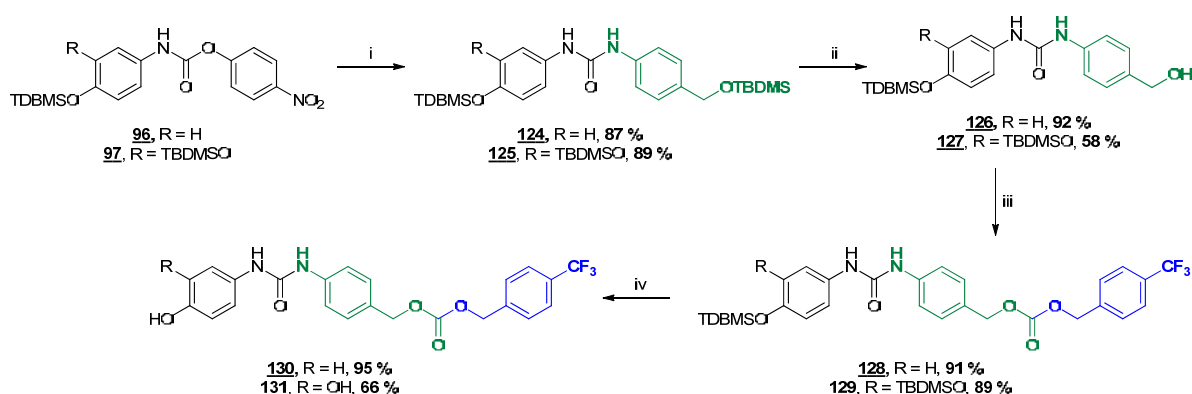
[222] David Crouch R., Selective monodeprotection of bis-silyl ethers. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5833-5871

[223] Lipshutz B. H. *et al.*, Selective deprotection of alkyl vs. aryl silyl ethers. *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 2495-2498

- **118** et **119** RMN ^1H : disparition des singulets du groupement TBDMS aliphatique (0,00 et 0,84 ppm ou à 0,02 et 0,86 ppm).
- **120** et **121** RMN ^1H : apparition des doublets de la sonde (dans un massif de 7,10 à 7,45 ppm et à 7,61 ppm).
- **120** et **121** RMN ^{13}C : apparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate (155,2 ppm).
- **122** et **123** RMN ^1H : disparition des singulets des groupements TBDMS aromatiques.
- **122** spectrométrie de masse : $[\text{M-H}]_{\text{th}}^- = 459,11$ / $[\text{M-H}]_{\text{mes}}^- = 459,05$.
- **123** spectrométrie de masse : $[\text{M-H}]_{\text{th}}^- = 475,11$ / $[\text{M-H}]_{\text{mes}}^- = 475,03$.

II.3. Prosondes **130** et **131** comportant un espaceur benzylique (élimination 1,6)

La synthèse des prosondes **130** et **131** est réalisée selon le **Schéma 70** ci-dessous :



Réactifs et conditions : (i) **101**, DMAP, CH_2Cl_2 , TA, 72 h (R = H) ou 16 h (R = TBDMSO) ; (ii) I_2 , MeOH, TA, 3 h ; (iii) **98**, DMAP, CH_2Cl_2 , TA, 17 h (R = H) ou 4 h (R = TBDMSO) ; (iv) TBAF, THF, 0 °C (R = H), 1 h ou -10 °C (R = TBDMSO), 1 h

Schéma 70 : Synthèse des prosondes **130** et **131**

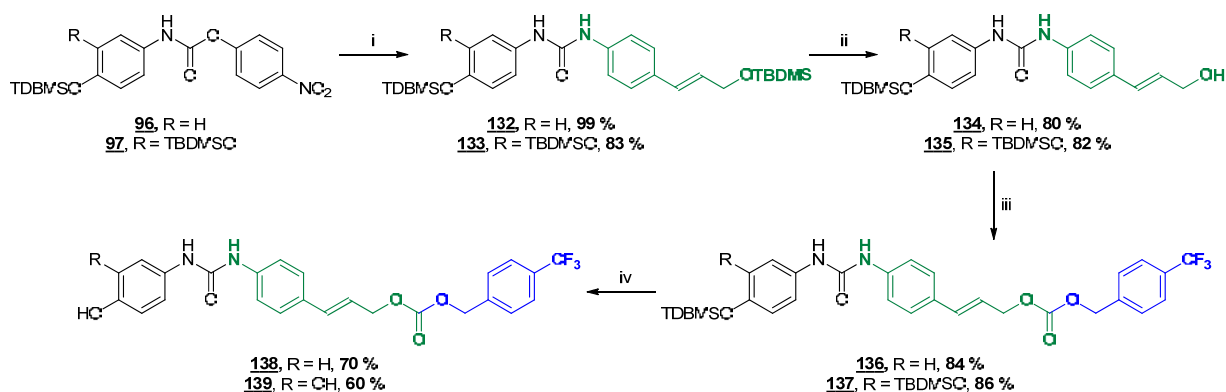
Comme précédemment, les carbamates activés **96** et **97** sont couplés avec l'aniline **101** en présence catalytique de DMAP pour conduire respectivement aux urées **124** et **125**. La déprotection sélective des groupements TBDMS aliphatiques réalisée dans les deux cas par le diiode permet d'accéder aux alcools **126** et **127**. Ces derniers sont traités par le carbonate activé **98** pour générer les carbonates **128** et **129** avec de très bons rendements. La déprotection des groupements TBDMS phénoliques est réalisée par le TBAF à froid pour éviter la forte coloration observée précédemment. Cette baisse de température permet d'augmenter les rendements de formation des prosondes phénol **130** et catéchol **131** sans avoir recours à d'autres réactifs.

Eléments de détermination structurale :

- **124** et **125** RMN ^1H : apparition des signaux de l'espaceur (massif de 7,26 à 7,29 ppm ou de 7,21 à 7,30 ppm et singulet à 4,69 ou 4,68 ppm).
- **126** et **127** RMN ^1H : disparition des singulets du groupement TBDMS aliphatique.
- **128** et **129** RMN ^1H : apparition des doublets de la sonde (7,49 et 7,62 ppm ou 7,48 et 7,62 ppm).
- **128** et **129** RMN ^{13}C : apparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate (154,4 ou 155,0 ppm).
- **130** et **131** RMN ^1H : disparition des singulets des groupements TBDMS aromatiques.
- **130** spectrométrie de masse : $[\text{M-H}]_{\text{th}}^- = 459,12$ / $[\text{M-H}]_{\text{mes}}^- = 459,12$.
- **131** spectrométrie de masse : $[\text{M-H}]_{\text{th}}^- = 475,11$ / $[\text{M-H}]_{\text{mes}}^- = 474,99$.

II.4. Prosondes **138** et **139** comportant un espaceur cinnamique

La synthèse des prosondes **138** et **139** est réalisée suivant le **Schéma 71** ci-dessous :



Réactifs et conditions : (i) **102**, DMAP, CH_2Cl_2 , TA, 3 h (R = H) ou 6 h (R = TBDMSO) ; (ii) InCl_3 , H_2C , THF, MeCN, Δ , 2 h ; (iii) **98**, DMAP, THF, TA, 20 h (R = H) ou 5 h 30 (R = TBDMSO) ; (iv) TBAF, THF, 0 °C (R = H), 2 h ou -10 °C (R = TBDMSO), 1 h 30

Schéma 71 : Synthèse des prosondes **138** et **139**

La première étape de couplage des carbamates activés **96** et **97** avec l'aniline **102** en présence de DMAP conduit aux urées **132** et **133**. La déprotection sélective des groupements TBDMS aliphatiques suivant les conditions réactionnelles précédemment utilisées (TBDMSCl / NaI ou I_2 / MeOH) conduit à la formation de produits non désirés : dégradation multiple dans le premier cas, iodation de la double liaison dans le deuxième. Parmi les différentes conditions réactionnelles décrites pour cette déprotection, nous avons alors opté pour l'utilisation de trichlorure d'indium (InCl_3)^[224]. Cependant, les conditions décrites impliquent un mélange 1 : 1 d'eau et d'acétonitrile, dans lequel les urées **132** et **133** ne sont pas solubles. Un mélange d'eau, d'acétonitrile et de THF dans des proportions égales a donc été utilisé. Ainsi les alcools **134** et **135** sont obtenus avec de bons rendements puis couplés au carbonate activé **98** dans le THF pour conduire aux carbonates **136** et **137**. Ces derniers sont déprotégés suivant les conditions développées pour **128** et **129**, respectivement en prosondes phénol **138** et catéchol **139** avec des rendements satisfaisants.

Eléments de détermination structurale :

- **132** et **133** RMN ^1H : apparition des signaux de l'espaceur (massif de 7,22 à 7,32 ppm ou de 7,23 à 7,33 ppm et signaux caractéristiques de l'alcène), disparition des doublets du nitrobenzène.
- **134** et **135** RMN ^1H : disparition des singulets du groupement TBDMS aliphatique.
- **136** et **137** RMN ^1H : apparition des doublets de la sonde (7,50 et 7,63 ppm).
- **136** et **137** RMN ^{13}C : apparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate (155,0 ppm ou 154,4 ppm).
- **138** et **139** RMN ^1H : disparition des singulets des groupements TBDMS aromatiques.
- **138** spectrométrie de masse : $[\text{M}-\text{H}]_{\text{th}}^- = 485,13$ / $[\text{M}-\text{H}]_{\text{mes}}^- = 485,10$.
- **139** spectrométrie de masse : $[\text{M}-\text{H}]_{\text{th}}^- = 501,13$ / $[\text{M}-\text{H}]_{\text{mes}}^- = 500,98$.

[224] Yadav J. S. *et al.*, A mild and selective cleavage of *tert*-butyldimethylsilyl ethers by indium(III) chloride. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 853-854

II.5. Synthèse de la sonde couplée au vecteur

La synthèse d'une sonde couplée au vecteur a été réalisée en parallèle des sondes précédemment décrites, dans le but de valider la libération de la sonde par action de la tyrosinase en présence d'un substrat plus encombré. Pour ce faire, l'un des espaceurs précédemment développés (*i.e.* sonde catéchol **115** comportant un espaceur aliphatique) a été arbitrairement choisi. La structure de la sonde ainsi envisagée est représentée dans la **Figure 73** ci-dessous :

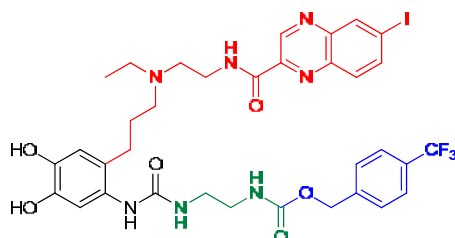


Figure 73 : Structure envisagée de la sonde **115** couplée au vecteur

La position de greffage du vecteur sur le dérivé catéchol est basée sur des travaux antérieurs de MDEPT^[177] qui ont montré qu'un catéchol disubstitué en positions 1 et 6 demeure substrat de la tyrosinase. Un tel dérivé peut être obtenu par nitration de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)propionique en position 6, tandis que la chaîne propionique constituerait le point d'attache du vecteur (**Schéma 72**) :

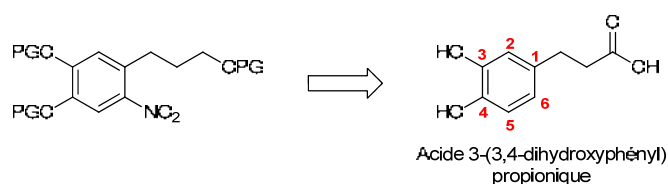


Schéma 72 : Synthèse permettant l'introduction du vecteur

II.5.1. Rétrosynthèse

La voie rétrosynthétique choisie se base sur les travaux précédemment réalisés, avec la même stratégie de couplages séquentiels (*cf.* **Schéma 73**) :

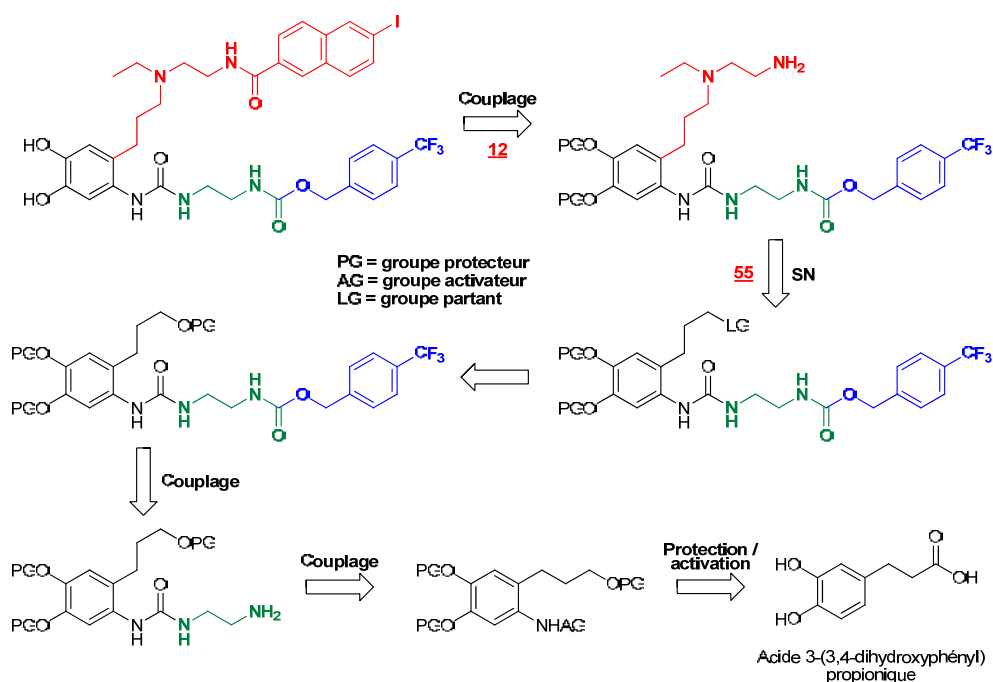
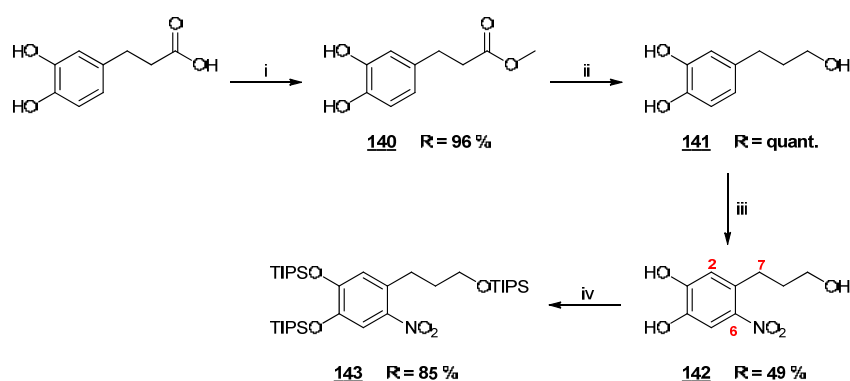


Schéma 73 : Rétrosynthèse de la sonde vectorisée

Les premières étapes consistent à protéger l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)propionique puis à le fonctionnaliser par la nitration précédemment évoquée suivie d'une réduction. L'aniline ainsi générée sera activée pour permettre une séquence réactionnelle de couplage de l'espaceur puis de la sonde, identique à celle employée pour la synthèse de la sonde catéchol **115**. L'incorporation du vecteur sur la chaîne propionique sera réalisée en trois étapes finales : la diamine **55** précurseur de l'amine tertiaire du vecteur et comportant une amine primaire masquée sera d'abord insérée sur la chaîne propionique puis le noyau quinoxaline sera couplé par formation de la fonction amidique avec l'ester activé **12** précédemment utilisé.

II.5.2. Synthèse

La première séquence réactionnelle est représentée par le Schéma 74 suivant :



Réactifs et conditions : (i) SOCl_2 , MeOH, TA, 4 h ; (ii) LiAlH_4 , THF, TA, 3 h ; (iii) NaNO_2 , H_2SO_4 , H_2O , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$, 15 h ; (iv) TIPSOTf, imidazole, THF, TA, 15 h

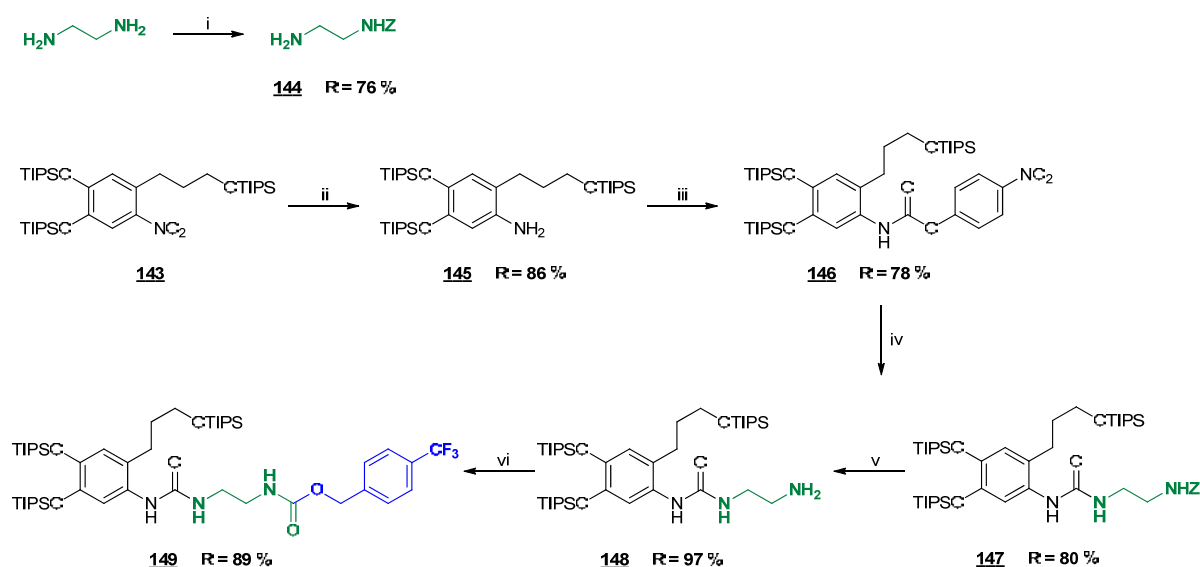
Schéma 74 : Fonctionnalisation et protection de la partie substrat

La première étape consiste à estérifier l'acide carboxylique du produit de départ *via* le chlorure d'acide correspondant formé *in situ* dans le méthanol. L'ester méthylique **140** est réduit par l'action de l'hydruure de lithium aluminium (LiAlH₄). Ces deux réactions quasi-quantitatives permettent la préparation d'une large quantité d'alcool **141** en vue de l'étape suivante de nitration. En effet, le rendement de cette réaction réalisée par action du nitrite de sodium en présence d'acide sulfurique est très limité. Ce résultat peut être expliqué par l'activation de toutes les positions du cycle aromatique par les fonctions phénols, induisant la formation d'isomères nitrés, ainsi que par la possible déshydratation de l'alcool primaire. La protection des trois groupements hydroxyles libres du nitrocatéchol **142** est effectuée par un groupement silylé : en raison du grand nombre d'étapes, le groupement TIPS a cette fois été préféré pour sa plus grande robustesse par rapport au groupement TBDMS. Le dérivé *tris*-silylé **143** est ainsi obtenu avec un bon rendement.

Eléments de détermination structurale :

- **140** RMN ¹H : apparition du singulet du méthyle de l'ester (3,57 ppm).
- **141** RMN ¹H : apparition d'un méthylène supplémentaire (triplet dédoublé à 3,38 ppm), disparition du singulet du méthyle de l'ester.
- **141** RMN ¹³C : disparition du signal du carbonyle de l'ester.
- **142** RMN ¹H : présence de deux singulets aromatiques intégrant chacun pour un proton (6,73 et 7,46 ppm).
- **142** RMN HMBC : couplages du carbone en position 6 (139,2 ppm) avec le proton en position 2 (6,73 ppm) et avec les protons en position 7 (2,76 ppm).
- **142** spectrométrie de masse : [M-H]⁻_{th} = 212,05 / [M-H]⁻_{mes} = 211,92.
- **143** RMN ¹H : apparition des signaux des groupements TIPS (multiplet intégrant pour 63 protons de 1,06 à 1,36 ppm).

L'espaceur puis la sonde ont ensuite été couplés suivant la voie décrite dans le **Schéma 75** ci-dessous :



Réactifs et conditions : (i) chloroformiate de benzyle, CH₂Cl₂, TA, 2 h (ii) H₂ 1 atm, Pd/C 10%, EtCH, TA, 20 h ; (iii) chloroformiate de *p*-nitrophényle, pyridine, THF, TA, 4 h ; (iv) **144**, NEt₃, THF, TA, 2 h ; (v) H₂ 1 atm, Pd/C 10%, EtCH, TA, 1 h 30 ; (vi) **98**, NEt₃, CH₂Cl₂, TA, 18 h

Schéma 75 : Introduction de l'espaceur auto-clivable et de la sonde

Le dérivé *tris*-silylé **143** est hydrogéné en aniline **145** en présence catalytique de palladium, puis converti en carbamate activé **146** par action du chloroformiate de *p*-nitrophényle, selon la même méthode utilisée pour la synthèse des carbamates activés **96** et **97** (évitant la formation de dimère). En parallèle, la monoprotection de l'éthylène diamine par un carbamate de benzyle est assurée par une addition lente (4 h) et conduit à l'amine primaire **144**. Celle-ci est ensuite couplée au carbamate activé **146** pour former l'urée **147**. La déprotection de cette dernière par hydrogénation catalytique conduit avec un excellent rendement à l'amine primaire **148**, couplée avec le carbonate activé de la sonde **98** pour obtenir le carbamate **149**.

Eléments de détermination structurale :

- **144** RMN ^1H : apparition des signaux du groupement benzyle (singulet à 5,09 ppm, massif de 7,29 à 7,36 ppm), large singulet (NH_2) à 1,37 ppm.
- **145** RMN ^1H : glissement vers les champs forts des signaux aromatiques (de 6,71 à 6,52 ppm et de 7,60 à 6,21 ppm), apparition du large singulet (NH_2) à 3,44 ppm.
- **146** RMN ^1H : apparition des doublets du *p*-nitrobenzène (7,32 et 8,27 ppm).
- **147** RMN ^1H : apparition des signaux de l'espaceur (massif de 3,23 à 3,32 ppm, singulet à 5,06 ppm et massif de 7,30 à 7,32 ppm) et disparition des doublets du *p*-nitrobenzène.
- **148** RMN ^1H : disparition des signaux du groupement benzyle, apparition d'un large singulet (NH_2) à 1,26 ppm.
- **149** RMN ^1H : apparition des deux doublets en zone aromatique de la sonde (7,44 et 7,59 ppm).
- **149** RMN ^{13}C : apparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate (156,5 ppm).

L'introduction du vecteur est réalisée selon la séquence réactionnelle suivante (**Schéma 76**) :

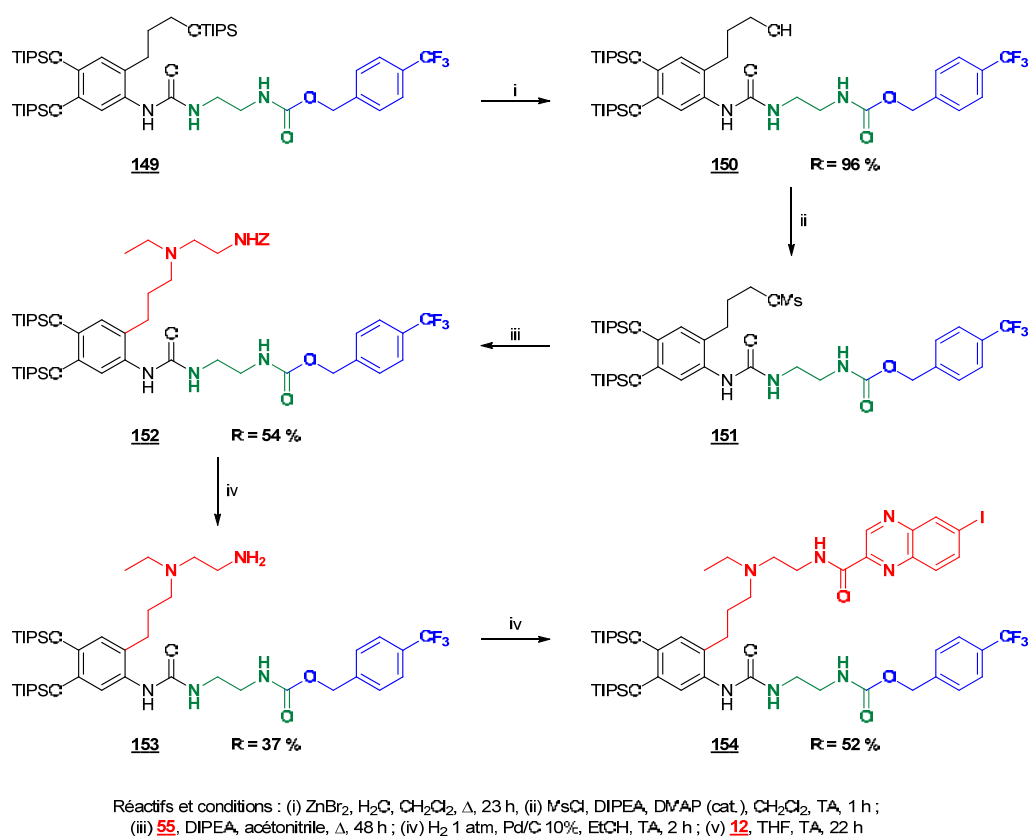


Schéma 76 : Séquence réactionnelle finale de la synthèse de la prosonde protégée **154**

Les différentes conditions réactionnelles utilisées pour la déprotection des groupements TBDMS aliphatiques ne peuvent s'appliquer ici au clivage des groupement TIPS plus robustes. Parmi les nombreuses méthodes décrites dans la littérature, l'action d'un excès de bromure de zinc ($ZnBr_2$) et d'eau dans le dichlorométhane à reflux ^[225] a été choisie. Dans ces conditions, l'alcool **150** est isolé avec un très bon rendement. Une fois encore, le choix des organosilanes comme groupements protecteurs s'est révélé judicieux grâce à la grande variété des conditions réactionnelles existant pour leur déprotection. L'alcool **150** est ensuite converti en mésylate **151** avec un rendement quantitatif.

Eléments de détermination structurale :

- **150** RMN 1H : le massif des groupements TIPS (de 1,07 à 1,28 ppm) intègre 42 protons.
- **151** RMN 1H : apparition du singulet de la fonction mésylate (3,02 ppm), déblindage du signal du méthylène lié au mésylate (de 3,55 à 4,21 ppm).

Le vecteur n'est pas greffé par substitution nucléophile directe de l'amine secondaire **13**, en raison de sa réactivité très limitée observée à plusieurs reprises, en particulier sur des substrats encombrés comme c'est le cas ici. Il a donc été introduit en trois étapes *via* l'amine secondaire **55** déjà disponible. La réaction de substitution nucléophile avec le mésylate **151** dans l'acétonitrile à reflux génère l'amine tertiaire **152** dont le carbamate de benzyle est déprotégé par hydrogénation catalytique en amine primaire **153**. Le rendement assez moyen s'explique par le clivage partiel du benzyle de la sonde par l'hydrogénation, malgré sa désactivation par le groupement trifluorométhyle. Un temps de réaction plus court devrait permettre une amélioration du rendement. L'amine primaire **153** est alors couplée à l'ester activé **12** pour conduire à la prosonde protégée **154**. Le catéchol étant sujet à oxydation, la déprotection dans des conditions acides sera réalisée juste avant évaluation.

Eléments de détermination structurale :

- **152** RMN 1H : disparition du singulet du mésylate, apparition des signaux de la chaîne du vecteur (massifs aliphatiques) et du groupement benzyle (singulet à 5,04 ou 5,08 ppm et massif de 7,16 à 7,35 ppm).
- **153** RMN 1H : disparition des signaux du groupement benzyle.
- **153** RMN ^{13}C : disparition du signal du carbonyle de la fonction carbamate.
- **154** RMN 1H : apparition des signaux aromatiques caractéristiques du noyau quinoxaline.

[225] Crouch R. D. *et al.*, Deprotection of silyl ethers using $ZnBr_2$ and H_2O in CH_2Cl_2 . *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 7151-7153

II.6. Conclusions sur la synthèse des prosondes

Dans ce chapitre, les neuf molécules envisagées, dont les structures sont résumées **Figure 74** ont été synthétisées :

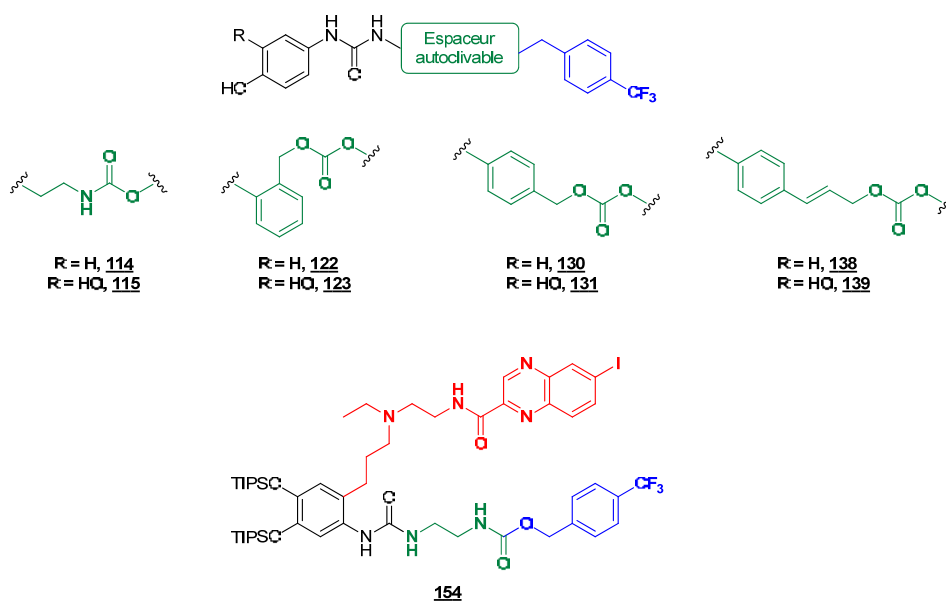


Figure 74 : Résumé des prosondes synthétisées

Les voies de synthèse mises au point ont permis d'accéder aux différentes prosondes avec les rendements globaux indiqués ci-dessous :

- Prosonde aliphatique phénol **114** : 60 %, 8 étapes.
- Prosonde aliphatique catéchol **115** : 36 %, 9 étapes.
- Prosonde benzylique (1,4) phénol **122** : 13 %, 8 étapes.
- Prosonde benzylique (1,4) catéchol **123** : 26 %, 9 étapes.
- Prosonde benzylique (1,6) phénol **130** : 46 %, 8 étapes.
- Prosonde benzylique (1,6) catéchol **131** : 19 %, 9 étapes.
- Prosonde cinnamique phénol **138** : 11 %, 11 étapes.
- Prosonde cinnamique catéchol **139** : 8 %, 12 étapes.
- Prosonde aliphatique vectorisée **154** : 0,7 %, 20 étapes (7 %, 17 étapes avant introduction du vecteur).

L'accès à ces prosondes avec des rendements globaux satisfaisants a été facilité par la construction de voies de synthèse générales transposables à partir de nombreux synthons communs. Dans ces voies, les étapes susceptibles d'être limitantes étaient principalement celles de déprotection. La grande maniabilité et l'importante diversité des conditions de déprotection sélective des dérivés *bis*-silylés ont ainsi constitué les clés de cette réussite.

Les différentes prosondes synthétisées seront l'objet d'un « pré-screening » par l'évaluation *in vitro* de la libération de la sonde par l'action de la tyrosinase. Les résultats obtenus permettront de choisir l'espaceur et le type de substrat (phénol ou catéchol) le plus adapté à notre stratégie de vectorisation, suivant divers paramètres cinétiques.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse ont porté sur la synthèse et l'évaluation de prodrogues vectorisées à espaceur clivable dans le cadre d'une stratégie de chimiothérapie des mélanomes pigmentés. La vectorisation est assurée par un traceur développé au laboratoire, ICF01012, ayant démontré une affinité spécifique pour les mélanines. Les prodrogues synthétisées incluent cet édifice vecteur, un principe actif anticancéreux et un espaceur clivable. Le principe actif, la (+)-5-iodo-2'-déoxyuridine (IUdR), a été choisi pour ses caractéristiques compatibles avec les différentes évaluations *in vitro* et *in vivo* envisagées, et pour son aptitude à être un modèle bien adapté pour une preuve de concept de ces prodrogues vectorisées.

Dans un premier temps, ont été choisis des espaceurs constitués par des fonctions simples (ester, acétal, carbamate et carbonate), clivables selon différents mécanismes pour la libération du principe actif : action enzymatique ou effet du pH intramélanosomal. Les séquences réactionnelles permettant d'accéder aux prodrogues correspondantes ont été réalisées en suivant au maximum un schéma rétrosynthétique général incluant deux approches inversant les principales étapes, l'espaceur pouvant être couplé en premier lieu au vecteur puis au principe actif, ou inversement. Toutefois, ces voies d'accès des prodrogues ont fait l'objet d'adaptations et de mises au point en fonction des problèmes rencontrés, spécifiquement pour chaque espaceur impliqué. Finalement, les prodrogues de première génération (« ester » **1**, « acétal » **2**, « carbamate » **3** et « carbonate » **4**) ont été synthétisées en suivant des séquences réactionnelles bien différentes : le nombre d'étapes varie ainsi de 4 à 7, et les rendements combinés de 7 à 34 %.

La stabilité de ces prodrogues, la libération du principe actif et la vectorisation ont été évaluées par des études (i) de stabilités physico-chimique et métabolique, puis (ii) de biodistribution *in vivo*. Les études de stabilités physico-chimiques ont permis d'écarter des espaceurs trop fragiles (fonction ester) ou au contraire trop stables (fonctions carbamate, stable dans l'ensemble des milieux testés et acétal, non clivée à pH = 3). L'amine tertiaire impliquée dans la liaison entre le vecteur et l'espaceur a été identifiée par les expériences *in vitro* sur les microsomes hépatiques murins comme étant le principal point de fragilité métabolique des structures, conduisant à la dissociation prématurée du principe actif de l'édifice vecteur. Cette observation a été corrélée aux résultats des expériences *in vivo*, indiquant clairement une métabolisation très rapide associée à une absence de distribution tumorale spécifique des prodrogues « acétal » **2** et « carbamate » **3**.

Suite aux premières évaluations exposées ci-dessus, des pharmacomodulations pertinentes ont été envisagées. Ainsi, une seconde génération de prodrogues, « cétal » **40**, « acétal PEG₆ » **41** et « acétal PEG₁₀ » **42** a été synthétisée pour tenter d'améliorer les divers paramètres précédemment soulevés : la fonction cétal, pour favoriser une libération du principe actif en milieu acide, et les espaceurs pegylés pour limiter le métabolisme de la fonction amine tertiaire, talon d'Achille de ces structures. Les voies d'accès de ces prodrogues de deuxième génération ont été basées sur celles mises au point lors de la synthèse des prodrogues de première génération. Elles ont toutefois fait l'objet d'ajustements en raison des contraintes synthétiques rencontrées. Ces difficultés ont par ailleurs conduit à développer des méthodologies alternatives voire innovantes, à l'exemple de la méthode de formation des hydroxyvinylethers protégés selon une synthèse en trois étapes « one-pot ».

L'évaluation de la deuxième génération de prodrogues a été réalisée comparativement à la prodrogue-mère « acétal » **2**. Les modifications structurales apportées ayant conduit à la prodrogue « cétal » **40** ont permis d'améliorer la libération du principe actif en milieu faiblement acide (pH = 6). L'insertion d'espaceurs pegylés a induit une stabilité métabolique *in vitro* accrue, confirmée par les expériences *in vivo* qui indiquent une distribution plus sélective au niveau tumoral, en particulier dans le cas de la prodrogue « acétal PEG₆ » **41**.

Globalement, ces deux générations de prodrogues ont permis de déterminer deux espaceurs d'intérêt : la fonction cétal (prodrogue **40**), compatible avec une libération sélective dans les tissus tumoraux ou organelles acides et la fonction carbonate (prodrogue **4**, temps de demi-vie en milieux physiologiques compatibles avec notre approche). Le bénéfice apporté par l'insertion d'une chaîne pegylée courte (6 chaînons) a également été démontré par les expériences menées *in vitro* comme *in vivo*.

De plus, les tendances tirées des expériences *in vitro* sur microsomes hépatiques murins ont toujours été corrélées aux observations issues des expériences de biodistribution *in vivo*. Ainsi, cet outil que nous pouvons qualifier de « prédictif » est désormais disponible au laboratoire et permettra un premier « screening » de futures prodrogues vectorisées, avant l'engagement systématique d'expériences *in vivo* lourdes en temps humains et matériels.

De manière générale, l'étude des sept prodrogues synthétisées a confirmé que l'adressage tumoral spécifique d'un principe actif grâce au vecteur ICF01012 semble envisageable, en tenant compte cependant de l'important métabolisme des conjugués. En effet, une perte de vectorisation due à la dissociation du principe actif de l'édifice vecteur a été mise en évidence, liée à la fragilité *in vivo* de l'amine tertiaire. En tenant compte de ces acquis, une nouvelle génération de prodrogues associant l'IUdR au vecteur ICF01012 fonctionnalisée cette fois-ci sur la partie aromatique, mérite d'être synthétisée et étudiée. Concernant les espaceurs, la fonction cétal s'avère judicieuse pour une libération sélective au niveau tumoral, tandis que l'insertion de chaînes pegylées permet d'augmenter la stabilité métabolique. Les structures des futures prodrogues vectorisées ainsi envisagées sont représentées dans la **Figure 75** suivante :

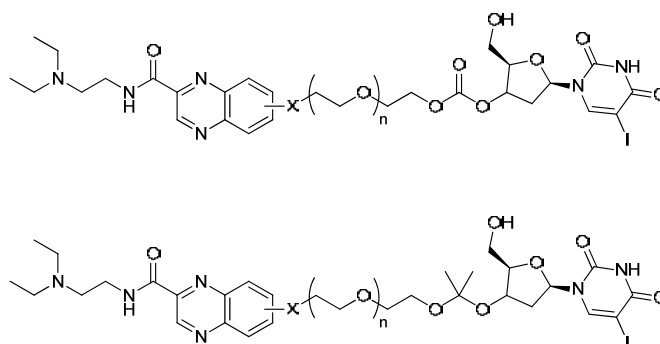


Figure 75 : troisième génération de prodrogues envisagée

Afin de concevoir des prodrogues doublement spécifiques de la tumeur (par leur distribution et par leur activation), le développement d'espaceurs auto-clivables activés par l'action de la tyrosinase a été initié et constitue le deuxième volet décrit dans ce manuscrit. L'approche de ce concept a été fondée sur : (1) la synthèse de « prosondes » constituées par un motif substrat (phénol ou catéchol), un espaceur auto-clivable et une sonde, afin de sélectionner l'espaceur le plus pertinent par l'étude de la libération de la sonde par la tyrosinase, (2) l'insertion du vecteur et l'évaluation de la libération à partir d'un substrat plus encombré, (3) le remplacement de la sonde par l'IUdR et l'évaluation *in vitro* puis *in vivo* des prodrogues correspondantes.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont consisté en la synthèse des huit prosondes **114**, **115**, **122**, **123**, **130**, **131**, **138** et **139** impliquant quatre espaceurs différents, le substrat étant décliné en version phénol ou catéchol pour chaque espaceur (étape 1), et de la prosonde vectorisée **154** (étape 2). Les voies de synthèse ont été conçues dans le but de simplifier au maximum l'insertion du vecteur et d'un principe actif anticancéreux pertinent. L'introduction d'autres espaceurs est également possible, les voies d'accès des prosondes impliquant des synthons communs. Les différentes étapes synthétiques ont mis en jeu des réactions conduisant à de hauts rendements globaux : de 8 à 60 % pour un nombre d'étapes variant de 8 à 12. La synthèse de la prosonde vectorisée, plus complexe et réalisée à la fin de cette thèse, pourra encore faire l'objet d'optimisation, en particulier pour les dernières étapes, relatives à l'introduction du vecteur (0,7 % de rendement combiné en 20 étapes contre 7 % après 17 étapes).

L'évaluation *in vitro* de ces prosondes par l'étude de la libération de la sonde (par suivi RMN ¹⁹F et/ou HPLC-UV-MS) permettra de sélectionner l'espaceur le plus efficace. L'influence de la présence du vecteur sur la libération de la sonde sera également vérifiée par l'évaluation de la prosonde vectorisée **154** qui inclut un des espaceurs auto-clivables étudiés par ailleurs. Après validation du concept, les synthèses de prodrogues de l'IUdR activables par la tyrosinase (**Figure 76**) seront réalisées et les conjugués évalués *in vitro* dans le but de valider la libération enzymatique du principe actif puis *in vivo* pour évaluer en premier lieu leur biodistribution et dans un second temps la libération enzymatique de l'IUdR et son incorporation à l'ADN des cellules tumorales.

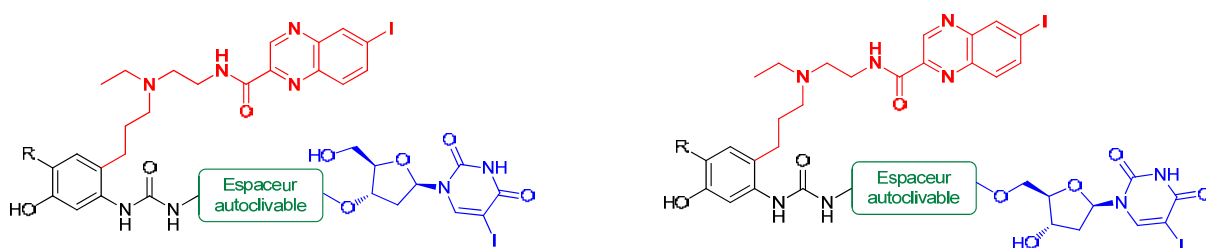


Figure 76 : prodrogues activables par la tyrosinase

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés constitue l'initiation et le point de départ d'une approche nouvelle, à plusieurs facettes, développée au sein de la thématique Thérapie Vectorisée de l'unité. Ces résultats, bien que relativement décevants *in vivo* ont toutefois conduit à l'identification des facteurs limitants de la stratégie adoptée et permettent ainsi d'envisager de nouvelles stratégies. Les outils et les méthodes d'évaluation (stabilité métabolique, tyrosinase), de même que des voies de synthèse robustes et transposables sont en place pour les futures études concernant la conception de prodrogues appliquées à la chimiothérapie vectorisée du mélanome.

PARTIE

EXPERIMENTALE

MATERIELS

ET

METHODES

Généralités pour les synthèses

- Les réactifs commerciaux utilisés pour les synthèses ont été fournis par Sigma-Aldrich, ThermoFischer, Alfa Aesar ou TCI Europe et utilisés sans purification. Les solvants usuels (cyclohexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane, pentane, acétone, éther éthylique, THF, toluène, éthanol et méthanol) ont été fournis par Carlo Erba ou VWR.

- Les solvants utilisés dans les réactions nécessitant un milieu anhydre ont été achetés (DMF) ou distillés avant usage sur sodium / benzophénone (THF) et sur CaH₂ (CH₂Cl₂). L'acétonitrile a été préalablement séché sur K₂CO₃ puis distillé et stocké sous argon sur tamis moléculaire 3 Å. Le toluène a été préalablement séché sur tamis moléculaire 4 Å, distillé puis stocké sous argon sur tamis moléculaire 4 Å. Le méthanol et l'éthanol ont été distillés et stockés sous argon sur tamis moléculaire (respectivement 3 et 4 Å). Les amines (NEt₃, DIPEA, pyridine) ont été préalablement séchées sur KOH, distillées puis stockées sous argon sur pastilles de KOH.

- Les **chromatographies sur couche mince** (CCM) ont été réalisées sur plaques de gel de silice Merck ou SDS 60F₂₅₄ déposé sur support aluminium ou polymère analytique. Elles ont été révélées à l'UV (254 nm) et/ou selon la nature des composés, au permanganate de potassium (général), à la ninhydrine (amines primaires et secondaires), à l'acide phosphomolybdique (général), au *p*-anisaldéhyde (général) ou au vert de bromocrésol (dérivés acides).

- Les **chromatographies sur colonne** ont été réalisées sur gel de silice flash Merck Si 60 (40-63 µm) ou SDS 60A (35-70 µm), ou avec du gel d'oxyde d'aluminium 90 standardisé. Les chromatographies flash ont été réalisées à l'aide d'une pompe péristaltique, avec un mélange d'élution dont la composition correspond à celle utilisée pour la valeur de R_f renseignée dans les modes opératoires.

- Les spectres de **résonance magnétique nucléaire** (RMN) ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AC-200 (¹H : 200 MHz, ¹³C : 50 MHz) ou sur un appareil BRUKER AVANCE 400 (¹H : 400 MHz). Le solvant deutéré utilisé est indiqué pour chaque produit. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm (partie par million) et sont calibrés par rapport au pic résiduel du solvant utilisé. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en hertz (Hz). Les multiplicités sont notées : **s** (singulet), **ls** (large singulet), **d** (doublet), **dd** (doublet dédoublé), **ddd** (doublet dédoublé dédoublé), **t** (triplet), **td** (triplet dédoublé), **q** (quadruplet), **Q** (quintuplet), **m** (multiplet).

- Les **spectres infra-rouge** (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre FTIR Nicolet Impact 410 ou sur un spectrophotomètre FT Vector 22.

- Les **spectres de masse** (IES-SM) ont été enregistrés par ionisation électrospray sur un spectromètre de masse Esquire-LC 000800 en mode positif ou négatif selon la nature des composés.

- Les **points de fusion** ont été mesurés sur un banc Köfler (Wagner et Munz, Heizbank, système Köfler)

Études de stabilités physico-chimiques par CLHP

Dans cette partie, les milieux étudiés pour les études de stabilité sont désignés par le terme « matrice ». Le protocole expérimental général de ces études est donné par la suite.

Matériel :

- Colonne CLHP : Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 4,6 x 150 mm, 5 µm
- Plasma humain : EFS Auvergne Loire (25 Bd Pasteur 42100 Saint Etienne), lot 10C19L01
- PBS : Phosphate Buffer Saline PAN Boitech GmbH, lot 9710809
- MEM-Glutamax complet : GIBCO Life Technologie

Préparation de la solution d'étalon interne (Sol. EI) :

L'étalon interne (l'acide *p*-hydroxybenzoïque) est dissout dans 25 mL d'éthanol à 0,5 mg.mL⁻¹.

Préparation des solutions mères (Sol. mère) :

Les prodrogues étudiées sont dissoutes dans 10 mL d'acétonitrile à une concentration de 2 mmol.L⁻¹. Ces solutions sont passées aux ultrasons quand nécessaire.

Préparation des solutions filles (Sol. A) :

Les solutions mères précédemment obtenues sont diluées au 1/10 avec de l'acétonitrile.

Préparation des points de gamme d'étalonnage :

Les échantillons étalons sont préparés de la manière suivante dans des vials de 1,5 mL :

	Matrice (µL)	Sol. mère 2 mM (µL)	Sol. A 0,2 mM (µL)	Sol. EI 0,5 mg.mL ⁻¹ (µL)	Acétonitrile (µL)
G0 Blanc matrice	200	0	0	25	375
G1 10 nmol.mL⁻¹	200	0	50	25	325
G2 25 nmol.mL⁻¹	200	0	125	25	250
G3 50 nmol.mL⁻¹	200	0	250	25	125
G4 75 nmol.mL⁻¹	200	0	375	25	0
G5 100 nmol.mL⁻¹	200	50	0	25	325

A tous ces échantillons sont ajoutés 400 µL de milieu permettant la « trempe » cinétique, et selon la matrice étudiée, des préparations additionnelles sont nécessaires avant l'injection des échantillons en CLHP :

- **Tampons** : les échantillons sont agités 5 minutes avec un agitateur longitudinal à vitesse 200 puis placés dans un réducteur pour vial. Ils sont ensuite injectés et analysés en CLHP.
- **Plasma et milieu de culture** : les échantillons sont agités pendant 15 minutes avec un agitateur longitudinal à vitesse 200, centrifugés pendant 10 minutes à vitesse 6, filtrés sur filtre 4 mm Téflon (porosité 0,45 µm) puis placés dans un réducteur pour vial. Ils sont ensuite injectés et analysés en CLHP.

Préparation des échantillons pour la cinétique de stabilité :

Pour chaque matrice 1,25 mL de solution mère à 2 mmol.mL⁻¹ sont dilués dans un tube à hémolyse en verre dans QSP 5 mL de matrice, à une concentration de 500 µmol.mL⁻¹, puis les tubes à hémolyse bouchés sont placés à l'étuve (37 °C). Aux temps déterminés les tubes à hémolyse sont retirés de l'étuve, homogénéisés par vortex et 200 µL sont prélevés et placés dans un vial de 1,5 mL. Dans ces vials sont ajoutés 25 µL de sol. EI, 375 µL d'acétonitrile et 400 µL du milieu permettant la « trempe » cinétique. Selon la matrice étudiée, des préparations additionnelles sont nécessaires avant l'injection des échantillons en CLHP :

- **Tampons** : les échantillons sont agités 5 minutes avec un agitateur longitudinal à vitesse 200 puis placés dans un réducteur pour vial. Ils sont ensuite injectés et analysés en CLHP (concentration finale : 100 µmol.mL⁻¹).

- **Plasma et milieu de culture** : les échantillons sont agités pendant 15 minutes avec un agitateur longitudinal à vitesse 200, centrifugés pendant 10 minutes à vitesse 6, filtrés sur filtre 4 mm Téflon (porosité 0,45 µm) puis placés dans un réducteur pour vial. Ils sont ensuite injectés et analysés en CLHP (concentration finale : 100 µmol.mL⁻¹).

Etudes de stabilité métabolique par CLHP-MS²

Les prodrogues étudiées sont incubées pendant différents temps avec :

- des microsomes hépatiques murins MIC255028 (28 mg.mL⁻¹) (**MM**).
- des microsomes hépatiques murins MIC255028 (28 mg.mL⁻¹) inactivés par chauffage à 100 °C pendant 5 minutes (**MI**).
- le milieu réactionnel : tampon phosphate 100 mM (pH = 7,4), glutathion, NADPH/H⁺ 1 mM (**MR**).

Préparation de la solution d'étalon interne (Sol. EI) :

L'étalon interne (l'acide *p*-hydroxybenzoïque) est dissout dans 25 mL d'éthanol à 0,5 mg.mL⁻¹.

Préparation des solutions mères (Sol. mère) :

Les prodrogues étudiées sont dissoutes dans du THF à une concentration de 10 mM.

Préparation des échantillons pour la cinétique de stabilité :

Les échantillons sont préparés de la manière suivante dans des vials de 1,5 mL :

	Sol. mère 10 mM (μL)	NADPH, H⁺ 20 mM (μL)	MM 28 mg.mL⁻¹ (μL)	MI 28 mg.mL⁻¹ (μL)	Tampon 100 mM (μL)
Contrôle MR	5	50	0	0	945
Contrôle MI	5	50	0	35	910
Etude	5	50	35	0	910

Les échantillons sont incubés à 37 °C et aux temps déterminés, 1 mL d'éthanol est ajouté. Les vials sont ensuite centrifugés (11000 g) pendant 5 minutes à 4 °C, le surnageant est prélevé et le solvant est évaporé (Speed-Vac, conditions Hi-Speed). Les échantillons sont ensuite conservés à -80 °C avant la préparation des échantillons CLHP.

Evaluations in vivo

Ces études ont été réalisées après accord du Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale en Auvergne (CEMEAA, saisine agréée sous le numéro d’enregistrement CE18-09), dans le cadre défini par la législation relative à l’expérimentation animale. Le modèle utilisé est un modèle de souris C57Bl6J âgées de 6 semaines porteuses sur le flanc de xénogreffes de tumeur de mélanome murin B16F0. La lignée cellulaire utilisée pour l’induction de la tumeur provient de l’American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules sont décongelées et cultivées dans le milieu D-MEM Glutamax, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Puis, après trypsination, une suspension cellulaire est préparée (3.10^6 cellules / mL de PBS) et inoculée aux animaux par voie sous-cutanée à raison de 300 000 cellules sur le flanc droit de chaque animal. Après dix jours, les tumeurs sont palpables et mesurables avec un pourcentage de prise de 98-100%. Après 14 jours de croissance tumorale, les prodrogues radiomarquées à l’iode 125 sont injectées aux animaux par voie intraveineuse (100 μ Ci par animal dans la veine caudale) après reprise dans le sérum physiologique contenant 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d’éthanol. La localisation tumorale sur le flanc permet une quantification aisée de la fixation par imagerie γ plane.

L’imagerie par tomographie d’émission monophotonique (TEMP) corps entier des animaux est réalisée à différents temps après injection du radiotracer (1 h, 3 h et 24 h) par γ caméra dédiée petit animal de type γ IMAGER® (Biospace Mesures, Paris, cristal CsI(Na), épaisseur 4 mm x 120 mm diamètre, photomultiplicateur Hamamatsu R3292r, champ de vision de 10 cm), équipée d’un collimateur parallèle. Une acquisition de 10 minutes en mode planaire, avec une fenêtre en énergie réglée sur $35 \text{ keV} \pm 20\%$ est réalisée sur les animaux anesthésiés (mélange kétamine-xylazine administré par voie intrapéritonéale dans un rapport 4 : 1, à raison de 20 μ L de mélange par animal de 20 g) et positionnés en décubitus ventral sur le collimateur de la caméra.

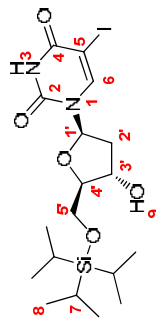
Après acquisition, les images obtenues sont analysées : (i) qualitativement afin d’identifier les principaux organes cibles et (ii) quantitativement par la définition de région d’intérêt (ROI) localisées au niveau des organes cibles, notamment la tumeur et les yeux, et du bruit de fond (généralement le muscle). La taille de chaque ROI est calculée en mm^2 et l’activité radioactive de chaque ROI est alors obtenue en terme de radioactivité totale en coups / minute (cpm) et en activité surfacique (cpm / mm^2). Après correction de la décroissance radioactive, la biodistribution et la cinétique tumorale sont déterminées selon la méthodologie préalablement validée par le laboratoire ^[201].

Parallèlement, une étude de biodistribution par prélèvement d’organes a été réalisée sur le même modèle expérimental : les animaux sont sacrifiés à des temps précoces (5 min, 1 h et 3 h) et tardif (24 h) post-injection (p.i.) et les organes d’intérêt (sang, muscle, foie, reins, rate, yeux, thyroïde + glandes sous-maxillaires (GSM) et tumeur) sont prélevés, pesés et leur radioactivité quantifiée par un compteur gamma de type Packard. Après correction de la décroissance radioactive, la distribution a été exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d’organe (% DI / g).

MODES OPERATOIRES

Précurseurs communs

5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **5**



A une solution de (+)-5-iodo-2'-déoxyuridine (5 g, 14.12 mmol), d'imidazole (2.115 g, 31.07 mmol) et de DMAP (172 mg, 1.41 mmol) dans le DMF anhydre (70 mL) refroidie à 0 °C est lentement additionnée sous argon une solution de TIPSCl (2.995 g, 15.53 mmol) dans le DMF anhydre (30 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h puis à TA pendant 18 h. Le mélange est versé dans 500 mL de solution aqueuse saturée de NH₄Cl. La solution obtenue est extraite avec 3x250 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 250 mL de solution aqueuse saturée de NH₄Cl et 250 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide poussé. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **5** (5.964 g, 11.68 mmol).

Aspect : cristaux blancs

Rendement : 83 %

R_f (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane, 40/60, v/v) : 0.28

Point de fusion : 185-187 °C

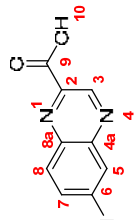
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 689, 791, 882, 942, 1001, 1054, 1092, 1117, 1201, 1254, 1271, 1453, 1607, 1676, 1712, 2865, 2943, 3058, 3175, 3568

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.07-1.29 (m, 21H, H₇, H₈), 2.04-2.19 (m, 1H, H₂), 2.40-2.51 (m, 1H, H₂), 3.88-3.97 (m, 2H, H₅), 4.06-4.17 (m, 1H, H₄), 4.52-4.58 (m, 1H, H₃), 6.29 (dd, 1H, J = 8 Hz, 5 Hz, H₁), 8.06 (s, 1H, H₆), 9.05 (ls, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.1 (3C₇), 18.3 (6C₈), 41.8 (C₂), 63.7 (C₅), 68.7 (C₅), 72.5 (C₃), 85.9 (C₁), 87.8 (C₄), 144.4 (C₆), 150.1 (C₂), 160.1 (C₄)

IES-SM : [M-H]⁺_{th} = 509.10 / [M-H]⁺_{mes} = 508.83

Acide 6-iodoquinoxaline-2-carboxylique **11**



Une solution de **10** (4 g, 12.19 mmol) dans un mélange d'éthanol (16 mL) et de solution aqueuse 2N de NaOH (16 mL) est portée à reflux et le mélange est agité pendant 1 h. Après retour à TA, le mélange est acidifié avec 3 mL d'acide acétique et refroidi dans un bain de glace pendant 30 minutes. Le mélange est filtré et le précipité obtenu est lavé avec de l'eau puis placé dans un dessiccateur chauffant (35 °C) pendant 24 h, conduisant à **11** (3.581 g, 11.93 mmol).

Aspect : solide beige

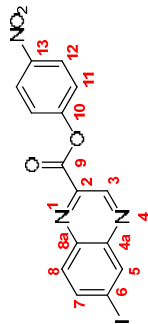
Rendement : 98 %

Point de fusion : 244-246 °C (littérature ^[190] : 242-244 °C)

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 1168, 1395, 1477, 1617, 1696, 3400-3550

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 7.98 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H₈), 8.17 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2H, H₇), 8.54 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H₅), 9.38 (s, 1H, H₃)

6-iodoquinoxaline-2-carboxylate de 4-nitrophényle **12**



A une solution de **11** (2.950 g, 9.83 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (20 mL) est ajouté sous argon le DMF (76 μ L, 0.98 mmol). Le mélange est refroidi à 0 °C puis une solution de chlorure d'oxalyle (2.490 g, 19.66 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est lentement additionnée sous argon. Le mélange est agité à 0 °C pendant 30 minutes puis à TA pendant 15 h. Le solvant est évaporé sous vide (co-évaporation avec 50 mL de toluène anhydre), conduisant à un solide jaune.

Ce résidu est repris dans le THF anhydre (60 mL) puis une solution de *p*-nitrophénol (1.504 g, 10.81 mmol) et de NEt₃ (1.52 mL, 10.81 mmol) dans le THF anhydre (30 mL) est additionnée. Le mélange est agité à 50 °C pendant 16 h puis refroidi dans un bain de glace et filtré. Le solide est rincé avec 2x40 mL d'Et₂O, 2x20 mL d'eau et 3x20 mL d'Et₂O puis placé dans un dessiccateur chauffant (35 °C). Les filtrats sont combinés, l'éther est évaporé puis le résidu est repris avec 100 mL de CH₂Cl₂ et versé dans 150 mL de solution aqueuse saturée de NaCl + 150 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. Après décantation, la phase aqueuse est extraite avec 2x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 100 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le solide obtenu est lavé avec 2x10 mL d'Et₂O et combiné au premier solide obtenu dans le dessiccateur chauffant, conduisant à **12** (3.473 g, 8.25 mmol).

Aspect : solide beige floconneux

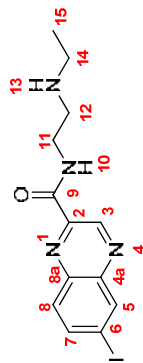
Rendement : 84 %

Point de fusion : 249-251 °C (littérature ^[190] : 228-230 °C)

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 1082, 1207, 1313, 1352, 1513, 1594, 1738

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 7.78 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H₁₁), 8.14 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H₈), 8.36 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H₇), 8.47 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H₁₂), 8.76 (s, 1H, H₅), 9.66 (s, 1H, H₃)

N-2-(éthylamino)éthyl)-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide **13**



A une solution de **12** (1.667 g, 3.96 mmol) dans le THF anhydre (42 mL) est ajoutée sous argon la *N*-éthyléthyléthylenediamine (459 μ L, 4.35 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 20 h puis versé dans 100 mL de CH_2Cl_2 et lavé avec 100 mL de solution aqueuse de NaOH IN . Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x30 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 % puis 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à **13** (1.404 g, 3.79 mmol).

Aspect : poudre beige

Rendement : 96 %

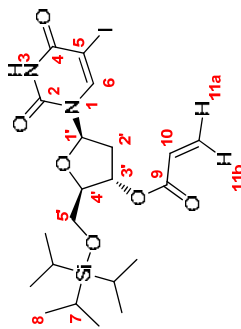
Point de fusion : 111-113 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 1117, 1166, 1366, 1472, 1527, 1657, 1675-2950, 3285.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.15 (3H, t, $J = 7$ Hz, H_{15}), 1.54 (1s, 1H, H_{13}), 2.73 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{14}), 2.95 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{12}), 3.64 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{11}), 7.80 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_8), 8.08 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_7), 8.27 (1s, 1H, H_{10}), 8.60 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_5), 9.64 (s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) : 14.9 (C_{15}), 39.1 (C_{11}), 43.4 (C_{14}), 48.0 (C_{12}), 97.5 (C_6), 130.3 (C_8), 138.1 (C_5), 139.0 (C_2), 139.2 (C_7), 143.4 (C_{8a}), 143.9 (C_{4a}), 144.2 (C_3), 162.7 (C_9)

3'-O-acryloyl-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **16**



A une solution de DCC (606 mg, 2.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (8 mL) refroidie à 0 °C est lentement additionnée sous argon une solution d'acide acrylique (202 μL , 2.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (8 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h puis à TA pendant 1 h. Une solution de **5** (1 g, 1.96 mmol) et de DMAP (36 mg, 0.29 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (24 mL) est additionnée sous argon et le mélange agité à reflux pendant 18 h. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C, filtré et versé dans 50 mL d'eau. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x30 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **16** (510 mg, 0.90 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 46 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 65/35, v/v) : 0.30

Point de fusion : 167-169 °C

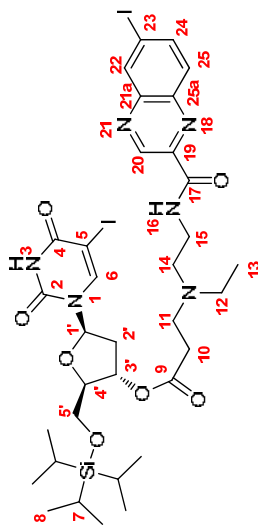
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 686, 813, 884, 997, 1070, 1117, 1187, 1274, 1299, 1405, 1442, 1610, 1693, 1715, 2866, 2943, 3241

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.98-1.39 (m, 21H, H_7 , H_8), 2.10-2.21 (m, 1H, H_2), 2.53 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 5 Hz, H_2), 3.98-4.04 (m, 2H, H_5), 4.11-4.15 (m, 1H, H_4), 5.41 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 5.88 (dd, 1H, $J = 10$ Hz, 1 Hz, H_{11a}), 6.12 (dd, 1H, $J = 17$ Hz, 10 Hz, H_{10}), 6.37 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 6.45 (dd, 1H, $J = 17$ Hz, 1 Hz, H_{11b}), 8.07 (s, 1H, H_6), 9.83 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 38.7 (C₂), 63.7 (C₅), 69.2 (C₃), 75.3 (C₃), 85.4 (C₁), 86.1 (C₄), 127.7 (C₁₀), 132.3 (C₁₁), 143.8 (C₆), 150.3 (C₂), 160.2 (C₄), 165.7 (C₉)

IES-SM : $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{th}} = 563.11$ / $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{mes}} = 563.12$

3'-O-(3-(éthyl-2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)propanoyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **17**



A une suspension de **16** (510 mg, 0.90 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (7.5 mL) sont ajoutés sous argon l'amine secondaire **13** (334 mg, 0.90 mmol) et le DBU (67 μL , 0.45 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 96 h puis versé dans 50 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **17** (151 mg, 0.16 mmol).

Aspect : meringue jaune pâle

Rendement : 18 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 97/3/0.5, v/v/v) : 0.25

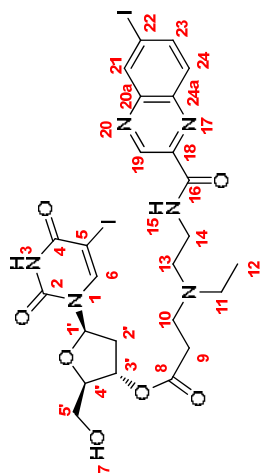
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 682, 790, 827, 882, 1008, 1069, 1126, 1163, 1251, 1273, 1319, 1353, 1387, 1443, 1473, 1527, 1593, 1608, 1685, 2865, 2942, 3066, 3178, 3385

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.02-1.17 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.25 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{13}), 1.98-2.13 (m, 1H, H_2), 2.40-2.65 (m, 5H, H_2 , H_{10} , H_{12}), 2.73 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{11}), 2.89 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{14}), 3.58 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{15}), 3.76-3.92 (m, 2H, H_5), 4.06-4.13 (m, 1H, H_4), 5.30 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 6.22 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 7.80 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{25}), 8.00 (s, 1H, H_6), 8.06 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{24}), 8.26 (ls, 1H, H_{16}), 8.60 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{22}), 9.64 (s, 1H, H_{20})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 11.9 (3C₇), 12.0 (C₁₃), 18.1 (6C₈), 32.8 (C₁₀), 37.4 (C₁₅), 38.5 (C₂), 47.4 (C₁₂), 48.9 (C₁₁), 52.3 (C₁₄), 63.6 (C₅), 69.3 (C₃), 75.4 (C₃), 85.3 (C₁), 86.0 (C₄), 98.1 (C₂₃), 130.8 (C₂₅), 138.6 (C₂₂), 139.5 (C_{25a}), 139.7 (C₂₄), 143.6 (C₆), 144.09, 144.3 (C₁₉, C_{21a}), 144.7 (C₂₀), 150.2 (C₂), 160.1 (C₄), 163.0 (C₁₇), 172.3 (C₉)

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 935.15$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 935.48$

3'-O-(3-(éthyl-2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)propanoyl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **1**



A une solution de **17** (143 mg, 0.15 mmol) dans le THF anhydre (4.5 mL) est ajouté sous argon le TBAF (IM dans le THF, 230 μ L, 0.23 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 5 h puis versé dans 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x10 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **1** (114 mg, 0.15 mmol).

Aspect : meringue jaune pâle

Rendement : 95 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 90/10/0.5, v/v/v) : 0.26

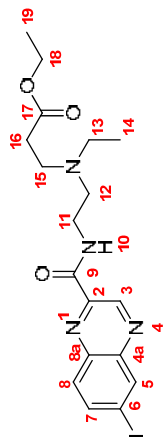
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 831, 1126, 1184, 1259, 1353, 1388, 1472, 1528, 1683, 1702, 2855, 2928, 2946, 3378

RMN ¹H (200 MHz, Acetone d₆, δ) : 1.06 (t, 2H, *J* = 7 Hz, H₁₂), 2.31-2.42 (m, 2H, H₂), 2.56-2.92 (m, 8H, H₆, H₁₀, H₁₁, H₁₃), 3.56 (q, 2H, *J* = 7 Hz, H₄), 3.75-3.82 (m, 2H, H₅), 4.10-4.14 (m, 1H, H_{4'}), 5.32-5.37 (m, 1H, H_{3'}), 6.23 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, 6 Hz, H₁₇), 7.93 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₄), 8.21 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₃), 8.44 (s, 1H, H₆), 8.53 (ls, 1H, H₁₅), 8.60 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₂₁), 9.52 (s, 1H, H₁₉)

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 11.9 (C₁₃), 32.4 (C₉), 37.1 (C₇), 47.0 (C₁₁), 48.8 (C₁₀), 51.6 (C₁₃), 61.1 (C₅), 69.9 (C₅), 74.7 (C_{3'}), 84.4 (C₁), 85.0 (C_{4'}), 99.2 (C₂₂), 130.7 (C₂₄), 137.6 (C₂₁), 139.0 (C_{24b}), 139.8 (C₂₃), 143.6 (C_{20a}), 144.3 (C₁₉), 144.5 (C₁₈), 144.7 (C₆), 150.1 (C₂), 160.4 (C₄), 162.6 (C₁₆), 171.8 (C₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 779.02 / [M+H]⁺_{mes} = 779.26

Propanoate de 3-(éthyl-2-(((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyle **14**



A une suspension de **13** (100 mg, 0,27 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (1,5 mL) sont successivement ajoutés sous argon le DBU (20 μ L, 0,14 mmol) et l'acrylate d'éthyle (44 μ L, 0,41 mmol). Le ballon est scellé et le mélange est agité à TA pendant 48 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel d'alumine, conduisant à **14** (121 mg, 0,26 mmol).

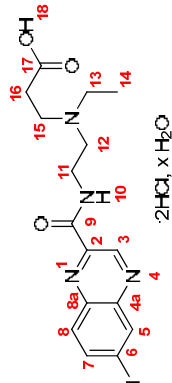
Aspect : caramel brun

Rendement : 95 %

Rf (Al_2O_3 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 40/60, v/v) : 0,36

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ) : 1,00 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{19}), 1,13 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{14}), 2,45 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{16}), 2,55 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{13}), 2,66 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{12}), 2,82 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{15}), 3,54 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{11}), 4,05 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{18}), 7,76 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_8), 7,99 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2Hz, H_7), 8,29 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H_{10}), 8,51 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_5), 9,57 (s, 1H, H_3)

Acide 3-(éthyl-2-(((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)propanoïque **15**



A une solution de **14** (121 mg, 0,26 mmol) dans l'éthanol (850 μ L) et l'eau (350 μ L) est ajouté le NaOH (11,3 mg, 0,28 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur résine échangeuse d'ions Dowex 50X2 (élution HCl IN \rightarrow 4N).

Aspect : solide jaune

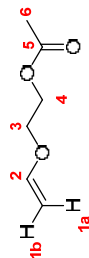
Rendement : quantitatif

RMN 1H (200 MHz, D_2O , δ) : 1,40 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{14}), 2,92 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{16}), 3,40-3,56 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{15}), 3,93 (m, 2H, H_{11}), 7,72 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_8), 8,04 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_7), 8,25 (s, 1H, H_5), 9,20 (s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, D_2O , δ) : 9,5 (C_{14}), 29,6 (C_{16}), 35,7 (C_{11}), 49,5, 50,2, 52,8 (C_{12} , C_{13} , C_{15}), 101,1 (C_6), 132,0 (C_8), 137,9 (C_5), 140,2 (C_{8a}), 141,4 (C_7), 143,6 (C_{4a}), 144,5 (C_2), 145,0 (C_3), 166,3 (C_9), 174,5 (C_{17})

« Acétal » 2

Acétate de 2-(vinyloxy)éthyle 18



A une solution d'éther monovinyle de l'éthylène glycol (2 g, 22.70 mmol), de pyridine (2.75 mL, 34.05 mmol) et de DMAP (277 mg, 3.27 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (60 mL) est ajouté sous argon l' Ac_2O (3.2 mL, 34.05 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans 100 mL d'eau + 100 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 40 mL puis 2x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 100 mL d'eau, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **18** (2.658 g, 20.42 mmol).

Aspect : huile incolore

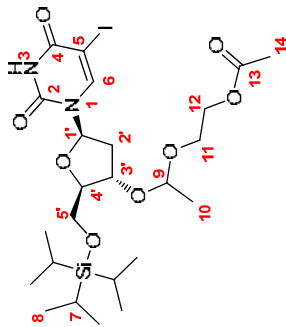
Rendement : 90 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle / cyclohexane, 10/90, v/v) : 0.28

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 2.09 (s, 3H, H_6), 3.88 (t, 2H, $J = 5 \text{ Hz}$, H_3), 4.05 (dd, 1H, $J = 7 \text{ Hz}$, 2 Hz, H_{1b}), 4.20 (t, 1H, $J = 14 \text{ Hz}$, 2 Hz, H_{1a}), 4.31 (t, 2H, $J = 5 \text{ Hz}$, H_4), 6.49 (dd, 1H, $J = 14 \text{ Hz}$, 7 Hz, H_2)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 20.9 (C_6), 62.7 (C_4), 65.8 (C_3), 87.1 (C_1), 151.4 (C_2), 170.9 (C_5)

3'-O-(1-(2-(acétyloxy)éthoxy)éthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **19**



A une solution de **5** (1.5 g, 2.94 mmol) et d'acide camphorsulfonique (14 mg, 0.06 mmol) dans le THF anhydre (30 mL) est additionnée sous argon une solution de **18** (1.147 g, 8.82 mmol) dans le THF anhydre (30 mL). Le mélange est agité à TA pendant 5 h puis versé dans 100 mL d'eau et 50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **19** (1.859 g, 2.90 mmol).

Aspect : meringue blanche

Rendement : 99 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.24

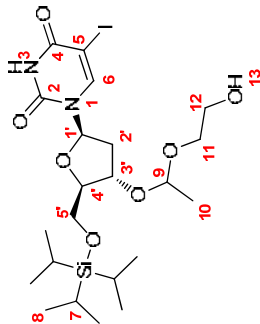
Point de fusion : 96-98 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 682, 723, 775, 830, 864, 976, 1017, 1064, 1134, 1223, 1260, 1326, 1348, 1523, 1763, 3083

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.09-1.29 (m, 21H, H₇, H₈), 1.34 et 1.35 (2xd, 3H, *J* = 5 Hz, H₁₀), 2.03-2.13 (m, 4H, H₂, H₄), 2.43-2.54 (m, 1H, H₂), 3.61-3.92 (m, 4H, H₅, H₁₁), 3.96-4.25 (m, 3H, H₄, H₁₂), 4.44-4.51 (m, 1H, H₃), 4.84 et 4.85 (2xq, 1H, *J* = 5 Hz, H₉), 6.18-6.25 (m, 1H, H₁), 8.03 et 8.05 (2xs, 1H, H₆), 8.36 (ls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.0 (C₁₀), 21.0 (C₂), 62.0, 62.3, 63.4, 63.6, 63.7 (C₃, C₁₁, C₁₂), 68.7 (C₅), 74.9 (C_{3'}), 85.7 (C₁), 85.9, 86.4 (C₄), 99.0, 99.4 (C₉), 144.1 (C₆), 150.1 (C₂), 160.1 (C₄), 171.0 (C₁₃)

3'-O-(1-(2-hydroxyéthoxy)éthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **20**



A une solution de **19** (1.959 g, 2.94 mmol) dans l'éthanol anhydre (59 mL) est ajouté sous argon le LiOH (106 mg, 4.41 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans 250 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 % et 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 60 mL puis 3x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **20** (1.630 g, 2.72 mmol).

Aspect : caramel incolore

Rendement : 93 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 80/20, v/v) : 0.29

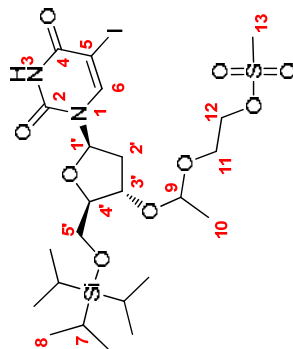
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 688, 793, 882, 942, 1002, 1054, 1092, 1117, 1202, 1255, 1271, 1452, 1608, 1676, 1712, 2865, 2942

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06-1.19 (m, 21H, H₇, H₈), 1.36 et 1.37 (2xd, 1H, *J* = 5 Hz, H₁₀), 1.93-2.13 (m, 2H, H₂, H₃), 2.43-2.63 (m, 1H, H₂), 3.52-3.76 (m, 2H, H₁₁), 3.71-3.75 (m, 2H, H₁₂), 3.82-3.98 (m, 2H, H₅), 3.95-4.15 (m, 1H, H₄), 4.43-4.55 (m, 1H, H₃), 4.86 et 4.87 (2xq, 1H, *J* = 5 Hz, H₉), 6.18-6.25 (m, 1H, H₁), 8.03 et 8.04 (2xs, 1H, H₆), 8.63 (ls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇), 18.2 (6C₈), 20.1 (C₁₀), 39.3, 39.9 (C₂), 61.9 (C₁₂), 63.5 (C₃), 65.7, 66.0 (C₁₁), 68.7 (C₅), 75.0, 75.7 (C_{3'}), 86.1 (C₁), 86.5 (C₄), 99.1, 99.7 (C₉), 144.2 (C₆), 150.1 (C₂), 160.0 (C₄)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 597.15 / [M+H]⁺_{mes} = 596.98

5-iodo-3'-O-(1-(2-(méthylsulfonyloxy)éthoxy)éthyl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine
21a



A une solution de **20** (1.630 g, 2.72 mmol), de pyridine (440 μ L, 5.45 mmol) et de DMAP (33 mg, 0.27 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (33 mL) est ajouté sous argon MsCl (253 μ L, 3.27 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 22 h puis versé dans 300 mL d'eau et 50 mL de solution aqueuse saturée de NaCl . La solution obtenue est extraite avec 3x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **21a** (1.639 g, 2.42 mmol).

Aspect : meringue blanche

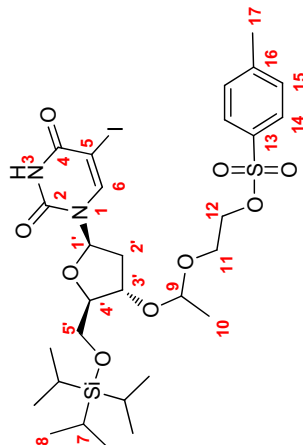
Rendement : 89 %

R_f (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 65/35, v/v) : 0.29

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09-1.26 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.35 et 1.36 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H_{10}), 2.02-2.14 (m, 1H, H_2), 2.39-2.48 (m, 1H, H_2), 3.04 (s, 3H, H_{13}), 3.67-4.15 (m, 5H, H_4 , H_5 , H_{11}), 4.32-4.38 (m, 2H, H_{12}), 4.43-4.50 (m, 1H, H_3), 4.85 et 4.86 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H_6), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 5 Hz, H_1), 8.02 et 8.05 (2xs, 1H, H_6), 8.35 et 8.37 (2xsls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.0 (3 C_7), 18.2 (6 C_8), 19.9, 20.0 (C_{10}), 37.7 (C_{13}), 39.3, 39.8 (C_2), 62.0, 62.5 (C_5), 63.4 (C_{11}), 68.8, 68.9, 69.0 (C_5 , C_{12}), 75.1, 75.5 (C_3), 85.7 (C_1), 85.9, 86.4 (C_4), 99.2, 99.6 (C_9), 144.1 (C_6), 150.2 (C_2), 160.2 (C_4)

5-iodo-3'-O-(1-(2-(toluylsulfonyloxy)éthoxy)éthyl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine
21b



A une solution de **20** (834 mg, 1.39 mmol) dans la pyridine anhydre (8.5 mL) refroidie à 0 °C est ajouté sous argon le TsCl (71 mg, 0.37 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 45 minutes puis à TA pendant 16 h. Le mélange est versé dans 50 mL de mélange glace/eau/solution aqueuse saturée de NaCl (1/1/1, v/v/v). La solution obtenue est extraite avec 3x25 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide (co-évaporation avec 2x30 mL de toluène). Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **21b** (755 mg, 1.00 mmol).

Aspect : caramel incolore

Rendement : 72 %

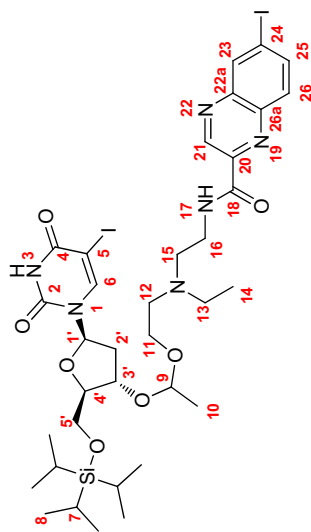
R_f (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : 0.28

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.08-1.19 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.28 (d, 3H, J = 5 Hz, H_{10}), 1.96-2.14 (m, 1H, H_2), 2.35-2.49 (m, 4H, H_2 , H_{17}), 3.60-3.76 (m, 2H, H_{11}), 3.84-4.06 (m, 2H, H_5), 4.10-4.18 (m, 3H, H_4 , H_{12}), 4.42-4.48 (m, 1H, H_3), 4.79 (q, 1H, J = 5 Hz, H_6), 6.15-6.22 (m, 1H, H_1), 7.34 (d, 2H, J = 8 Hz, H_{15}), 7.78 (d, 2H, J = 8 Hz, H_{14}), 8.01-8.05 (s, 1H, H_6), 8.33 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 11.8 (3 C_7), 18.1 (6 C_8), 19.6 (C_{10}), 21.6 (C_{17}), 39.1, 39.6 (C_2), 61.7, 61.9 (C_{11}), 63.3 (C_{12}), 68.7, 69.1 (C_5), 74.9 (C_3), 85.5, 86.3 (C_1), 86.3 (C_4), 99.2 (C_9), 127.9 (C_{14}), 129.8 (C_{15}), 132.8 (C_{13}), 144.0 (C_6), 144.8 (C_{16}), 150.2 (C_2), 160.3 (C_4)

IES-SM : $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{th}} = 751.16$ / $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{mes}} = 751.15$

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)éthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **22a**



A une solution de **21a** (1.244 g, 1.84 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (37 mL) est ajouté sous argon **13** (817 mg, 2.21 mmol). Le mélange est agité à 55 °C pendant 88 h puis versé dans 300 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **22a** (265 mg, 0.28 mmol).

Aspect : meringue brun clair

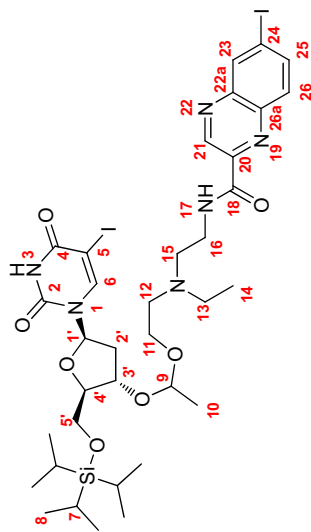
Rendement : 15 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 95/5/0.5, v/v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.08-1.16 (m, 24H, H₇, H₈, H₁₄), 1.29 et 1.30 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.96-2.04 (m, 1H, H₂), 2.39-2.44 (m, 1H, H₂'), 2.65-2.82 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.51-3.85 (m, 4H, H₁₁, H₁₆), 3.87-3.98 (m, 2H, H₅'), 4.04-4.10 (m, 1H, H₄'), 4.38-4.44 (m, 1H, H₃'), 4.78 (q, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.17 (q, 1H, J = 8 Hz, H₁₇), 7.80 (d, 1H, J = 9 Hz, H₂₆), 7.96-8.09 (m, 2H, H₆, H₂₅), 8.37-8.40 (m, 1H, H₁₇), 8.60 (d, 1H, J = 2 Hz, H₂₃), 9.63 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇, C₁₄), 18.3 (6C₈), 20.1, 20.2 (C₁₀), 37.5 (C₁₆), 39.4, 40.0 (C₂), 48.7 (C₁₃), 52.9, 53.2 (C₁₂, C₁₅), 63.1, 63.5 (C₅, C₁₁), 68.7 (C₁₁), 74.8, 75.1 (C₃), 85.7, 85.8 (C₁), 86.1, 86.6 (C₄'), 98.2 (C_{2a}'), 99.3, 99.7 (C₉), 130.8 (C_{2b}'), 138.7 (C₂₃'), 139.6 (C_{26a}'), 139.9 (C₂₅'), 144.1 (C₆'), 144.2, 144.5 (C₂₀, C_{22a}'), 144.8 (C₂₁'), 149.9 (C₂'), 160.0 (C₄'), 163.2 (C₁₈)

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)éthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **22b**



A une solution de **21b** (235 mg, 0.31 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (5 mL) est ajouté sous argon **13** (173 mg, 0.47 mmol). Le mélange est agité à 55 °C pendant 80 h puis versé dans 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x15 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **22a** (123 mg, 0.13 mmol).

Aspect : meringue brun clair

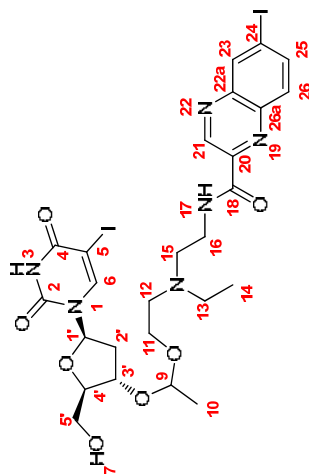
Rendement : 41 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 95/5/0.5, v/v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.08-1.16 (m, 24H, H₇, H₈, H₁₄), 1.29 et 1.30 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.96-2.04 (m, 1H, H₂'), 2.39-2.44 (m, 1H, H₂), 2.65-2.82 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.51-3.85 (m, 4H, H₁₁, H₁₆), 3.87-3.98 (m, 2H, H₅'), 4.04-4.10 (m, 1H, H₄'), 4.38-4.44 (m, 1H, H₃'), 4.78 (q, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.17 (q, 1H, J = 8 Hz, H₁₇), 7.80 (d, 1H, J = 9 Hz, H₂₆), 7.96-8.09 (m, 2H, H₆, H₂₅), 8.37-8.40 (m, 1H, H₁₇), 8.60 (d, 1H, J = 2 Hz, H₂₃), 9.63 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇, C₁₄), 18.3 (6C₈), 20.1, 20.2 (C₁₀), 37.5 (C₁₆), 39.4, 40.0 (C₂), 48.7 (C₁₃), 52.9, 53.2 (C₁₂, C₁₅), 63.1, 63.5 (C₅, C₁₁), 68.7 (C₁₁), 74.8, 75.1 (C₃), 85.7, 85.8 (C₁), 86.1, 86.6 (C₄'), 98.2 (C_{2a}'), 99.3, 99.7 (C₉), 130.8 (C_{2b}'), 138.7 (C₂₃'), 139.6 (C_{26a}'), 139.9 (C₂₅'), 144.1 (C₆'), 144.2, 144.5 (C₂₀, C_{22a}'), 144.8 (C₂₁'), 149.9 (C₂'), 160.0 (C₄'), 163.2 (C₁₈)

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)éthyl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **2**



A une solution de **21** (265 mg, 0.28 mmol) dans le THF anhydre (8 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 558 μ L, 0.56 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x10 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **2** (180 mg, 0.23 mmol).

Aspect : meringue brun clair

Rendement : 81 %

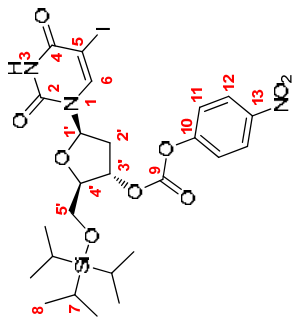
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 90/10/0.5, v/v/v) : 0.28

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) :

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.10 (t, 3H, *J* = 7 Hz, H₁₄), 1.22-1.31 (m, 3H, H₁₀), 2.33-2.45 (m, 2H, H₂), 2.65-2.93 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.53-3.71 (m, 4H, H₁₁, H₁₆), 3.86-4.02 (m, 3H, H₄, H₅), 4.49-4.82 (m, 2H, H₃, H₆), 6.04-6.14 (m, 1H, H₇), 7.82 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, *J* = 4 Hz, H₂₆), 8.08 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₅), 8.30-8.39 (m, 1H, H₁₇), 8.50-8.68 (s, 1H, H₆), 8.61 (d, 1H, *J* = 1Hz, H₂₃), 9.62 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 10.9, 11.5 (C₁₄), 19.8, 20.4 (C₁₀), 37.3, 37.5 (C₁₆), 38.9, 40.1 (C₂), 48.1, 48.8 (C₁₃), 52.9 (C₁₂, C₁₅), 60.0, 61.2 (C₅), 62.5, 64.4 (C₁₁), 68.0, 68.3 (C₅), 71.4, 72.7 (C₃), 85.9, 86.3 (C₁, C₄), 98.3 (C₂₄), 99.1, 99.7 (C₉), 130.8 (C₂₆), 138.5 (C₂₃), 139.5 (C_{26a}), 139.9 (C₂₅), 143.9, 144.3 (C₂₀, C_{22a}), 144.5 (C₂₁), 145.6 (C₆), 150.3 (C₂), 160.7 (C₄), 163.2, 163.4 (C₁₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 795.05 / [M+H]⁺_{ms} = 795.23



A une solution de **5** (750 mg, 1.47 mmol) dans la pyridine anhydre (5.3 mL) refroidie à 0 °C est additionnée sous argon une solution de chloroformiate de *p*-nitrophényl (370 mg, 1.84 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (5.3 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 2 h puis à TA pendant 15 h puis le solvant est évaporé sous vide (co-évaporation 2x15 mL de toluène). Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **27** (845 mg, 1.25 mmol).

Aspect : cristaux blancs

Rendement : 85 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.22

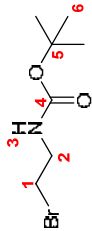
Point de fusion : 175-177 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 595, 685, 770, 796, 860, 882, 1039, 1072, 1108, 1125, 1194, 1218, 1246, 1350, 1400, 1453, 1492, 1529, 1594, 1617, 1690, 1707, 1772, 2866, 2943, 3214

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.08-1.29 (m, 21H, H₇, H₈), 2.12-2.31 (m, 1H, H_{2'}), 2.69 (dd, 1H, *J* = 14 Hz, 5 Hz, H₂), 4.04-4.05 (m, 2H, H₅), 4.33 (m, 1H, H₄), 5.41 (d, 1H, *J* = 6 Hz, H_{3'}), 6.36 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 5 Hz, H_{1'}), 7.40 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₁₂), 8.04 (s, 1H, H₆), 8.30 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₁₁), 8.42 (ls, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇), 18.2 (6C₈), 38.7 (C₂), 63.8 (C₅), 69.2 (C₅), 80.1 (C₃), 85.4 (C_{1'}), 85.6 (C_{4'}), 121.8 (2C₁₂), 125.5 (2C₁₁), 143.7 (C₆), 150.0 (C₂), 159.9 (C₄)

2-bromoéthylcarbamate de *tert*-butyle **23**



A une solution de bromhydrate de bromoéthylamine (4 g, 19.52 mmol) et de DIPEA (9.8 mL, 56.04 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (100 mL) est ajouté sous argon le Boc₂O (4.26 g, 19.52 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le solide obtenu est repris avec 100 mL d'Et₂O et la suspension obtenue est filtrée puis lavée avec 2x20 mL d' Et₂O. Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **23** (1.971 g, 8.80 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 45 %

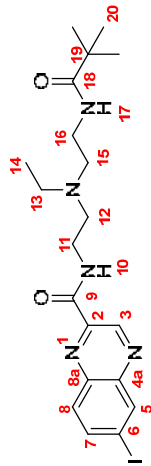
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 20/80, v/v) : 0.32

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 807, 862, 953, 1055, 1170, 1238, 1367, 1500, 1722, 2980, 3463

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.45 (s, 9H, H₆), 3.41-3.57 (m, 4H, H₁, H₂), 5.29 (ls, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 28.5 (3C₆), 33.0 (C₁), 42.5 (C₂), 80.0 (C₅), 155.7 (C₄)

2-(éthyl-(2-(((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthylcarbamate de *tert*-butyle **24**



A une suspension de **13** (500 mg, 1.35 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL) est ajouté sous argon le dérivé bromé **23** (908 mg, 4.05 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 96 h puis versé dans 50 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **24** (370 mg, 0.72 mmol).

Aspect : huile brune

Rendement : 53 %

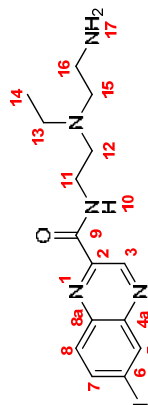
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane/triéthylamine, 90/10/2, v/v) : 0.30

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 827, 1164, 1249, 1364, 1473, 1507, 1522, 1540, 1560, 1654, 1685, 1701, 2975, 3368

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.99 (t, 3H, J = 7 Hz, H₁₄), 1.28 (s, 9H, H₂₀), 2.51-2.62 (m, 4H, H₁₃, H₁₅), 2.66 (t, 2H, J = 6 Hz, H₁₂), 3.13 (q, 2H, J = 6 Hz, H₁₆), 4.03 (q, 2H, J = 6 Hz, H₁₁), 5.24 (ls, 1H, H₁₇), 7.78 (d, 1H, J = 9 Hz, H₈), 7.97 (dd, 1H, J = 9 Hz, 1 Hz, H₇), 8.26 (t, 1H, J = 5 Hz), 8.50 (d, 1H, J = 1 Hz, H₅), 9.55 (s, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (C₁₄), 28.3 (3C₂₀), 37.3 (C₁₁), 38.8 (C₁₆), 47.6 (C₁₃), 52.5 (C₁₅), 53.0 (C₁₂), 79.1 (C₁₀), 98.0 (C₆), 130.8 (C₈), 138.4 (C₅), 139.4 (C_{8a}), 139.6 (C₇), 143.9 (C₂), 144.3 (C_{4a}), 144.6 (C₃), 156.0 (C₁₈), 162.8 (C₉)

N*-(2-(éthyl(2-aminoéthyl)amino)éthyl)-6-iodoquinoline-2-carboxamide **25*



A une solution de **24** (370 mg, 0.72 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (7.4 mL) est ajouté sous argon le TFA (3.7 mL). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans 200 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à **25** (285 mg, 0.69 mmol).

Aspect : pâte orangée

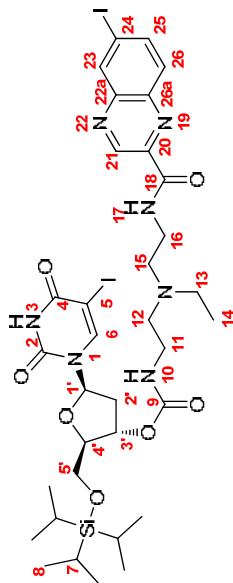
Rendement : 96 %

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 826, 977, 1162, 1353, 1388, 1474, 1522, 1560, 1648, 1654, 2928, 3393

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.99 (t, 3H, *J* = 7 Hz, H₁₄), 2.51-2.62 (m, 4H, H₁₃, H₁₅), 2.66 (t, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₂), 3.13 (q, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₀), 4.03 (q, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₁), 5.24 (ls, 1H, H₁₇), 7.78 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₈), 7.97 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 1 Hz, H₇), 8.26 (t, 1H, *J* = 5 Hz), 8.50 (d, 1H, *J* = 1 Hz, H₅), 9.55 (s, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (C₁₄), 28.3 (C₂₀), 37.3 (C₁₁), 38.8 (C₁₀), 47.6 (C₁₃), 52.5 (C₁₅), 53.0 (C₁₂), 79.0 (C₁₉), 98.0 (C₆), 130.8 (C₈), 138.4 (C₅), 139.4 (C_{8a}), 139.6 (C₇), 143.9 (C₂), 144.3 (C_{4a}), 144.6 (C₃), 156.0 (C₁₈), 162.8 (C₉)

3'*-*O*-(((2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)carbonyl)-5-iodo-5'-*O*-trisopropylisilyl-2'-déoxyuridine **28*



A une solution de **27** (311 mg, 0.46 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (4.2 mL) est additionnée sous argon une solution de **25** (285 mg, 0.69 mmol) et de NEt₃ (97 μL, 0.69 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (4.2 mL). Le mélange est agité à TA pendant 18 h puis versé dans 75 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x25 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées puis lavées avec 30 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **28** (420 mg, 0.44 mmol).

Aspect : meringue jaune pâle

Rendement : 96 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 90/10/0.5, v/v/v) : 0.31

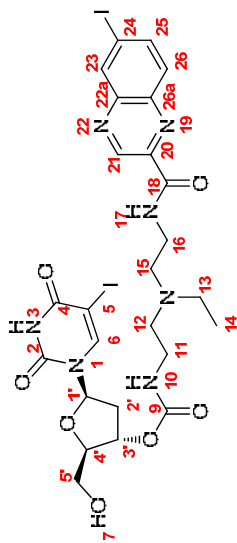
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 767, 828, 882, 1013, 1071, 1126, 1197, 1253, 1388, 1458, 1534, 1685, 1719, 2865, 2942

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.03-1.25 (m, 24H, H₇, H₈, H₁₄), 1.96-2.10 (m, 1H, H₂), 2.28-2.38 (m, 1H, H₂'), 2.60-2.78 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.27 (q, 2H, *J* = 5 Hz, H₁₁), 3.60 (q, 2H, *J* = 5 Hz, H₁₆), 3.94-3.98 (m, 3H, H₄, H₅'), 5.21 (d, 1H, *J* = 6 Hz, H₃'), 5.57 (t, 1H, *J* = 5 Hz, H₁₀), 6.05 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 5 Hz, H₁'), 7.81 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₆), 8.04 (s, 1H, H₆), 8.08 (dd, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₅), 8.23 (t, 1H, *J* = 5 Hz, H₁₇), 8.60 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₂₃), 9.65 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.5 (C₁₄), 11.8 (3C₇), 18.1 (6C₈), 37.4 (C₁₀), 38.7 (C₂), 38.9 (C₁₁), 47.6 (C₁₃), 52.6 (C₁₂, C₁₅), 63.6 (C₅'), 69.2 (C₅), 75.4 (C₃'), 85.2 (C₁'), 86.0 (C₄'), 98.1 (C₂₄), 130.6 (C₂₆), 138.4 (C₂₃), 139.3 (C_{26a}), 139.7 (C₂₅), 143.7 (C₆), 143.9, 144.2 (C₂₀, C_{22a}), 144.5 (C₂₁), 150.3 (C₂), 155.6 (C₉), 160.5 (C₄), 163.0 (C₁₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 950.17 / [M+H]⁺_{mes} = 950.30

3'-O-((2-(éthyl-(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)carbonyl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **3**



A une solution de **28** (420 mg, 0.44 mmol) dans le THF anhydre (12.6 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 530 μ L, 0.53 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans 50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées puis séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **3** (303 mg, 0.38 mmol).

Aspect : solide jaune

Rendement : 86 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 85/15/0.5, v/v/v) : 0.29

Point de fusion : 109-111 °C (décomposition)

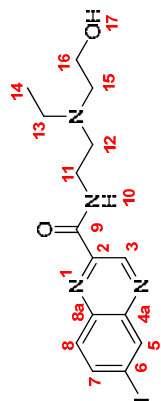
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 828, 992, 1107, 1251, 1354, 1388, 1437, 1534, 1685, 2926, 3309

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 0.96 (t, 3H, *J* = 7 Hz, H₁₄), 2.17-2.20 (m, 2H, H₂), 2.47-2.66 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.08 (q, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₁), 3.32-3.40 (m, 2H, H₁₆), 3.57 (m, 2H, H_{5'}), 3.90 (m, 1H, H_{4'}), 5.05 (m, 1H, H_{3'}), 5.25 (t, 1H, *J* = 5 Hz, H₇), 6.05 (t, 1H, *J* = 7 Hz, H₁₇), 7.20 (t, 1H, *J* = 6 Hz), 7.89 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₆), 8.20 (dd, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₅), 8.33 (s, 1H, H₆), 8.58 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₂₃), 8.93 (t, 1H, *J* = 5 Hz, H₁₇), 9.42 (s, 1H, H₂₁), 11.66 (ls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 11.9 (C₁₄), 37.3 (C₁₆), 37.5 (C₂₇), 38.3, 40.8 (C₁₁), 47.4 (C₁₃), 52.1, 52.6 (C₁₂, C₁₅), 61.2 (C_{5'}), 69.8 (C₃), 74.6 (C_{3'}), 84.4 (C_{1'}), 85.3 (C_{4'}), 99.2 (C₂₄), 130.8 (C₂₆), 137.5 (C₂₃), 139.0 (C_{26a}), 139.8 (C₂₅), 143.6 (C_{22a}), 144.3 (C₂₁), 144.6 (C₂₀), 144.7 (C₆), 150.1 (C₂), 155.4 (C₉), 160.4 (C₄), 162.7 (C₁₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 794.03 / [M+H]⁺_{mes} = 794.21

N-(2-(éthyl(2-hydroxyéthyl)amino)éthyl)-6-iodoquinoline-2-carboxamide 26



A une suspension de **13** (200 mg, 0.54 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (4 mL) sont ajoutés sous argon la DIPEA (65 μ L, 0.37 mmol) et le 2-bromoéthanol (46 μ L, 0.65 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 48 h puis le mélange est versé dans 50 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x15 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **26** (138 mg, 0.33 mmol).

Aspect : huile brune

Rendement : 62 %

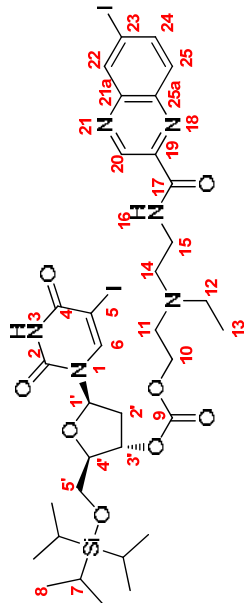
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 90/10/1, v/v/v) : 0.22

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.08 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{14}), 2.04 (ls, 1H, H_{17}), 2.67-2.82 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{15}), 3.60-3.66 (m, 4H, H_{11} , H_{16}), 7.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_8), 8.07 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_7), 8.28 (ls, 1H, H_{10}), 8.61 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_5), 9.63 (s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 11.9 (C_{14}), 37.6 (C_{11}), 47.7 (C_{13}), 52.6 (C_{12}), 55.7 (C_{15}), 59.2 (C_{16}), 98.2 (C_6), 130.8 (C_8), 138.6 (C_5), 139.5 (C_{8a}), 139.9 (C_7), 143.9 (C_2), 144.5 (C_{4a}), 144.6 (C_3), 163.1 (C_9)

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 415.06$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ms}} = 415.10$

3'-O-((2-(éthyl(2-((6-iodoquinolin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)oxy)carbonyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine 29



A une solution de **26** (400 mg, 0.97 mmol), de pyridine (78 μ L, 0.97 mmol) et de DMAP (102 mg, 0.84 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (6 mL) est additionnée sous argon une solution de **27** (434 mg, 0.64 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (2 mL). Le mélange est agité à TA pendant 72 h puis 50 mL d'AcOEt sont ajoutés. La solution obtenue est lavée successivement avec 2x40 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , 40 mL d'eau et 40 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **29** (527 mg, 0.55 mmol).

Aspect : meringue brun pâle

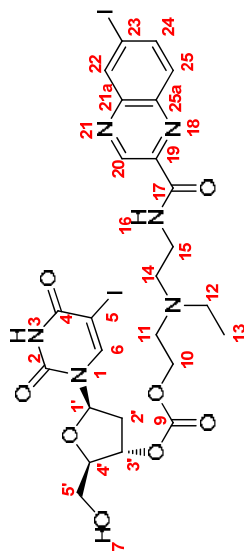
Rendement : 86 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v) : 0.28

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.08-1.18 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.26 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{13}), 1.99-2.14 (m, 1H, H_2), 2.47 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 5 Hz, H_2), 2.70 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{12}), 2.77-2.89 (m, 4H, H_{11} , H_{14}), 3.59 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{15}), 3.92-3.93 (m, 2H, H_5), 4.07-4.10 (m, 1H, H_4), 4.26 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{10}), 5.18 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 6.16 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 7.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{25}), 8.01 (s, 1H, H_6), 8.08 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{24}), 8.30-8.33 (m, 2H, H_3 , H_{16}), 8.60 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{22}), 9.64 (s, 1H, H_{20})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.0 (3 C_7), 12.1 (C_{13}), 18.2 (6 C_8), 37.6 (C_{15}), 38.7 (C_2), 48.4 (C_{12}), 52.0, 52.9 (C_{11} , C_{14}), 63.8 (C_5), 66.8 (C_{10}), 69.0 (C_3), 78.6 (C_3), 85.3 (C_1), 85.7 (C_4), 98.2 (C_{23}), 130.9 (C_{25}), 138.7 (C_{22}), 139.6 (C_{25a}), 139.8 (C_{24}), 143.8 (C_6), 144.1, 144.5 (C_{19} , C_{21a}), 144.7 (C_{20}), 149.8 (C_2), 154.7 (C_9), 159.9 (C_4), 163.1 (C_{17})

3'-O-((2-(éthyl-2-(((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)oxy)carboxyl-5-iodo-2'-déoxyuridine **4**



A une solution de **29** (500 mg, 0.53 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 789 μ L, 0.79 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h 30 puis versé dans 70 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées puis séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.
Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **4** (380 mg, 0.48 mmol).

Aspect : meringue jaune pâle

Rendement : 91 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v) : 0.25

Point de fusion :

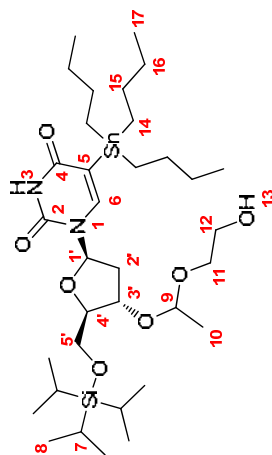
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 834, 987, 1115, 1225, 1324, 1388, 1437, 1545, 1725, 2934, 3362

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.10 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{13}), 2.32-2.41 (m, 2H, H_2), 2.65-2.89 (m, 6H, H_{11} , H_{12} , H_{14}), 3.59 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{15}), 3.80-3.96 (m, 2H, H_5), 4.10-4.13 (m, 1H, H_4), 4.26 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_{10}), 5.15-5.20 (m, 1H, H_3), 6.12 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, 6 Hz, H_7), 7.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{23}), 8.08 (dd, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{24}), 8.23 (s, 1H, H_6), 8.32 (ls, 1H, H_{16}), 8.61 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{22}), 9.63 (s, 1H, H_{20})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.1 (C_{13}), 37.7 (C_{15}), 38.1 (C_2), 48.4 (C_{12}), 52.1, 52.9 (C_{11} , C_{14}), 62.5 (C_5), 66.8 (C_{10}), 68.8 (C_3), 78.4 (C_3), 85.3 (C_4), 86.5 (C_{17}), 98.3 (C_{23}), 130.9 (C_{25}), 138.6 (C_{22}), 138.7 (C_{25a}), 139.9 (C_{24}), 144.1 (C_{21a}), 144.4 (C_{19}), 144.7 (C_{20}), 145.6 (C_6), 150.1 (C_2), 154.6 (C_9), 160.2 (C_4), 163.2 (C_{17})

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 795.01$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 795.32$

3'-O-(1-2-(hydroxy)éthoxy)éthyl)-5-tributylstannyll-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **32**



A une solution de **20** (500 mg, 0.84 mmol) dans le dioxane anhydre (25 mL) dégazée sous argon sont ajoutés le Sn_2Bu_6 (928 μL , 1.84 mmol) et le $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (30 mg, 0.04 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le mélange est filtré sur Celite® 545 et cette dernière rincée avec 2x50 mL d'AcOEt. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **32** (304 mg, 0.40 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 48 %

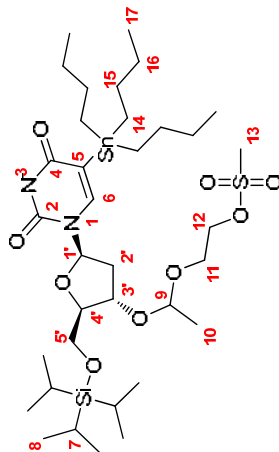
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : 0.30

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (m, 9H, H_{17}), 1.03-1.10 (m, 27H, H_7 , H_8 , H_{14}), 1.22-1.61 (m, 15H, H_{10} , H_{15} , H_{16}), 1.91-2.25 (m, 1H, H_2), 2.44-2.61 (m, 1H, H_2), 3.55-3.93 (m, 6H, H_5 , H_{11} , H_{12}), 4.05-4.17 (m, 1H, H_4), 4.41-4.52 (m, 1H, H_3), 4.86 (q, 1H, $J = 5$ Hz, H_9), 6.12-6.21 (m, 1H, H_{17}), 7.11-7.13 (s, 1H, H_6), 8.08-8.10 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 10.0 ($J_{\text{C-Sr}} = 172$ Hz, 3C_{14}), 12.0 (3C_7), 13.8 (3C_{17}), 18.1 (6C_8), 20.1 (C_{10}), 27.4 ($J_{\text{C-Sr}} = 30$ Hz, 3C_{15}), 29.0 (3C_{16}), 37.6, 38.1 (C_2), 62.0 (C_{12}), 63.8 (C_5), 65.7, 66.4 (C_{11}), 75.0 (C_3), 85.5, 85.7 (C_4), 85.9 (C_1), 99.2, 99.7 (C_9), 112.9 (C_5), 143.1 (C_6), 151.1 (C_2), 166.3 (C_4)

IES-SM : $[\text{M}-\text{H}]_{\text{th}}^- = 761.36$ et $759.36 / [\text{M}-\text{H}]_{\text{mes}}^- = 761.14$ et 759.16

3'-O-(1-2-(méthylsulfonyloxy)éthoxy)éthyl)-5-tributylstannyll-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **33**



A une solution de **32** (510 mg, 0.67 mmol), de pyridine (162 μL , 2.01 mmol) et de DMAP (8 mg, 0.07 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (10 mL) est ajouté sous argon le MsCl (114 μL , 1.47 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 7 h puis versé dans 100 mL d'eau et 20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl . Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **33** (426 mg, 0.51 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 76 %

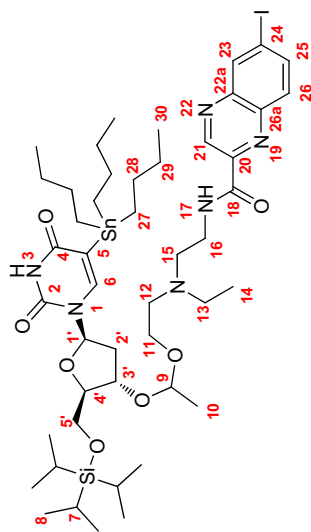
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 45/55, v/v) : 0.35

IR (KBr , ν (cm^{-1})) : 684, 197, 882, 922, 1095, 1177, 1274, 1355, 1672, 1725, 2955

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (t, 9H, $J = 7$ Hz, H_{17}), 0.99-1.13 (m, 27H, H_7 , H_8 , H_{14}), 1.22-1.43 (m, 9H, H_{10} , H_{15}), 1.46-1.56 (m, 6H, H_{16}), 1.94-2.16 (m, 1H, H_2), 2.39-2.51 (m, 1H, H_2), 3.03 et 3.04 (2xs, 3H, H_{13}), 3.79-3.94 (m, 4H, H_5 , H_{11}), 4.03-4.10 (m, 1H, H_4), 4.35 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{12}), 4.45 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 4.86 (q, 1H, $J = 5$ Hz, H_9), 6.12-6.22 (m, 1H, H_{17}), 7.09 et 7.13 (2xs, 1H, H_6), 7.87 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 10.0 ($J_{\text{C-Sr}} = 171$ Hz (^{117}Sn), 179 Hz (^{119}Sn), 3C_{14}), 12.0 (3C_7), 13.8 (3C_{17}), 18.1 (6C_8), 20.0 (C_{10}), 27.4 ($J_{\text{C-Sr}} = 30$ Hz, 3C_{15}), 29.1 ($J_{\text{C-Sr}} = 10$ Hz, 3C_{16}), 37.5-38.0 (C_2), 37.7 (C_{13}), 61.9, 62.7 (C_{11}), 63.8 (C_5), 69.0, 69.2 (C_{12}), 75.1, 76.5 (C_3), 85.5, -85.7, 85.8 (C_1 , C_4), 99.1, 99.3 (C_9), 112.9, 113.0 (C_5), 143.0 (C_6), 151.0 (C_2), 166.1 (C_4)

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)éthyl)-5-tributylstannyl-2'-déoxyuridine **34**



A une solution de **33** (330 mg, 0.39 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL) sont ajoutés sous argon l'amine secondaire **13** (218 mg, 0.59 mmol) et la DIPEA (103 μ L, 0.59 mmol). Le mélange est agité à 55 °C pendant 6 jours puis versé dans 65 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **34** (100 mg, 0.09 mmol).

Aspect : huile brune

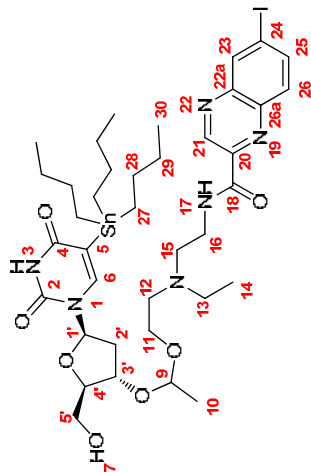
Rendement : 23 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane/triéthylamine, 85/15/2, v/v/v) : 0.35

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.92 (t, 9H, *J* = 7 Hz, H₁₇), 0.99-1.11 (m, 27H, H₇, H₈, H₁₄), 1.22-1.36 (m, 9H, H₁₀, H₁₅), 1.43-1.68 (m, 6H, H₁₆), 1.94-2.11 (m, 1H, H₂), 2.34-2.51 (m, 1H, H₂), 2.61-2.80 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.49-3.71 (m, 4H, H₅, H₁₁, H₁₂), 4.04-4.08 (m, 1H, H₄), 4.37-4.41 (m, 2H, H₃), 4.80 (q, 1H, *J* = 5 Hz, H₉), 6.13-6.17 (m, 1H, H₁), 7.10 et 7.13 (2xs, 1H, H₆), 7.82 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₆), 7.87 et 7.89 (2xls, 1H, H₃), 8.08 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₅), 8.38 (ls, 1H, H₁₇), 8.61 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₂₃), 9.64 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 9.9 (*J*_{C-Sn} = 171 Hz (¹¹⁹Sn), 179 Hz (¹¹⁷Sn), 3C₂₇), 12.0 (3C₃₀), 13.8 (3C₃₀), 18.1 (6C₈), 20.2 (C₁₀), 27.3 (*J*_{C-Sn} = 30 Hz, 3C₂₈), 29.0 (*J*_{C-Sn} = 10 Hz, 3C₂₉), 37.6, 38.1 (C₂, C₁₆), 48.6 (C₁₃), 52.9, 53.2 (C₁₂, C₁₅), 63.3, 63.8, 64.0 (C₅, C₁₁), 74.6, 75.9 (C₃), 85.5, 85.6, 85.7 (C₁, C₄), 98.0 (C₂₄), 99.2, 99.5 (C₉), 112.8, 112.9 (C₅), 112.9, 113.0 (C₅), 130.8 (C₂₆), 138.6 (C₂₃), 139.6 (C_{26a}), 139.7 (C₂₁), 142.9 (C₆), 144.2, 144.4 (C₂₀, C_{22a}), 144.8 (C₂₁), 151.1 (C₂), 163.0 (C₁₈), 166.4 (C₄)

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)éthyl)-5-tributylstannyl-2'-déoxyuridine **30**



A une solution de **34** (190 mg, 0.17 mmol) dans le THF anhydre (6 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 257 μ L, 0.26 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h, puis versé dans 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x10 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **30** (138 mg, 0.14 mmol).

Aspect : meringue brun clair

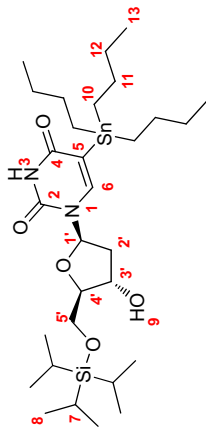
Rendement : 84 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane/triéthylamine, 90/10/2, v/v/v) : 0.26

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.84 (t, 9H, *J* = 7 Hz, H₃₀), 0.96-1.06 (m, 9H, H₁₄, H₂₇), 1.20-1.28 (m, 9H, H₁₀, H₂₈), 1.43-1.52 (m, 6H, H₂₉), 2.27-2.40 (m, 2H, H₂), 2.61-2.80 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₅), 3.47-3.65 (m, 4H, H₁₁, H₁₆), 3.76-3.82 (m, 2H, H₅), 3.99-4.08 (m, 1H, H₄), 4.50-4.54 (m, 1H, H₃), -4.82 (m, 1H, H₉), 6.07 (t, 1H, *J* = 6 Hz, H₁), 7.30-7.34 (s, 1H, H₆), 7.78 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₆), 8.05 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₅), 8.35-8.41 (m, 1H, H₁₇), 8.58 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 9.60 (s, 1H, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 9.9 (*J*_{C-Sn} = 171 Hz (¹¹⁷Sn), 179 Hz (¹¹⁹Sn), 3C₂₇), 11.8, 12.0 (C₁₄), 13.8 (3C₃₀), 20.1, 20.3 (C₁₀), 27.3 (*J*_{C-Sn} = 30 Hz, 3C₂₈), 29.0 (*J*_{C-Sn} = 10 Hz, 3C₂₉), 37.7 (C₁₆), 38.0, 38.9 (C₂), 48.8, 48.9 (C₁₃), 53.1, 53.3 (C₁₂, C₁₅), 62.2, 62.6 (C₅), 63.1, 64.2 (C₁₁), 73.9, 74.9 (C₃), 85.6, 85.9 (C₄), 87.1, 87.5 (C₁), 98.2 (C₂₄), 99.4, 99.5 (C₉), 112.8, 113.0 (C₅), 129.8 (C₂₆), 138.7 (C₂₃), 139.6 (C_{26a}), 139.9 (C₂₅), 144.0, 144.5 (C₂₀, C_{22a}), 144.7 (C₂₁), 144.8, 145.0 (C₆), 151.1 (C₂), 163.2 (C₄), 166.4 (C₁₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 959.26 et 957.26 / [M+H]⁺_{mes} = 959.43 et 957.42



A une solution de **5** (500 mg, 0.98 mmol) et de Sn_2Bu_6 (1.09 mL, 2.16 mmol) dans le dioxane anhydre (25 mL) dégazée sous argon est ajouté le $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (34 mg, 0.05 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 5 h 30. Après retour à température ambiante, le mélange est filtré sur Célite® 545, qui est rincée avec 3x30 mL d'AcOEt. Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **35** (321 mg, 0.48 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

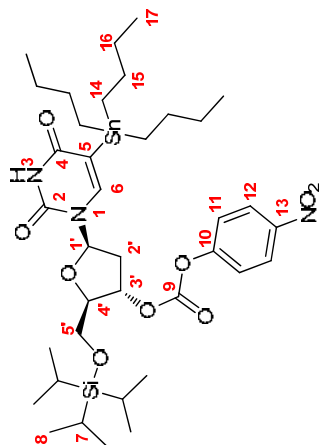
Rendement : 49 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 32/68, v/v) : 0.28

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (t, 9H, $J = 7$ Hz, H_{13}), 0.99-1.18 (m, 27H, H_7 , H_8 , H_{10}), 1.22-1.40 (m, 6H, H_{11}), 1.43-1.56 (m, 6H, H_{12}), 2.15 (d, 1H, $J = 3$ Hz, H_6), 2.17-2.28 (m, 1H, H_2), 2.38-2.50 (m, 1H, H_2), 3.70 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 7 Hz, H_5), 3.91-4.07 (m, 2H, H_4 , H_5), 4.43-4.52 (m, 1H, H_3), 6.22 (t, 1H, $J = 7$ Hz, H_1), 7.09 (s, 1H, H_6), 7.97 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 10.0 ($^1J_{\text{C-Sn}} = 171$ Hz (^{117}Sn), 179 Hz (^{119}Sn), 3C $_{10}$), 12.0 (3C $_7$), 13.8 (3C $_{13}$), 18.1 (6C $_8$), 27.4 ($^2J_{\text{C-Sn}} = 29$ Hz (^{117}Sn), 30 Hz (^{119}Sn), 3C $_{11}$), 29.1 ($^3J_{\text{C-Sn}} = 10$ Hz, 3C $_{12}$), 39.9 (C $_2$), 64.5 (C $_5$), 73.1 (C $_3$), 85.4 (C $_1$), 86.1 (C $_4$), 113.0 (C $_5$), 143.2 (C $_6$), 151.1 (C $_2$), 166.3 (C $_4$)

3'-O-(((4-nitrophényloxy)carbonyl)-5-tributylstannyl-5'-O-(triisopropylsilyl)-2'-déoxyuridine **36**



A une solution de **35** (286 mg, 0.43 mmol) et de chloroformate de *p*-nitrophényle (90 mg, 0.45 mmol) dans le THF anhydre (7.5 mL) est additionnée sous argon une solution de pyridine (69 μ L, 0.85 mmol) dans le THF anhydre (4 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 60 mL d'eau et 20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 30 mL d'eau et 40 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **36** (218 mg, 0.26 mmol).

Aspect : solide pâteux blanc

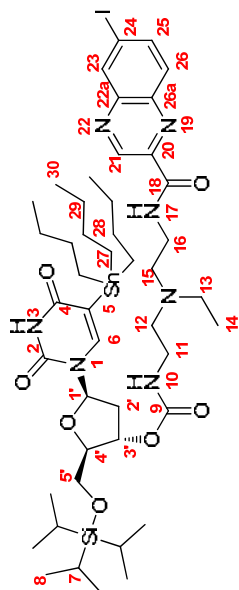
Rendement : 61 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 20/80, v/v) : 0.32

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (t, 9H, $J = 7$ Hz, H_{17}), 1.00-1.18 (m, 27H, H_7 , H_8 , H_{14}), 1.26-1.40 (m, 6H, H_{15}), 1.43-1.56 (m, 6H, H_{16}), 2.20-2.35 (m, 1H, H_2), 2.69 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 6 Hz, H_2), 3.86 (dd, 1H, $J = 11$ Hz, 5 Hz, H_5), 4.04 (dd, 1H, $J = 11$ Hz, 4 Hz, H_5), 4.28-4.32 (m, 1H, H_4), 5.43 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 5.44 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 7.22 (s, 1H, H_6), 7.40 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_{11}), 8.30 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_{12}), 8.46 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 10.0 ($J_{\text{C-Sr}} = 171$ Hz (^{119}Sn), 179 Hz (^{117}Sn), 3C $_{14}$), 12.0 (3C $_{17}$), 13.8 (3C $_{17}$), 18.1 (6C $_8$), 27.4 ($J_{\text{C-Sr}} = 29$ Hz (^{117}Sn), 31 Hz (^{119}Sn), 3C $_{15}$), 29.1 ($J_{\text{C-Sr}} = 10$ Hz, 3C $_{16}$), 37.7 (C $_2$), 63.6 (C $_5$), 79.7 (C $_3$), 84.5 (C $_4$), 85.4 (C $_1$), 113.3 (C $_5$), 121.8 (2C $_{11}$), 125.7 (2C $_{12}$), 142.6 (C $_6$), 145.7 (C $_{13}$), 151.1 (C $_2$), 152.0 (C $_9$), 155.3 (C $_{10}$), 166.2 (C $_4$)

3'-O-(((2-(éthyl-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)carbonyl)-5-tributylstannyl-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **37**



A une solution de **36** (142 mg, 0.17 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (2 mL) est additionnée sous argon une solution de **25** (70 mg, 0.17 mmol) et de DMAP (27 mg, 0.22 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (2 mL). Le mélange est agité à TA pendant 16 h puis versé dans 40 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x10 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x20 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **37** (90 mg, 0.08 mmol).

Aspect : caramel brun

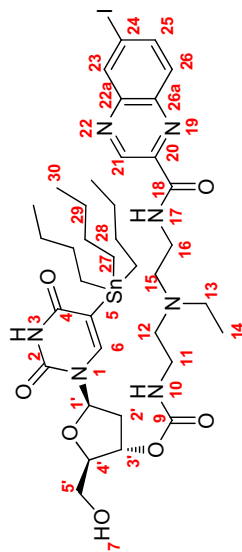
Rendement : 48 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/triéthylamine, 99/1/2, v/v/v) : 0.31

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (t, 9H, $J = 7$ Hz, H_{30}), 1.00-1.11 (m, 30H, H_7 , H_8 , H_{14} , H_{27}), 1.22-1.37 (m, 6H, H_{28}), 1.44-1.56 (m, 6H, H_{29}), 1.97-2.11 (m, 1H, H_2), 2.37 (dd, 1H, $J = 13$ Hz, 5 Hz, H_2), 2.60-2.78 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{15}), 3.27 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{11}), 3.59 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{16}), 3.86 (dd, 1H, $J = 12$ Hz, 6 Hz, H_5), 3.90-3.96 (m, 2H, H_4 , H_5), 5.23 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 5.44 (t, 1H, $J = 5$ Hz, 5 Hz, H_{10}), 5.96 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 7.21 (s, 1H, H_6), 7.84 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{26}), 7.92 (ls, 1H, H_3), 8.11 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{25}), 8.24 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_{17}), 8.61 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{23}), 9.66 (s, 1H, H_{21})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 9.9 ($J_{\text{C-Sr}} = 171$ Hz (^{117}Sn), 179 Hz (^{119}Sn), 3C $_{27}$), 11.8 (C $_{14}$), 12.0 (3C $_{30}$), 13.8 (3C $_7$), 18.1 (6C $_8$), 27.3 ($J_{\text{C-Sr}} = 29$ Hz (^{117}Sn), 31 Hz (^{119}Sn), 3C $_{28}$), 29.0 ($J_{\text{C-Sr}} = 10$ Hz, 3C $_{29}$), 37.4 (C $_{16}$), 38.0 (C $_2$), 39.1 (C $_{11}$), 47.6 (C $_{13}$), 52.5, 52.7 (C $_{12}$, C $_{15}$), 63.8 (C $_5$), 75.1 (C $_3$), 85.1, 85.2 (C $_1$, C $_4$), 98.2 (C $_{24}$), 113.0 (C $_5$), 130.7 (C $_{26}$), 138.6 (C $_{23}$), 139.5 (C $_{26a}$), 140.0 (C $_{25}$), 142.6 (C $_6$), 143.9, 144.5 (C $_{20}$, C $_{22a}$), 144.7 (C $_{21}$), 151.3 (C $_2$), 155.6 (C $_9$), 163.1 (C $_4$), 166.4 (C $_{18}$)

3'-O-((2-(éthyl-(2-(((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino)carbonyl-5-tributylstannyl-2'-déoxyuridine **31**



A une solution de **37** (90 mg, 0.17 mmol) dans le THF anhydre (3 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 162 μ L, 0.16 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **31** (67 mg, 0.07 mmol).

Aspect : huile pâteuse brun clair

Rendement : 86 %

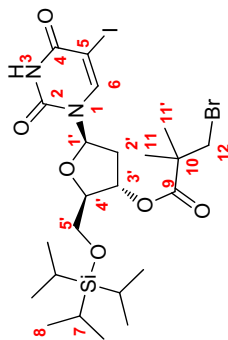
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 97/3/0.5, v/v/v) : 0.41

^1H RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.89 (t, 9H, $J = 7$ Hz, H_{30}), 1.00-1.11 (m, 9H, H_{14} , H_{27}), 1.22-1.36 (m, 6H, H_{28}), 1.44-1.56 (m, 6H, H_{29}), 2.17-2.44 (m, 2H, H_2), 2.60-2.78 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{15}), 3.27 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{11}), 3.59 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{16}), 3.82-3.89 (m, 2H, H_5), 3.92-3.99 (m, 1H, H_4), 5.19 (m, 1H, H_3), 5.44 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H_{10}), 6.03-6.10 (m, 1H, H_1), 7.37 (s, 1H, H_6), 7.84 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{26}), 8.11 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{25}), 8.21 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_{17}), 8.62 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{23}), 9.66 (s, 1H, H_{21})

^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 9.9 ($J_{\text{C-Sn}} = 171$ Hz (^{17}Sn), 179 Hz (^{119}Sn), 3C_{27}), 17.7 (C_{14}), 13.8 (3C_{30}), 27.3 ($J_{\text{C-Sn}} = 30$ Hz (^{17}Sn), 31 Hz (^{119}Sn), 3C_{28}), 29.0 ($J_{\text{C-Sn}} = 10$ Hz, 3C_{29}), 37.4 (C_{16}), 37.5 (C_2), 39.1 (C_{11}), 47.7 (C_{13}), 52.5, 52.6 (C_{12} , C_{15}), 62.8 (C_5), 75.6 (C_3), 85.5 (C_4), 86.2 (C_1), 98.3 (C_{24}), 113.3 (C_3), 130.7 (C_{26}), 138.6 (C_{23}), 139.5 (C_{26a}), 140.0 (C_{25}), 143.9, 144.5 (C_{20} , C_{22a}), 144.4 (C_6), 144.6 (C_2), 151.3 (C_2), 155.9 (C_9), 163.2 (C_4), 166.5 (C_{18})

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+$ th = 958.24 / $[\text{M}+\text{H}]^+$ mes = 958.29, $[\text{M}-\text{H}]^-$ th = 956.22 / $[\text{M}-\text{H}]^-$ mes = 956.14

3'-O-(3-bromo-2,2-diméthylpropanoyl)-5-iodo-5'-O-trisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **43**



A une solution de **5** (500 mg, 0.98 mmol), d'acide 3-bromo-2,2-diméthylpropanoïque (193 mg, 181.03 mmol) et de DMAP (13 mg, 0.11 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (8,5 mL) refroidie à 0 °C est additionnée sous argon une solution de DCC (220 mg, 1.07 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (4 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 15 minutes puis à TA pendant 48 h. Le milieu réactionnel est versé dans 50 mL de solution aqueuse d'HCl 0.1N. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x15 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **43** (503 mg, 0.75 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 76 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.28

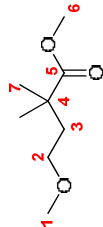
Point de fusion :

IR (KBr, ν (cm^{-1})) :

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.07-1.29 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.34 (s, 3H, H_{11} ou $\text{H}_{11'}$), 1.35 (s, 3H, H_{11} ou $\text{H}_{11'}$), 1.99-2.21 (m, 1H, H_2), 2.48-2.58 (m, 1H, H_2), 3.48-3.56 (m, 2H, H_{12}), 4.01-4.04 (m, 2H, H_5), 4.10-4.16 (m, 1H, H_4), 5.39 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 6.28 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 8.10 (s, 1H, H_6), 8.30 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.0 (3C_7), 18.2 (6C_8), 24.1, 24.2 (2C_{11}), 38.6 (C_2), 41.0 (C_5), 69.2 (C_3), 75.8 (C_3), 85.5 (C_4), 86.1 (C_1), 143.9 (C_6), 150.2 (C_2), 160.2 (C_4), 174.6 (C_9)

4-méthoxy-2,2-diméthylbutanoate de méthyle **45**



Une solution d' α,α -diméthyl- γ -butyrolactone (2.280 g, 20 mmol), de triméthylorthoformate (4.4 mL, 40 mmol) et d' H_2SO_4 (50 μL , 1 mmol) dans le méthanol anhydre (20 mL) est agitée à 50 °C pendant 17 h et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris avec 75 mL d'AcOEt puis lavé avec 75 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 75 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **45** (2.660 g, 16.60 mmol).

Aspect : huile incolore

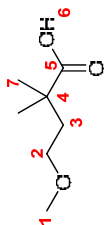
Rendement : 86 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 10/90, v/v) : 0.30

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.18 (s, 6H, H_7), 1.81 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_3), 3.26 (s, 3H, H_1), 3.36 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_5), 3.65 (s, 3H, H_6)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 25.1 (2C_7), 39.7 (C_3), 40.3 (C_4), 51.2 (C_6), 58.1 (C_1), 69.1 (C_2), 177.5 (C_5)

Acide 4-méthoxy-2,2-diméthylbutanoïque 46



A une solution de 45 (1 g, 6.24 mmol) dans l'éthanol anhydre (10 mL) sont ajoutés le NaOH (262 mg, 6.55 mmol) et l'eau (124 μ L, 6.89 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 2 h 30 puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est versé dans 30 mL de solution aqueuse d'HCl 1N. La solution obtenue est extraite avec 3x15 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à 46 (819 mg, 5.60 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 90 %

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.23 (s, 6H, H_7), 1.86 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_3), 3.30 (s, 3H, H_1), 3.44 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_2), 11.62 (ls, 1H, H_6)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 25.4 (2 C_7), 39.5 (C_3), 40.8 (C_4), 58.7 (C_1), 69.5 (C_2), 184.1 (C_5)

Acide 4-bromo-2,2-diméthylbutanoïque 47



L' α , α -diméthyl- γ -butyrolactone (2.280 g, 20 mmol) est ajouté à une solution d'HBr à 45 % dans l'acide acétique (5.4 mL). Le mélange est agité à 80 °C pendant 5 h puis versé dans 60 mL de mélange glace / eau. La solution obtenue est extraite avec 3x15 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 2x10 mL d'eau puis 2x10 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à 47 (3.100 g, 15.89 mmol).

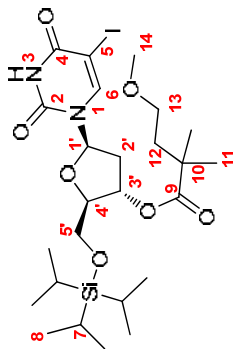
Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 90 %

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.25 (s, 6H, H_6), 2.17 (t, 2H, $J = 8$ Hz, H_2), 3.38 (t, 2H, $J = 8$ Hz, H_1)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 25.0 (2 C_6), 28.1 (C_1), 42.9 (C_3), 43.5 (C_2), 183.9 (C_5)

5-iodo-3'-O-(4-méthoxy-2,2-diméthylbutanoyl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **48**



A une solution de **5** (400 mg, 0.78 mmol), de **47** (229 mg, 1.57 mmol) et de DMAP (19 mg, 0.16 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (6 mL) refroidie à 0 °C est additionnée sous argon une solution de DCC (323 mg, 1.57 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (4 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 30 minutes puis à TA pendant 17 h. Le milieu réactionnel est filtré puis le filtrat est lavé avec 25 mL de solution aqueuse d'HCl 0.1N. La solution obtenue est extraite avec 3x15 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 20 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **48** (273 mg, 0.43 mmol).

Aspect : meringue incolore

Rendement : 54 %

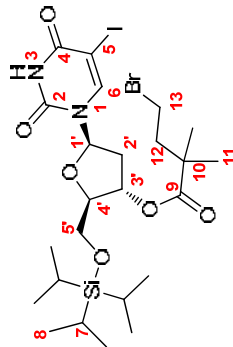
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.32

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 642, 678, 740, 861, 1013, 1077, 1162, 1205, 1242, 1341, 1427, 1462, 1489, 1512, 1591, 1614, 1748, 1912, 3231

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.10-1.19 (m, 21H, H₇, H₈), 1.21 (s, 6H, H₁₁), 1.86 (t, 2H, J = 6 Hz, H₁₂), 2.09-2.26 (m, 1H, H₂), 2.45-2.56 (m, 1H, H₂), 3.25 (s, 3H, H₁₄), 3.40 (t, 2H, J = 6 Hz, H₁₃), 4.00-4.03 (m, 2H, H₅), 4.10-4.14 (m, 1H, H₄), 5.29 (d, 1H, J = 5 Hz, H₃), 6.27 (dd, 1H, J = 9 Hz, 5 Hz, H₁), 8.11 (s, 1H, H₆), 8.33 (ls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇), 18.2 (6C₈), 25.3 (2C₁₁), 38.6 (C₂), 40.0 (C₁₂), 58.7 (C₁₄), 63.8 (C₅), 69.0 (C₅), 69.2 (C₁₃), 75.3 (C₃), 85.6 (C₁), 85.9 (C₄), 144.0 (C₆), 150.2 (C₂), 160.1 (C₄), 177.6 (C₉)

3'-O-(4-bromo-2,2-diméthylbutanoyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **49**



A une solution de **47** (500 mg, 2.56 mmol) et de DMF (20 µL, 0.26 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (6 mL) refroidie à 0 °C est additionnée sous argon une solution de bromure d'oxalyde (1.106 g, 5.13 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (4 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 30 minutes puis à TA pendant 16 h puis le solvant est évaporé sous vide (co-évaporation avec 2x10 mL de toluène anhydre).

Le résidu obtenu est dissout dans 2.5 mL de THF anhydre et 2.5 mL de CH₂Cl₂ anhydre. Cette solution est additionnée à une solution de **5** (300 mg, 0.59 mmol), de DIPEA (205 µL, 1.18 mmol) et de DMAP (7 mg, 0.06 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 60 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄, et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **49** (202 mg, 0.29 mmol).

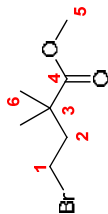
Aspect : meringue blanche

Rendement : 50 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.37

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.98-1.27 (m, 27H, H₇, H₈, H₁₁), 2.11-2.35 (m, 3H, H₂, H₁₂), 2.44-2.54 (m, 1H, H₂), 3.35 (t, 2H, J = 8 Hz, H₁₃), 3.97-4.03 (m, 2H, H₅), 4.07-4.14 (m, 1H, H₄), 5.34 (d, 1H, J = 6 Hz, H₃), 6.27 (dd, 1H, J = 9 Hz, 5 Hz, H₁), 8.09 (s, 1H, H₆), 8.25 (ls, 1H, H₃)

4-bromo-2,2-diméthylbutanoate de méthyle **50**



Voir montage **Figure 58 p108**.

A une suspension de Diazald™ (3.570 g, 16.67 mmol) dans l'éthanol (60 mL) est lentement additionnée une solution aqueuse de NaOH 5N (environ 50 mL) jusqu'à décoloration. Le diazométhane gazeux est transféré sous courant d'argon par bullage dans une solution de **47** (1.951 g, 10 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (80 mL). Le mélange est agité à TA pendant 15 minutes à partir de la fin de l'addition de soude puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **50** (1.376 g, 6.58 mmol).

Aspect : huile incolore

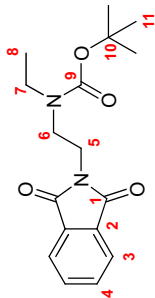
Rendement : 66 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 8/92, v/v) : 0.30

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.20 (s, 6H, H₆), 2.14 (t, 2H, J = 8 Hz, H₂), 3.32 (t, 2H, J = 8 Hz, H₁), 3.68 (s, 3H, H₅)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 25.2 (2C₆), 28.4 (C₁), 42.9 (C₃), 43.8 (C₂), 52.1 (C₅), 177.3 (C₄)

Ethyl-(2-((aminophthalimidy)éthyl)carbamate de *tert*-butyle **52**



A une suspension de **51** (5 g, 19.63 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (100 mL) est ajouté sous argon le K₂CO₃ (5.426 g, 39.26 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis une solution de Boc₂O (6.3 mL, 29.45 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (50 mL) est additionnée sous argon. Le mélange est agité à TA pendant 21 h puis versé dans 300 mL d'eau. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est traitée avec 2x120 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **52** (5.729 g, 17.80 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 92 %

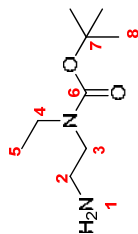
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 70/30, v/v) : 0.33

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 530, 721, 865, 936, 966, 1016, 1109, 1159, 1254, 1280, 1360, 1395, 1469, 1714, 1774, 2251, 2924, 2976

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06-1.14 (m, 3H, H₈), 1.29 (s, 9H, H₁₁), 3.20-3.31 (m, 2H, H₇), 3.46-3.49 (m, 2H, H₆), 3.83 (t, 2H, J = 6 Hz, H₅), 7.71 (m, 2H, H₄), 7.82-7.86 (m, 2H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 13.2 (C₈), 28.2 (3C₁₁), 36.2 (C₅), 41.6 (C₇), 44.4 (C₆), 79.7 (C₁₀), 123.3 (2C₄), 132.2 (2C₃), 133.8, 134.1 (2C₂), 155.0 (C₉), 168.2 (2C₁)

Ethyl-(2-aminoéthyl)carbamate de *tert*-butyle **53**



A une solution de **52** (5.689 g, 17.87 mmol) dans l'éthanol (280 mL) est ajoutée l'hydrazine monohydrate (8.67 mL, 178.69 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis filtré. Le précipité blanc est lavé avec de l'éthanol. Les filtrats sont combinés et évaporés sous vide. 50 mL d' Et_2O sont ajoutés puis le mélange est filtré. Le solide est lavé avec de l'éthanol. Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel d'alumine, conduisant à **53** (2.552 g, 13.56 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 76 %

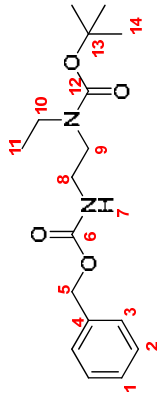
Rf (Al_2O_3 , dichlorométhane/éthanol, 80/20, v/v) : 0.35

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 740, 749, 764, 791, 1160, 1417, 1695, 2978

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_5), 1.10 (ls, 2H, H_1), 1.45 (s, 9H, H_8), 2.80 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_2), 3.20-3.26 (m, 4H, H_3 , H_4)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 13.7 (C_5), 28.5 (3C_8), 41.0 (C_2), 42.4 (C_4), 50.0 (C_3), 79.4 (C_7), 155.8 (C_6)

Ethyl-(2-((benzyloxy)carbonyl(amino)éthyl)carbamate de *tert*-butyle **54**



A une solution de **53** (2.5 g, 13.28 mmol) et de NEt_3 (2.24 mL, 15.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (55 mL) est additionnée sous argon une solution de chloroformate de benzyle (2.718 g, 15.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (20 mL). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans 200 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 25 mL puis 2x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **54** (2.552 g, 13.56 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 92 %

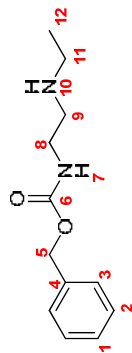
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.32

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 740, 749, 764, 791, 1160, 1417, 1695, 2978

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{11}), 1.44 (s, 9H, H_{14}), 3.21-3.33 (m, 6H, H_8 , H_9 , H_{10}), 5.09 (s, 2H, H_5), 7.34 (m, 5H, H_1 , H_2 , H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 13.9 (C_{11}), 28.5 (3C_{14}), 40.5, 42.8, 46.1 (C_8 , C_9 , C_{10}), 66.7 (C_3), 79.9 (C_{13}), 128.1, 128.6 (C_1 , 2C_2 , 2C_3), 136.7 (C_4), 156.6 (C_6 , C_{12})

(2-(éthylamino)éthyl)carbamate de benzyle **55**



A une solution de **54** (3.816 g, 11.84 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (115 mL) est ajouté sous argon le TFA (9.1 mL, 118.36 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans 300 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **55** (2.409 g, 10.84 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 92 %

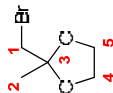
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 60/40/0.75, v/v/v) : 0.20

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 698, 739, 1011, 1141, 1259, 1455, 1537, 1704, 2966, 3312

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{12}), 1.21 (ls, 1H, H_{10}), 2.64 (q, 2H, $J = 7$ Hz, H_{11}), 2.75 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_9), 3.29 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_8), 5.10 (s, 2H, H_5), 5.21 (ls, 1H, H_7), 7.32-7.38 (H_1 , H_2 , H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 15.3 (C_{12}), 40.9 (C_8), 43.8 (C_{11}), 48.8 (C_9), 66.7 (C_5), 128.2, 128.6 (C_1 , 2C_2 , 2C_3), 136.7 (C_4), 156.7 (C_6)

2-(bromométhyl)-2-méthyl-1,3-dioxolane **56**



A une solution d'acétone (11.75 mL, 160 mmol) dans le THF anhydre (192 mL) et l'éthylène glycol (192 mL) est ajouté sous argon le tribromure de phényltriméthylammonium (66.16 g, 176 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 22 h puis versé dans une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10 % (2.5 L) et de Na₂S₂O₃ à 5 % (400 mL). La solution obtenue est extraite avec 3x1.2 L d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 3x600 mL d'eau puis 500 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est distillé sous pression réduite, conduisant à **56** (24.222 g, 133.80 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 84 %

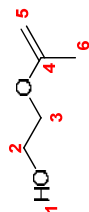
Température d'ébullition : 75 °C à 18 mmHg (corrigé, littérature ^[213] : 73-74 °C à 18 mmHg)

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 501, 531, 673, 837, 887, 917, 950, 1117, 1248, 1380, 1420, 1476, 1719, 2989

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.52 (s, 3H, H₂), 3.40 (s, 2H, H₁), 4.01-4.05 (m, 4H, H₄, H₅)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 22.9 (C₂), 36.7 (C₁), 65.5 (C₄, C₅), 107.5 (C₃)

2-((1-méthyl)vinyloxy)éthanol **57**



Le magnésium en ruban a été poli chimiquement par les lavages séquentiels suivants : solution aqueuse de HNO₃ à 6%, H₂O, EtOH et Et₂O anhydre. Les morceaux ainsi lavés ont été activés dans une solution de I₂ à 2% dans le THF anhydre pendant 2 minutes puis rincés avec du THF anhydre. Le magnésium activé a été placé sous argon dans le THF anhydre (5 mL) et du dibromoéthane (2 gouttes) a été ajouté. Une solution de **56** (1 g, 5.52 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) a été additionnée sous argon et la réaction a été initiée avec un décapeur thermique and le reflux doux a été entretenu par l'addition continue de la solution de **56**. Le mélange a été agité à 50 °C pendant 1 h après la fin de l'addition puis NEt₃ (2.3 mL, 16.56 mmol) a été ajoutée sous argon. Le mélange a été agité à TA pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été versé dans du CH₂Cl₂ (150 mL) et le mélange a été lavé avec 2x50 mL d'eau puis 2x50 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant évaporé sous vide.

Le résidu est distillé sous pression réduite, conduisant à **57** (200 mg, 1.96 mmol).

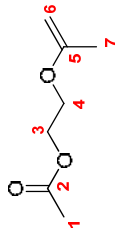
Aspect : huile incolore

Rendement : 35 %

Température d'ébullition : 73 °C à 18 mmHg

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.84 (s, 3H, H₆), 1.98 (t, 1H, J = 5 Hz, H₁), 3.74-3.94 (m, 6H, H₂, H₃, H₅)

Acétate de 2-((1-méthylvinyl)oxy)éthyle **58**



Le magnésium en ruban a été poli chimiquement par les lavages séquentiels suivants : solution aqueuse de HNO₃ à 6%, H₂O, EtOH et Et₂O anhydre. Les morceaux ainsi lavés ont été activés dans une solution de I₂ à 2% dans le THF anhydre pendant 2 minutes puis rincés avec du THF anhydre. Le magnésium activé a été placé sous argon dans le THF anhydre (10 mL) et du dibromoéthane (2 gouttes) a été ajouté. Une solution de **56** (2 g, 11.04 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) a été additionnée sous argon et la réaction a été initiée avec un décapeur thermique and le reflux doux a été entrete nu par l'addition continue de la solution de **56**. Le mélange a été agité à 50 °C pendant 1 h après la fin de l'addition puis NEt₃ (4.7 mL, 33.12 mmol) a été ajoutée sous argon. Le mélange a été agité à TA pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été versé dans du CH₂Cl₂ (300 mL) et le mélange a été lavé avec 2x100 mL d'eau puis 2x100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant évaporé sous vide.

Le résidu obtenu est mis en solution dans la pyridine anhydre (15 mL) puis la DMAP (10 mg, 0.08 mmol) et l'Ac₂O (1.93 mL, 20.72 mmol) sont ajoutés sous argon. Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé précautionneusement sous agitation dans 80 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x25 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 2x30 mL d'eau puis 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **58** (717 mg, 4.97 mmol).

Aspect : huile jaune

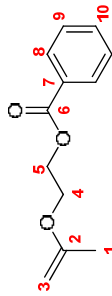
Rendement : 45 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 10/90, v/v) : 0.32

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.83 (s, 3H, H₇), 2.08 (s, 3H, H₁), 3.82-3.87 (m, 4H, H₄, H₆), 4.30 (t, 2H, J = 5 Hz, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 21.0 (C₁, C₇), 62.8 (C₃), 65.3 (C₄), 81.9 (C₆), 159.7 (C₅), 171.1 (C₂)

Benzoate de 2-((1-méthylvinyl)oxy)éthyle **59**



Le magnésium en ruban a été poli chimiquement par les lavages séquentiels suivants : solution aqueuse de HNO₃ à 6%, H₂O, EtOH et Et₂O anhydre. Les morceaux ainsi lavés ont été activés dans une solution de I₂ à 2% dans le THF anhydre pendant 2 minutes puis rincés avec du THF anhydre. Le magnésium activé a été placé sous argon dans le THF anhydre (15 mL) et du dibromoéthane (2 gouttes) a été ajouté. Une solution de **56** (3 g, 16.57 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) a été additionnée sous argon et la réaction a été initiée avec un décapeur thermique and le reflux doux a été entrete nu par l'addition continue de la solution de **56**. Le mélange a été agité à 50 °C pendant 1 h après la fin de l'addition puis NEt₃ (7.0 mL, 49.71 mmol) a été ajoutée sous argon. Le mélange a été agité à TA pendant 1 h puis refroidi à 0 °C. Une solution de BzCl (2.565 g, 18.23 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) a été additionnée à 0 °C sous argon puis le mélange a été agité à TA pendant 16 h. Le milieu réactionnel a été versé dans du CH₂Cl₂ (300 mL) et le mélange a été lavé avec 2x100 mL d'eau puis 2x100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **59** (1.876 g, 9.10 mmol).

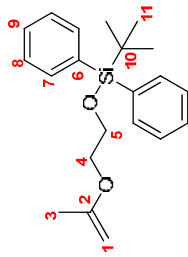
Aspect : huile jaune

Rendement : 55 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 8/92, v/v) : 0.30

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.85 (s, 3H, H₁), 3.87-3.91 (m, 2H, H₃), 4.00 (t, 2H, J = 5 Hz, H₄), 4.57 (t, 2H, J = 5 Hz, H₅), 7.41-7.47 (m, 2H, H₉), 7.48-7.57 (m, 1H, H₁₀), 8.05-8.09 (m, 2H, H₈)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 20.8 (C₁), 63.1 (C₅), 65.2 (C₄), 81.8 (C₃), 128.3, 129.6 (2C₈, 2C₉), 130.0 (C₇), 133.0 (C₁₀), 159.5 (C₂), 166.3 (C₆)



Le magnésium en ruban a été poli chimiquement par les lavages séquentiels suivants : solution aqueuse de HNO₃ à 6%, H₂O, EtOH et Et₂O anhydre. Les morceaux ainsi lavés ont été activés dans une solution de I₂ à 2% dans le THF anhydre pendant 2 minutes puis rincés avec du THF anhydre. Le magnésium activé a été placé sous argon dans le THF anhydre (10 mL) et du dibromoéthane (2 gouttes) a été ajouté. Une solution de **56** (2 g, 11.04 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) a été additionnée sous argon et la réaction a été initiée avec un décapeur thermique and le reflux doux a été entreteu par l'addition continue de la solution de **56**. Le mélange a été agité à 50 °C pendant 1 h après la fin de l'addition puis NEt₃ (4.7 mL, 33.12 mmol) a été ajoutée sous argon. Le mélange a été agité à TA pendant 1 h puis refroidi à 0 °C. L'imidazole (1.127 g, 16.56 mmol) a été ajouté puis une solution de TBDPSCI (3.2 mL, 12.14 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) a été additionnée à 0 °C sous argon puis le mélange a été agité à TA pendant 16 h. Le milieu réactionnel a été versé dans du CH₂Cl₂ (300 mL) et le mélange a été lavé avec 2x100 mL d'eau puis 2x100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **60** (2.496 g, 7.33 mmol).

Aspect : huile incolore

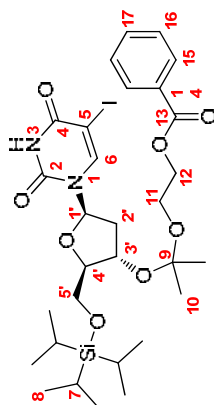
Rendement : 66 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 6/94, v/v) : 0.30

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06 (s, 9H, H₁₁), 1.81 (s, 3H, H₃), 3.74-3.94 (m, 6H, H₁, H₄, H₅), 7.33-7.44 (m, 6H, H₈, H₉), 7.68-7.74 (m, 4H, H₇)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 19.4 (C₁₀), 21.0 (C₃), 26.9 (3C₁₁), 62.7 (C₅), 68.5 (C₄), 81.3 (C₁), 127.8 (4C₈), 129.8 (2C₉), 133.8 (C₆), 135.8 (4C₇), 159.9 (C₂)

3'-O-(1-(2-(benzoyloxy)éthoxy)-1-méthyléthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **61**



A une solution de **5** (1.5 g, 2.94 mmol) et d'acide camphorsulfonique (27 mg, 0.12 mmol) dans le THF anhydre (50 mL) est additionnée sous argon une solution de **59** (1.818 g, 8.82 mmol) dans le THF anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 200 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **61** (851 mg, 1.19 mmol).

Aspect : meringue blanche

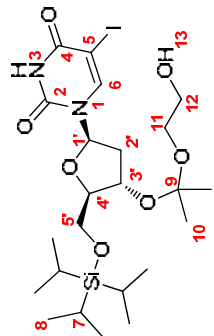
Rendement : 40 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.31

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.03-1.25 (m, 21H, H₇, H₈), 1.37 (s, 6H, H₁₀), 2.00-2.08 (m, 1H, H₂), 2.38-2.48 (m, 1H, H₂), 3.73-3.86 (m, 4H, H₅, H₁₁), 4.06-4.08 (m, 1H, H₄), 4.40-4.53 (m, 3H, H₃, H₁₂), 6.21 (dd, 1H, J = 8 Hz, 5 Hz, H₁), 7.35-7.42 (m, 2H, H₁₆), 7.49-7.53 (m, 1H, H₁₇), 7.94 (s, 1H, H₆), 7.97-8.01 (m, 2H, H₁₅), 9.81 (ls, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.1 (6C₈), 25.4, 25.7 (2C₁₀), 40.5 (C₂), 59.6 (C₁₁), 63.34 (C₅), 64.2 (C₁₂), 68.7 (C₃), 71.1 (C₃), 85.8 (C₁), 87.0 (C₄), 101.2 (C₉), 128.4 (C₁₆), 129.6 (C₁₅), 130.0 (C₁₄), 133.1 (C₁₇), 144.1 (C₆), 150.2 (C₂), 160.2 (C₄), 166.5 (C₁₃)

3'-O-(1-(2-hydroxyéthoxy)-1-méthyléthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **62**



A une solution de **61** (851 mg, 1.19 mmol) dans l'éthanol anhydre (26 mL) est ajouté sous argon le LiOH (86 mg, 3.56 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 100 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 50 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 4x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **62** (632 mg, 1.03 mmol).

Aspect : meringue blanche

Rendement : 87 %

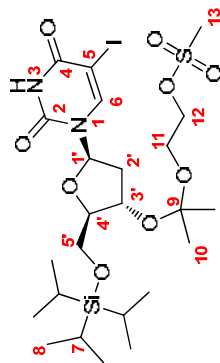
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane/triéthylamine, 70/30/1, v/v/v) : 0.31

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 605, 689, 793, 882, 942, 1002, 1053, 1092, 1116, 1202, 1255, 1271, 1291, 1454, 1674, 1713, 2865, 2942, 3056, 3568

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.09-1.29 (m, 21H, H₇, H₈), 1.39 (s, 6H, H₁₀), 1.95 (t, 1H, J = 6 Hz, H₁₃), 2.00-2.09 (m, 1H, H₂), 2.40-2.49 (m, 1H, H₂), 3.55 (t, 2H, J = 5 Hz, H₁₁), 3.68-3.76 (m, 2H, H₁₂), 3.84-4.01 (m, 2H, H₅), 4.02-4.11 (m, 1H, H₄), 4.56 (d, 1H, J = 6 Hz, H₃), 6.24 (dd, 1H, J = 9 Hz, 5 Hz, H₁), 8.06 (s, 1H, H₆), 8.44 (ls, 1H, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.0 (3C₇), 18.2 (6C₈), 25.7, 25.8 (2C₁₀), 40.7 (C₂), 62.1 (C₁₂), 62.6 (C₁₁), 63.7 (C₅), 68.7 (C₃), 71.4 (C₃), 86.1 (C₁), 87.2 (C₄), 101.2 (C₉), 144.3 (C₆), 150.2 (C₂), 160.1 (C₄)

5-iodo-3'-O-(1-méthyl-1-(2-((méthylsulfonyl)oxy)éthoxy)éthyl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **62**



A une solution de **62** (632 mg, 1.03 mmol), de DIPEA (270 μ L, 1.55 mmol) et de DMAP (13 mg, 0.10 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (13 mL) est ajouté sous argon le MsCl (96 μ L, 1.24 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 20 h puis versé dans 100 mL d'eau + 20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 20 mL puis 2x40 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **63** (629 mg, 0.91 mmol).

Aspect : meringue blanche

Rendement : 88 %

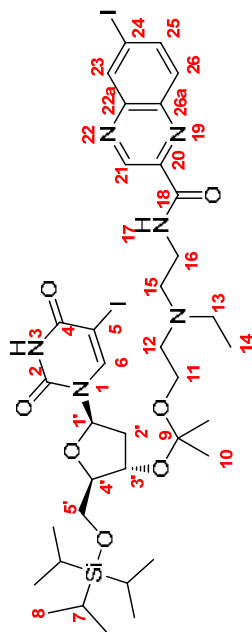
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 60/40, v/v) : 0.34

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 606, 689, 794, 883, 921, 1003, 1053, 1092, 1116, 1173, 1255, 1271, 1455, 1672, 1714, 2941, 3567

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09-1.29 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.39 (s, 6H, H_{10}), 1.99-2.13 (m, 1H, H_2), 2.34-2.44 (m, 1H, H_2), 3.02 (s, 3H, H_{13}), 3.55 (q, 2H, $J = 5$ Hz, H_{11}), 3.83-3.95 (m, 2H, H_5), 3.99-4.00 (m, 1H, H_4), 4.32 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H_{12}), 4.56 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 6.23 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 8.04 (s, 1H, H_6), 8.44 (ls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.0 (3 C_7), 18.2 (6 C_8), 25.5, 25.7 (2 C_{10}), 37.5 (C_{13}), 40.5 (C_2), 59.5 (C_{11}), 63.5 (C_5), 68.8 (C_3), 69.2 (C_{12}), 71.4 (C_3), 85.9 (C_1), 87.0 (C_4), 101.4 (C_9), 144.1 (C_6), 150.3 (C_2), 160.2 (C_4)

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)amino)éthoxy)-1-méthyléthyl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **64**



A une solution de **63** (629 mg, 0.91 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (19 mL) sont ajoutés sous argon l'amine secondaire **13** (506 mg, 1.37 mmol) et la DIPEA (238 μ L, 1.37 mmol). Le mélange est agité à 50 °C pendant 96 h puis versé dans 170 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 3x60 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **64** (134 mg, 0.14 mmol).

Aspect : meringue beige

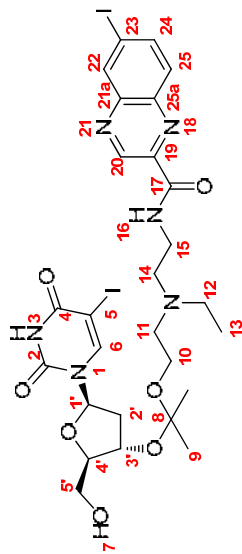
Rendement : 15 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 96/4/0.5, v/v/v) : 0.30

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.09-1.29 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.33 (s, 6H, H_{10}), 1.93-2.00 (m, 1H, H_2), 2.31-2.40 (m, 1H, H_2), 2.60-2.79 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{15}), 3.47-3.61 (m, 4H, H_{11} , H_{16}), 3.80-3.98 (m, 2H, H_5), 4.07-4.08 (m, 1H, H_4), 4.54 (d, 1H, $J = 6$ Hz, H_3), 6.22 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz, H_1), 7.82 (d, 1H, $J = 7$ Hz, H_{26}), 8.03 (s, 1H, H_6), 8.09 (dd, 1H, $J = 7$ Hz, 2 Hz, H_{25}), 8.35 (ls, 1H, H_{17}), 8.62 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{23}), 9.65 (s, 1H, H_{21})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.0 (3 C_7), 12.3 (C_{14}), 18.3 (6 C_8), 25.6, 25.9 (2 C_{10}), 37.5 (C_{16}), 40.8 (C_2), 48.8 (C_{13}), 53.1, 53.4 (C_{12} , C_{15}), 60.1 (C_{11}), 63.7 (C_5), 68.7 (C_3), 71.1 (C_3), 85.9 (C_1), 87.3 (C_4), 98.1 (C_{24}), 101.1 (C_9), 130.8 (C_{26}), 138.7 (C_{23}), 139.6 (C_{26a}), 139.9 (C_{25}), 144.2 (C_6), 144.2, 144.5 (C_{20b} , C_{22a}), 144.8 (C_{21}), 150.0 (C_2), 160.0 (C_4), 163.0 (C_{18})

3'-O-(1-(2-(éthyl(2-((6-iodoquinoxalin-2-yl)carbonyl)amino)éthyl)éthoxy)amino)éthoxy)-1-méthyléthyl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **40**



A une solution de **64** (134 mg, 0.14 mmol) dans le THF anhydre (4 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 348 μ L, 0.35 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **40** (91 mg, 0.11 mmol).

Aspect : meringue beige

Rendement : 81 %

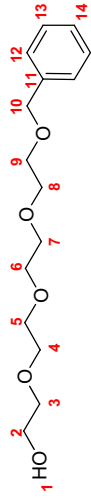
R_f (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 90/10/0.5, v/v/v) : 0.28

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.12 (t, 3H, *J* = 7 Hz, H₁₃) 1.35 (s, 6H, H₆), 2.37-2.53 (m, 2H, H₂), 2.65-3.03 (m, 6H, H₁₁, H₁₂, H₁₄), 3.52-4.04 (m, 7H, H₄, H₅, H₁₀, H₁₅), 4.69 (q, 1H, *J* = 7 Hz, H₃), 6.08 (dd, 1H, *J* = 6 Hz, 4 Hz, H₁), 7.82 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₂₅), 8.08 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, 2 Hz, H₂₄), 8.40 (t, 1H, *J* = 6 Hz, H₁₆), 8.61 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₂₂), 8.74 (s, 1H, H₆), 9.59 (s, 1H, H₂₀)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 10.9 (C₁₃), 25.1, 26.4 (2C₉), 37.5 (C₁₅), 41.1 (C₂), 49.3 (C₁₂), 52.9, 53.0 (C₁₁, C₁₄), 59.7 (C₅), 61.4 (C₁₀), 66.8 (C₃), 67.6 (C₅), 86.3 (C₁), 86.5 (C₄), 98.3 (C₂₃), 100.9 (C₁₀), 130.8 (C₂₅), 138.6 (C₂₂), 139.6 (C_{25a}), 139.9 (C₂₄), 143.9, 144.4 (C₁₉, C_{21a}), 144.6 (C₂₀), 145.8 (C₆), 150.3 (C₂), 160.6 (C₄), 163.4 (C₁₇)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 809.07 / [M+H]⁺_{mes} = 809.11

1-phényl-2,5,8,11-tétraoxatridécane-13-ol **65**



A une solution de tétraéthylène glycol (5 g, 25.74 mmol) préalablement séché (co-évaporation avec 3x20 mL de toluène anhydre) dans le CH_2Cl_2 anhydre (50 mL) sont ajoutés sous argon l' Ag_2O (8.949 g, 38.62 mmol) et le BnBr (3.23 mL, 27.03 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 18 h puis filtré sur pad de silice. Le pad est rincé avec 3x100 mL de mélange AcOEt/EtOH (95/5). Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **65** (4.716 g, 16.59 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

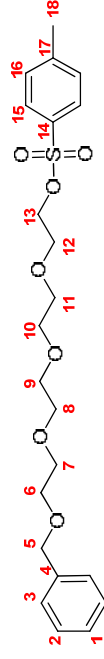
Rendement : 65 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle) : 0.21

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 2.48 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H₁), 3.58-3.72 (m, 16H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉), 4.57 (s, 2H, H₁₀), 7.26-7.36 (m, 5H, H₁₂, H₁₃, H₁₄)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 61.8 (C₂), 69.5 (C₉), 70.4-70.7 (C₄, C₅, C₆, C₇, C₈), 72.6 (C₃), 73.3 (C₁₀), 127.7, 127.8 (2C₁₂, C₁₄), 128.4 (2C₁₃), 138.3 (C₁₁)

4-toluènesulfonate de 13-phényl-3,6,9,12-tétraoxatridéc-1-yle **66**



Dans un mortier, le K_2CO_3 (5 g) est mouillé avec **65** (3 g, 10.55 mmol). Le TsCl (3.017 g, 15.83 mmol) est ajouté et le mélange est broyé au pilon pendant 10 minutes. Du KOH (1.480 g, 26.38 mmol) fraîchement pulvérisé est ajouté et le mélange est broyé au pilon pendant 3 minutes. 50 mL d' Et_2O sont ajoutés et le mélange est filtré puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **66** (4.276 g, 9.75 mmol).

Aspect : huile incolore

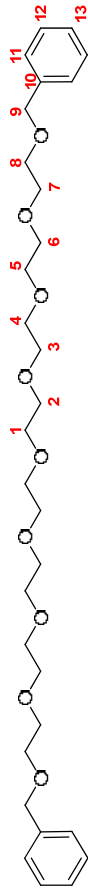
Rendement : 92 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 97/3, v/v) : 0.30

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 2.44 (s, 3H, H₁₈), 3.68-3.70 (m, 14H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 4.15 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H₁₃), 4.56 (s, 2H, H₅), 7.27-7.35 (m, 7H, H₁, H₂, H₃, H₁₅), 7.79 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H₁₆)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 21.7 (C₁₈), 68.7-70.8 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃), 73.3 (C₅), 127.7 (C₁), 127.8 (2C₃), 128.1 (2C₁₅), 128.4 (2C₂), 129.9 (2C₁₆), 133.1 (C₁₄), 138.3 (C₄), 144.9 (C₁₇)

1,27-diphényl-2,5,8,11,14,17,20,23,26-nonaoxaheptacosane **67**



A une solution de **65** (1.938 g, 6.82 mmol) dans le THF anhydre (140 mL) est ajouté sous argon le NaH (60% dans huile minérale, 545 mg, 13.63 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis une solution de **66** (3.885 g, 8.86 mmol) dans le THF anhydre (30 mL) est additionnée sous argon. Le mélange est agité à reflux pendant 18 h puis versé dans 500 mL de CH_2Cl_2 . La solution obtenue est lavée avec 2x200 mL d'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec 100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x150 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **67** (3.610 g, 6.56 mmol)

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 96 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 50/50/5, v/v/v) : 0.30

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 3.59-3.71 (m, 32H, H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈), 4.56 (s, 2H, H₉), 7.25-7.35 (m, 5H, H₁₁, H₁₂, H₁₃)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 69.5 (2C₈), 70.6-70.7 (2C₁, 2C₂, 2C₃, 2C₄, 2C₅, 2C₆, 2C₇), 73.3 (2C₉), 127.6, 127.8, 128.4 (4C₁₁, 4C₁₂, 2C₁₃), 138.3 (2C₁₀)

3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosane-1,23-diol (Octaéthylène glycol) **68**



A une solution de **67** (1.417 g, 2.57 mmol) dans l'éthanol anhydre (43 mL) est ajouté le Pd/C (10% m/m, 273 mg, 0.26 mmol). Le milieu est purgé 6 fois (vide / atmosphère H₂) puis vigoureusement agité sous atmosphère d'hydrogène pendant 1 h 30. Le mélange est filtré sur Celite® 545 et rincé avec 100 mL de mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10). Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (hauteur < 10 cm), conduisant à **68** (883 mg, 2.38 mmol).

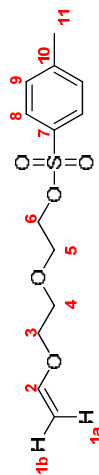
Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 93 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 90/10, v/v) : 0.23

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 2.75 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H₉), 3.58-3.76 (m, 32H, H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈)

4-toluènesulfonate de 2-(2-(vinyloxy)éthoxy)éthyle **69**



Dans un mortier, le K_2CO_3 (11 g) est mouillé avec le monoéther vinylique du diéthylène glycol (3 g, 22.70 mmol). Le $TsCl$ (6.492 g, 34.05 mmol) est ajouté et le mélange est broyé au pilon pendant 15 minutes. Du KOH (3.184 g, 56.75 mmol) fraîchement pulvérisé est ajouté et le mélange est broyé au pilon pendant 3 minutes. 50 mL d' Et_2O sont ajoutés et le mélange est filtré, rincé avec 2x25 mL de CH_2Cl_2 puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **69** (4.906 g, 17.13 mmol).

Aspect : huile incolore

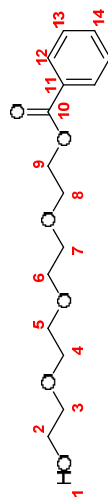
Rendement : 75 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 25/75, v/v) : 0.31

RMN^1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ) : 2.45 (s, 3H, H_{11}), 3.64-3.79 (m, 6H, H_3 , H_4 , H_5), 4.01 (dd, 1H, $J = 7$ Hz, 2Hz, H_{1b}), 4.15 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 2 Hz, H_{1a}), 4.18 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_6), 6.46 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 7 Hz, H_2), 7.34 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_9), 7.80 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_8)

RMN^{13C} (50 MHz, $CDCl_3$, δ) : 21.7 (C_{11}), 67.2 (C_3), 68.8, 69.8 (C_4 , C_5), 69.3 (C_6), 86.9 (C_1), 128.1 ($2C_8$), 129.9 ($2C_9$), 133.0 (C_7), 144.9 (C_{10}), 151.7 (C_2)

Benzoate de 2-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyle **70**



A une solution de tétraéthylène glycol (10 g, 20.59 mmol) préalablement séché (co-évaporation avec 3x20 mL de toluène anhydre), de DIPEA (2.71 mL, 19.31 mmol) et de DMAP (157 mg, 1.29 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (220 mL) est additionnée sous argon une solution de $BzCl$ (1.809 g, 12.87 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (30 mL). Le mélange est agité à TA pendant 16 h puis versé dans 250 mL de CH_2Cl_2 et lavé avec 250 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 2% et 250 mL d'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec 100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur $MgSO_4$ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **70** (3.115 g, 10.44 mmol).

Aspect : huile incolore

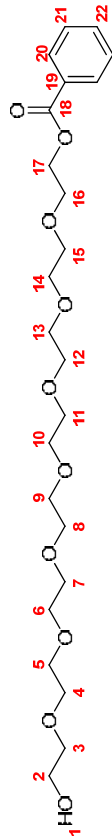
Rendement : 81 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 70/30/4, v/v/v) : 0.28

RMN^1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ) : 2.47 (ls, 1H, H_1), 3.57-3.75 (m, 12H, H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , H_6 , H_7), 3.84 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_8), 4.49 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_9), 7.39-7.48 (m, 2H, H_{13}), 7.52-7.60 (m, 1H, H_{14}), 8.03-8.10 (m, 2H, H_{12})

RMN^{13C} (50 MHz, $CDCl_3$, δ) : 61.7 (C_2), 64.2 (C_9), 69.3 (C_8), 70.4-70.7 (C_4 , C_5 , C_6 , C_7), 72.5 (C_{12}), 128.3 ($2C_{13}$), 129.7 ($2C_{12}$), 130.1 (C_{11}), 133.0 (C_{14}), 166.6 (C_{10})

Benzoate de 23-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaocatricos-1-yle **71**



A une solution d'octaéthylène glycol (2.486 g, 6.71 mmol) et de DMAP (984 mg, 8.05 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (50 mL) est additionnée sous argon à 0 °C une solution de BzCl (850 μL , 7.38 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (17 mL). Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h puis à TA pendant 16 h puis versé dans 400 mL d'eau. Les phases sont décantées et la phase aqueuse extraite avec 3x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **71** (1.477 g, 3.11 mmol)

Aspect : huile incolore

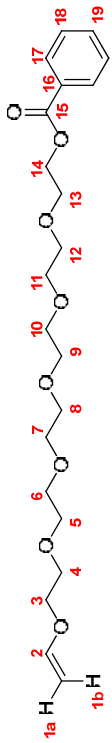
Rendement : 46 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 93/7, v/v) : 0.32

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 2.56 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H_1), 3.58-3.72 (m, 28H, $\text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7, \text{H}_8, \text{H}_9, \text{H}_{10}, \text{H}_{11}, \text{H}_{12}, \text{H}_{13}, \text{H}_{14}, \text{H}_{15}$), 3.83 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{16}), 4.47 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{17}), 7.39-7.47 (m, 2H, H_{21}), 7.52-7.60 (m, 1H, H_{22}), 8.03-8.08 (m, 2H, H_{20})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 61.6 (C_2), 64.1 (C_{17}), 69.2 (C_{16}), 70.3-70.6 ($\text{C}_4, \text{C}_5, \text{C}_6, \text{C}_7, \text{C}_8, \text{C}_9, \text{C}_{10}, \text{C}_{11}, \text{C}_{12}, \text{C}_{13}, \text{C}_{14}, \text{C}_{15}$), 72.5 (C_3), 128.3 (2C_{20}), 129.6 (2C_{21}), 130.1 (C_{19}), 133.0 (C_{22}), 166.5 (C_{18})

Benzoate de 3,6,9,12,15,18-hexaoxaicos-19-èn-1-yle **72**



A une solution de **70** (2.233 g, 7.49 mmol) dans le THF anhydre (150 mL) est ajouté le NaH (60 % dans huile minérale, 599 mg, 14.97 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 45 minutes puis une solution de **69** (2.786 g, 9.73 mmol) dans le THF anhydre (40 mL) est additionnée sous argon. Le mélange est agité à reflux pendant 20 h puis versé dans 500 mL de CH_2Cl_2 . La solution obtenue est lavée avec 2x200 mL d'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec 100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x200 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **72** (1.203 g, 2.92 mmol) et **73** (1.304 g, 4.23 mmol).

Aspect : huile jaune

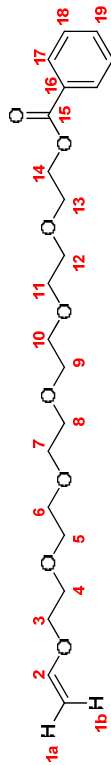
Rendement : 39 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 96/4, v/v) : 0.31

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 3.61-3.75 (m, 18H, $\text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7, \text{H}_8, \text{H}_9, \text{H}_{10}, \text{H}_{11}, \text{H}_{12}$), 3.81-3.86 (m, 4H, $\text{H}_3, \text{H}_{13}$), 4.00 (dd, 1H, $J = 7$ Hz, 2Hz, H_{1a}), 4.17 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 2Hz, H_{1b}), 4.47 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{14}), 6.49 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 7 Hz, H_2), 7.39-7.48 (m, 2H, H_{18}), 7.52-7.61 (m, 1H, H_{19}), 8.03-8.09 (m, 2H, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 64.2 (C_3), 67.2 (C_3), 69.2, 69.6 ($\text{C}_4, \text{C}_{13}$), 70.6-70.7 ($\text{C}_5, \text{C}_6, \text{C}_7, \text{C}_8, \text{C}_9, \text{C}_{11}, \text{C}_{12}$), 86.6 (C_1), 128.4 (2C_{18}), 129.7 (2C_{17}), 130.1 (C_{16}), 133.0 (C_{19}), 151.8 (C_2), 166.5 (C_{15})

Benzoate de **3,6,9,12,15,18-hexaoxaicos-19-èn-1-yle** **72**



A une solution de **73** (1.304 g, 4.23 mmol), de NEt₃ (892 µL, 6.34 mmol) et de DMAP (52 mg, 0.42 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (33 mL) est ajouté sous argon le BzCl (536 µL, 4.65 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis versé dans 300 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 50 mL puis 2x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **72** (1.203 g, 2.92 mmol) et **73** (1.304 g, 4.23 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 98 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 96/4, v/v) : 0.31

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 3.61-3.75 (m, 18H, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 3.81-3.86 (m, 4H, H₃, H₁₃), 4.00 (dd, 1H, J = 7 Hz, 2Hz, H_{1a}), 4.17 (dd, 1H, J = 14 Hz, 2Hz, H_{1b}), 4.47 (t, 2H, J = 5 Hz, H₁₄), 6.49 (dd, 1H, J = 14 Hz, 7 Hz, H₂), 7.39-7.48 (m, 2H, H₁₈), 7.52-7.61 (m, 1H, H₁₉), 8.03-8.09 (m, 2H, H₁₇)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 64.2 (C₁₄), 67.2 (C₃), 69.2, 69.6 (C₄, C₁₃), 70.6-70.7 (C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂), 86.6 (C₁), 128.4 (2C₁₈), 129.7 (2C₁₇), 130.1 (C₁₆), 133.0 (C₁₉), 151.8 (C₂), 166.5 (C₁₅)

3,6,9,12,15,18-hexaoxaicos-19-èn-1-ol **73**



A une solution de **70** (2.233 g, 7.49 mmol) dans le THF anhydre (150 mL) est ajouté le NaH (60 % dans huile minérale, 599 mg, 14.97 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 45 minutes puis une solution de **69** (2.786 g, 9.73 mmol) dans le THF anhydre (40 mL) est additionnée sous argon. Le mélange est agité à reflux pendant 20 h puis versé dans 500 mL de CH₂Cl₂. La solution obtenue est lavée avec 2x200 mL d'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec 100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x200 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **72** (1.203 g, 2.92 mmol) et **73** (1.304 g, 4.23 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 56 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 96/4, v/v) : 0.24

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 2.61 (ls, 1H, H₁₅), 3.58-3.86 (m, 24H, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄), 4.00 (dd, 1H, J = 7 Hz, 2Hz, H_{1a}), 4.18 (dd, 1H, J = 14 Hz, 2Hz, H_{1b}), 6.49 (dd, 1H, J = 14 Hz, 7 Hz, H₂)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 61.4 (C₁₄), 67.1 (C₃), 69.4 (C₄), 70.1-70.5 (C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂), 72.4 (C₁₃), 86.5 (C₁), 151.6 (C₂)

Benzoate de 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-décaoxadotriacont-31-èn-1-yle **74**



A une solution de **71** (1.477 g, 3.11 mmol) dans le THF anhydre (66 mL) est ajouté le NaH (60 % dans huile minérale, 149 mg, 3.73 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 30 minutes puis une solution de **69** (1.337 g, 4.67 mmol) dans le THF anhydre (12 mL) est additionnée sous argon. Le mélange est agité à reflux pendant 17 h puis versé dans 250 mL de CH₂Cl₂. La solution obtenue est lavée avec 2x100 mL d'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec 50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **74** (260 mg, 0.44 mmol) et **75** (318 mg, 0.66 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 14 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 93/7, v/v) : 0.29

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 3.62-3.76 (m, 34H, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 3.81-3.86 (m, 4H, H₃, H₂₁), 3.84 (dd, 1H, J = 7 Hz, 2 Hz, H_{1a}), 4.18 (dd, 1H, J = 14 Hz, 2 Hz, H_{1b}), 4.48 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₂), 6.50 (dd, 1H, J = 14 Hz, 7 Hz, H₂), 7.39-7.47 (m, 2H, H₂₆), 7.51-7.60 (m, 1H, H₂₇), 8.03-8.07 (m, 2H, H₂₅)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 64.1 (C₂₂), 67.2 (C₃), 69.2, 69.6 (C₄, C₂₁), 70.6-70.7 (C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀), 86.2 (C₁), 128.3 (2C₂₆), 129.7 (2C₂₅), 130.1 (C₂₄), 133.0 (C₂₇), 157.7 (C₂), 166.5 (C₂₃)

Benzoate de 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-décaoxadotriacont-31-èn-1-yle **74**



A une solution de **75** (318 mg, 0.66 mmol), de NEt₃ (138 µL, 0.98 mmol) et de DMAP (8 mg, 0.07 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (8 mL) est ajouté sous argon le BzCl (83 µL, 0.72 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis versé dans 50 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 10 mL puis 2x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **74** (568 mg, 0.97 mmol).

Aspect : huile jaune

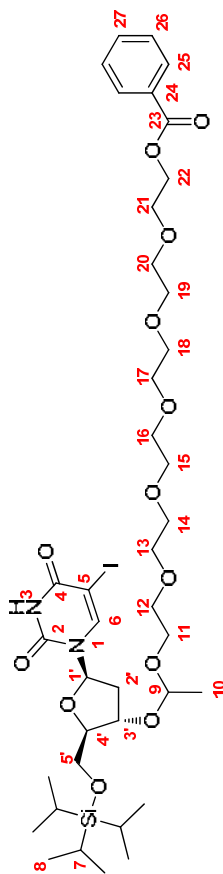
Rendement : 80 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 93/7, v/v) : 0.29

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 3.62-3.76 (m, 34H, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 3.81-3.86 (m, 4H, H₃, H₂₁), 3.84 (dd, 1H, J = 7 Hz, 2 Hz, H_{1a}), 4.18 (dd, 1H, J = 14 Hz, 2 Hz, H_{1b}), 4.48 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₂), 6.50 (dd, 1H, J = 14 Hz, 7 Hz, H₂), 7.39-7.47 (m, 2H, H₂₆), 7.51-7.60 (m, 1H, H₂₇), 8.03-8.07 (m, 2H, H₂₅)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 64.1 (C₂₂), 67.2 (C₃), 69.2, 69.6 (C₄, C₂₁), 70.6-70.7 (C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀), 86.2 (C₁), 128.3 (2C₂₆), 129.7 (2C₂₅), 130.1 (C₂₄), 133.0 (C₂₇), 157.7 (C₂), 166.5 (C₂₃)

5-iodo-3'-O-(1-méthyl-21-oxo-21-phényl-2,5,8,11,14,17,20-heptaoxahénicos-1-yl)-5'-O-trisopropylsilyl-2'-déoxyuridine 76



A une solution de 5 (1.411 g, 2.92 mmol) et d'acide camphorsulfonique (26 mg, 0.11 mmol) dans le THF anhydre (50 mL) est additionnée sous argon une solution de 72 (1.710 g, 4.15 mmol) dans le THF anhydre (20 mL). Le mélange est agité à TA pendant 18 h puis versé dans 450 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x120 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 150 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à 76 (2.358 g, 2.56 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

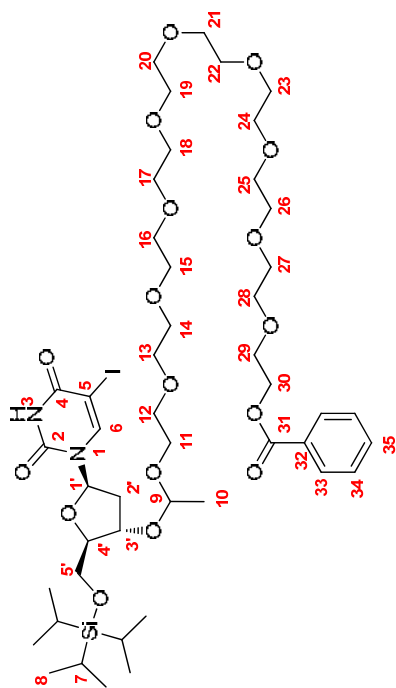
Rendement : 92 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane, 65/35, v/v) : 0.27

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06-1.25 (m, 21H, H₇, H₈), 1.31 et 1.32 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.91-2.16 (m, 1H, H₂₇), 2.38-2.55 (m, 1H, H₂), 3.55-3.74 (m, 20H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 3.83 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₁), 3.83-4.14 (m, 3H, H₄, H₅), 4.39-4.45 (m, 1H, H₃), 4.47 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₂), 4.81 et 4.82 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 7.38-7.47 (m, 2H, H₂₆), 7.51-7.60 (m, 1H, H₂₇), 8.01-8.08 (m, 3H, H₆, H₂₅), 8.63 et 8.74 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.1 (6C₈), 19.9, 20.0 (C₁₀), 39.2, 40.0 (C₂), 63.3 (C₅), 63.5, 63.9 (C₁₁), 64.2 (C₂₂), 68.6, 68.7 (C₃), 69.2 (C₂₁), 70.5-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀), 74.6, 74.8 (C_{3'}), 85.6 (C₁), 85.7 (C₄), 99.1, 99.5 (C₉), 128.3 (2C₂₆), 129.7 (2C₂₅), 130.1 (C₂₄), 133.0 (C₂₇), 144.0 (C₆), 150.0 (C₂), 160.1 (C₄), 166.5 (C₂₃)

5-iodo-3'-O-(1-méthyl-3-oxo-3-3-phényl-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undécaoxadotriitriacont-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **77**



A une solution de **5** (499 mg, 0.98 mmol) et d'acide camphorsulfonique (9 mg, 0.04 mmol) dans le THF anhydre (20 mL) est additionnée sous argon une solution de **74** (633 mg, 1.08 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 20 h puis versé dans 200 mL d'eau + 50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **77** (595 mg, 0.54 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

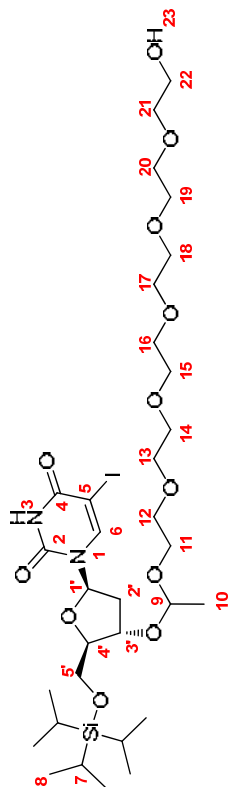
Rendement : 55 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 80/20/5, v/v/v) : 0.31

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.08-1.29 (m, 21H, H₇, H₈), 1.31 et 1.32 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.92-2.17 (m, 1H, H₂), 2.39-2.56 (m, 1H, H₂), 3.53-3.79 (m, 38H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈), 3.81-4.14 (m, 5H, H₄, H₅, H₂₉), 4.47 (t, 2H, J = 5 Hz, H₃₀), 4.82 et 4.83 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 7.36-7.49 (m, 2H, H₃₄), 7.52-7.60 (m, 1H, H₃₅), 8.02-8.09 (m, 3H, H₆, H₃₃), 8.47 et 8.61 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.0 (C₁₀), 39.2, 40.0 (C₂), 63.3 (C₅), 63.5, 63.9 (C₁₁), 64.2 (C₃₀), 68.6, 68.7 (C₅), 69.2 (C₂₉), 70.5-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈), 74.7, 74.9 (C₃), 85.7 (C₁), 85.7, 86.3 (C₄), 99.1, 99.6 (C₉), 128.4 (2C₃₄), 129.6 (2C₃₃), 130.1 (C₃₂), 133.0 (C₃₅), 144.1 (C₆), 150.1 (C₂), 160.0 (C₄), 166.6 (C₃₁)

3'-O-(19-hydroxy-1-méthyl-2,5,8,11,14,17-hexaoxonadéc-1-yl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **78**



A une solution de **76** (1.477 g, 1.60 mmol) dans l'éthanol anhydre (30 mL) est ajouté le LiOH (57 mg, 2.40 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans un mélange composé de 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, 30 mL d'eau et 10 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 4x40 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **78** (1.294 g, 1.58 mmol).

Aspect : huile incolore

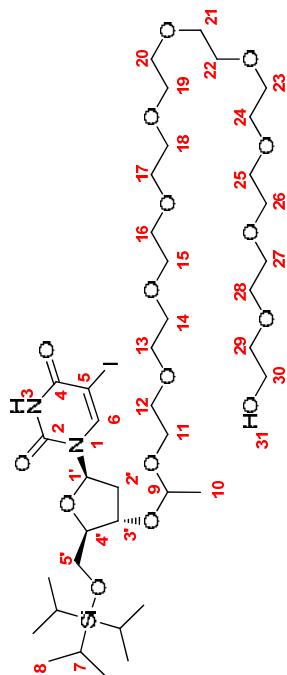
Rendement : 99 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 92/8, v/v) : 0.32

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.07-1.28 (m, 21H, H₇, H₈), 1.31 et 1.32 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.93-2.19 (m, 1H, H₂), 2.41-2.60 (m, 1H, H₂), 2.72 et 2.85 (2xt, 1H, J = 6 Hz, H₂₃), 3.60-3.73 (m, 24H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂), 3.83-3.97 (m, 2H, H₅), 3.99-4.14 (m, 1H, H₄), 4.38-4.52 (m, 1H, H₃), 4.82 et 4.83 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 8.03 et 8.05 (2xs, 1H, H₆), 8.59 et 8.90 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.1 (C₁₀), 39.2, 40.0 (C₂), 61.7 (C₁₁), 63.6, 64.1 (C₅), 68.7 (C₅), 70.3 (C₂₁), 70.5-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁), 72.6 (C₂₂), 74.5, 75.1 (C₃), 85.6 (C₁), 85.8, 86.4 (C₄), 99.1, 99.7 (C₉), 144.1 (C₆), 150.0 (C₂), 160.2 (C₄)

3'-O-(31-hydroxy-1-méthyl-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-décaoxahentriacont-1-yl)-5-iodo-5'-O-trisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **79**



A une solution de **77** (590 mg, 0.54 mmol) dans l'éthanol anhydre (12 mL) est ajouté le LiOH (23 mg, 0.97 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans un mélange composé de 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, 30 mL d'eau et 10 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 4x40 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 70 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **79** (423 g, 0.43 mmol).

Aspect : huile incolore

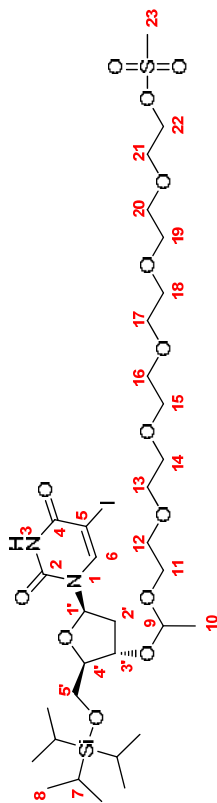
Rendement : 79 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol, 90/10, v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.05-1.26 (m, 21H, H₇, H₈), 1.32 et 1.33 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.92-2.17 (m, 1H, H₂), 2.40-2.58 (m, 1H, H₂), 2.47 et 2.58 (2xt, 1H, J = 6 Hz, H₃₁), 3.60-3.73 (m, 40H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₀), 3.81-3.95 (m, 2H, H₅), 3.97-4.16 (m, 1H, H₄), 4.34-4.50 (m, 1H, H₃), 4.84 et 4.85 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.21 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 8.02 et 8.04 (2xs, 1H, H₆), 8.75 et 8.93 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.0 (C₁₀), 39.3, 40.0 (C₂), 61.7 (C₁₁), 63.6, 64.1 (C₅), 68.7 (C₂₉), 70.5-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈), 72.7 (C₃₀), 74.5, 75.1 (C₃), 85.7 (C₁), 85.8, 86.4 (C₄), 99.1, 99.8 (C₉), 144.1 (C₆), 150.1 (C₂), 160.2 (C₄)

3'-O-(1-méthyl-21,21-dioxo-2,5,8,11,14,17,20-heptaoca-21-thiadocos-1-yl)-5-iodo-5'-O-trisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **80**



A une solution de **78** (950 mg, 1.16 mmol) et de DIPEA (505 µL, 2.90 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (19 mL) est ajouté sous argon le MsCl (108 µL, 1.39 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans un mélange composé de 70 mL d'eau et 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 4x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **80** (681 mg, 0.76 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

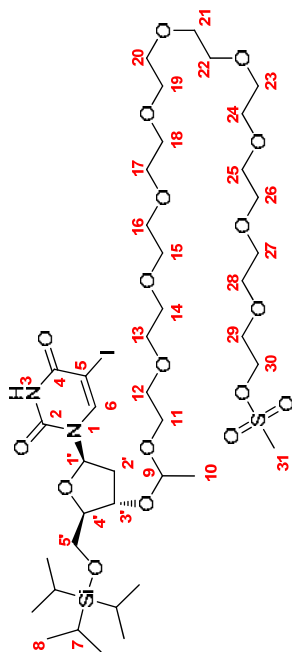
Rendement : 65 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle) : 0.27

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.05-1.24 (m, 21H, H₇, H₈), 1.32 et 1.33 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.93-2.18 (m, 1H, H₂), 2.37-2.55 (m, 1H, H₂), 3.08 (s, 3H, H₂₃), 3.54-3.72 (m, 20H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 3.76 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₁), 3.82-3.96 (m, 2H, H₅), 4.01-4.16 (m, 1H, H₄), 4.38 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₂), 4.42-4.51 (m, 1H, H₃), 4.82 et 4.83 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 8.03 et 8.04 (2xs, 1H, H₆), 8.36 et 8.51 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.1 (C₁₀), 37.8 (C₂₃), 39.2, 40.0 (C₂), 63.3, 63.4 (C₅), 64.0 (C₁₁), 68.6 (C₅), 69.0 (C₂₂), 69.4 (C₂₁), 70.5-70.6 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀), 74.6, 74.9 (C₃), 85.6 (C₁), 85.8, 86.4 (C₄), 99.1, 99.7 (C₉), 144.1 (C₆), 149.9, 150.0 (C₂), 160.1 (C₄)

5-iodo-3'-O-(1-méthyl-1-3,3,3-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undécaoxa-33-thiatetra triacont-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **81**



A une solution de **79** (150 mg, 0.15 mmol) et de DIPEA (66 µL, 0.38 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) est ajouté sous argon le MsCl (14 µL, 0.18 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans un mélange composé de 15 mL d'eau et 35 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3 mL puis 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **81** (141 mg, 0.13 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

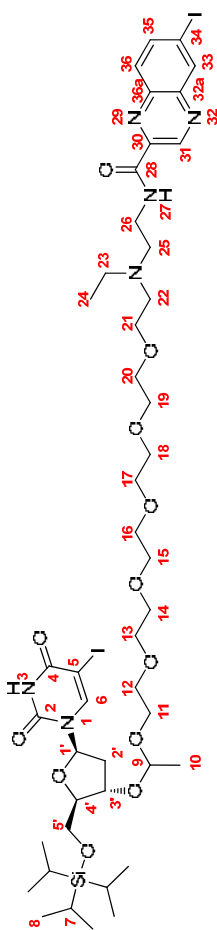
Rendement : 87 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 46/46/8, v/v/v) : 0.35

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.04-1.26 (m, 21H, H₇, H₈), 1.33 et 1.34 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.91-2.21 (m, 1H, H₂), 2.36-2.57 (m, 1H, H₂₇), 3.11 (s, 3H, H₂₃), 3.52-3.75 (m, 36H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈), 3.78 (t, 2H, J = 5 Hz, H₂₉), 3.80-3.94 (m, 2H, H₅), 4.01-4.16 (m, 1H, H₄), 4.40 (t, 2H, J = 5 Hz, H₃₀), 4.44-4.53 (m, 1H, H₃), 4.86 et 4.87 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.21 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁₇), 8.02 et 8.04 (2xs, 1H, H₆), 8.31 et 8.55 (2xls, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 18.2 (6C₈), 20.0, 20.1 (C₁₀), 37.8 (C₂₃), 39.2, 40.0 (C₂₇), 63.3, 63.4 (C₅), 63.5, 64.0 (C₁₁), 68.6 (C₅), 69.1 (C₃₀), 69.4 (C₂₉), 70.5-70.6 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈), 74.6, 74.9 (C₃), 85.6 (C₁), 85.7, 86.3 (C₄), 99.1, 99.7 (C₉), 144.1 (C₆), 149.9, 150.0 (C₂), 160.1 (C₄)

3'-O-(20-éthyl-24-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-24-oxo-2,5,8,11,14,17-hexaoxa-20,23-diazatétracos-1-yl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **82**



A une solution de **80** (442 mg, 0.49 mmol) et de DIPEA (129 µL, 0.74 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (9 mL) est ajouté sous argon **13** (274 mg, 0.74 mmol). Le mélange est agité à 65 °C pendant 90 h puis versé dans un mélange composé de 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 70 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **82** (170 mg, 0.15 mmol).

Aspect : caramel brun

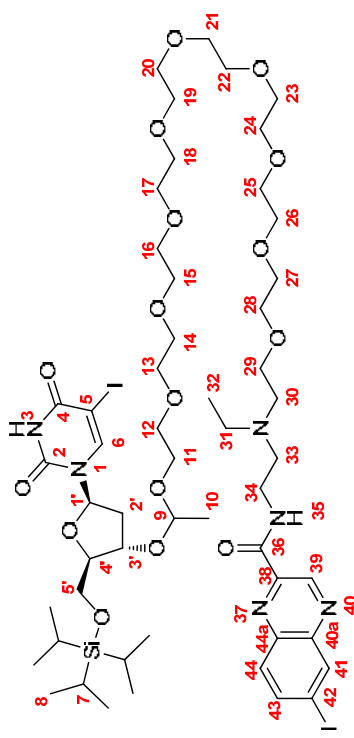
Rendement : 30 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 92/8/0.5, v/v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.96-1.25 (m, 24H, H₇, H₈, H₂₄), 1.28 et 1.29 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.86-2.11 (m, 1H, H₂₇), 2.35-2.50 (m, 1H, H₂₇), 2.60-2.80 (m, 6H, H₂₂, H₂₃, H₂₅), 3.32-3.67 (m, 24H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₆), 3.78-4.10 (m, 3H, H₄, H₅), 4.37-4.46 (m, 1H, H₃), 4.78 et 4.79 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₆), 6.20 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁₇), 7.78 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₆), 7.95 et 7.98 (2xs, 1H, H₆), 8.03 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₃₅), 8.40 (t, 1H, J = 5 Hz, H₂₇), 8.56 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃₃), 9.61 (s, 1H, H₃₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 17.3 (C₂₄), 18.2 (6C₈), 19.9, 20.1 (C₁₀), 37.5 (C₂₆), 39.2, 40.0 (C₂₇), 48.5 (C₂₃), 52.6, 52.7 (C₂₅), 52.8, 52.9 (C₂₂), 63.3, 63.4 (C₅), 63.43, 64.0 (C₁₁), 68.6, 68.8 (C₅), 69.9-71.0 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁), 74.6, 75.3 (C₃), 85.5 (C₁), 85.7, 86.4 (C₄), 98.0 (C₃₄), 99.1, 99.7 (C₉), 130.9 (C₃₆), 138.6 (C₃₃), 139.6 (C_{36a}), 139.7 (C₃₅), 144.0 (C₆), 144.2, 144.3 (C₃₀, C_{32a}), 144.7 (C₃₁), 150.0 (C₂), 160.2, 160.2 (C₄), 163.0 (C₂₈)

3'-O-(32-éthyl-36-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-décaoxa-32,35-diazahexatriacont-1-yl)-5-iodo-5'-O-triisopropylsilyl-2'-déoxyuridine **83**



A une solution de **81** (141 mg, 0.13 mmol) et de DIPEA (46 μ L, 0.26 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (3 mL) est ajouté sous argon l'amine secondaire **13** (58 mg, 0.16 mmol). Le mélange est agité à 70 °C pendant 70 h puis versé dans un mélange composé de 15 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 35 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **83** (22 mg, 0.02 mmol).

Aspect : caramel brun

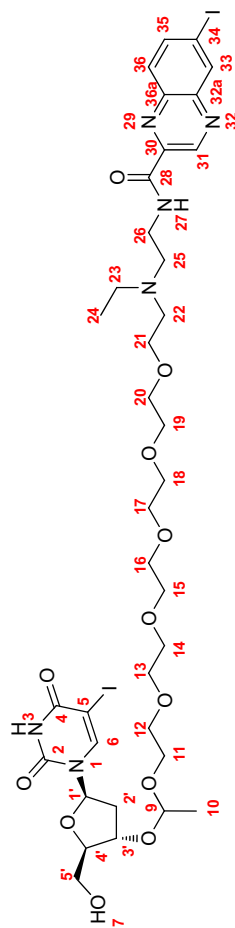
Rendement : 12 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 20/67/13/0.5, v/v/v/v) : 0.28

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.94-1.27 (m, 24H, H₇, H₈, H₃₂), 1.30 et 1.31 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 1.84-2.13 (m, 1H, H₂), 2.34-2.52 (m, 6H, H₃₀, H₃₁, H₃₃), 3.31-3.65 (m, 40H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₄), 3.76-4.12 (m, 3H, H₄, H₅), 4.35-4.46 (m, 1H, H₃), 4.81 et 4.82 (2xq, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.22 (dd, 1H, J = 8 Hz, 6 Hz, H₁), 7.79 (d, 1H, J = 9 Hz, H_{4a}), 7.94 et 7.97 (2xs, 1H, H₆), 8.04 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₄), 8.42 (t, 1H, J = 5 Hz, H₃₅), 8.58 (d, 1H, J = 2 Hz, H₄₁), 9.62 (s, 1H, H₃₉)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (3C₇), 17.3 (C₃₂), 18.2 (6C₈), 20.0, 20.1 (C₁₀), 37.4 (C₃₄), 39.2, 40.0 (C₂), 48.5 (C₃), 52.6, 52.7 (C₃₃), 52.8, 52.9 (C₃₀), 63.3, 63.4 (C₅), 63.4, 64.0 (C₁₁), 68.5, 68.8 (C₅), 69.9-71.1 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉), 74.6, 75.3 (C₃), 85.5 (C₁), 85.7, 86.3 (C₄), 97.9 (C₄₂), 99.1, 99.6 (C₉), 130.8 (C₄₄), 138.6 (C₄₁), 139.6 (C_{44a}), 139.7 (C₄₃), 144.0 (C₆), 144.2, 144.3 (C₃₈, C_{40a}), 144.8 (C₃₉), 150.1 (C₂), 160.2 (C₄), 163.0 (C₃₆)

3'-O-(20-éthyl-24-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-24-oxo-2,5,8,11,14,17-hexaoxa-20,23-diazatétracos-1-yl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **41**



A une solution de **82** (170 mg, 0.15 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 218 μ L, 0.22 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans un mélange composé de 35 mL d'eau et 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **41** (132 mg, 0.13 mmol).

Aspect : meringue jaune

Rendement : 90 %

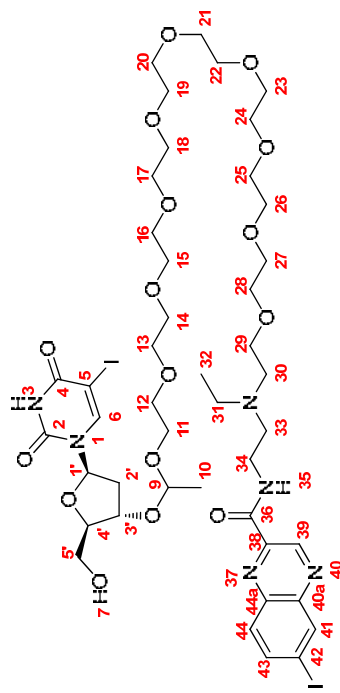
Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 92/8/1, v/v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.90-0.95 (m, 1H, H₇), 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, H_{2a}), 1.30 et 1.31 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 2.14-2.51 (m, 2H, H₂), 2.64-2.84 (m, 6H, H₂₂, H₂₃, H₂₅), 3.58-3.65 (m, 24H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₆), 3.80-3.97 (m, 2H, H₅), 4.03-4.10 (m, 1H, H₄), 4.55-4.66 (m, 1H, H₃), 4.77-4.86 (m, 1H, H₉), 6.10-6.18 (m, 1H, H₁), 7.82 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₆), 8.08 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₃₅), 8.44 (ls, 1H, H₂₇), 8.45 et 8.52 (2xs, 1H, H₆), 8.60 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃₃), 9.63 (s, 1H, H₃₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 11.9 (C_{2a}), 19.7, 20.4 (C₁₀), 37.5 (C₂₆), 38.9, 40.4 (C₂), 48.56 (C₂₃), 52.7 (C₂₅), 53.0 (C₂₂), 61.1, 61.5 (C₅), 62.3, 64.9 (C₁₁), 68.0, 68.1 (C₅), 69.9-70.7 (C₁₂-C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁), 71.42-73.47 (C₃), 85.8, 86.1 (C₄), 86.4 (C₁), 98.1 (C₃₄), 98.5, 98.9 (C₉), 130.9 (C₃₆), 138.6 (C₃₃), 139.7 (C_{36a}), 139.8 (C₃₅), 144.3, 144.4 (C₃₆, C_{32a}), 144.8 (C₃₁), 145.7 (C₆), 150.1 (C₂), 160.3 (C₄), 163.1 (C₂₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 1015.18 / [M+H]⁺_{mes} = 1015.25

3'-O-(32-éthyl-36-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-décaoxa-32,35-diazahexatriacont-1-yl)-5-iodo-2'-déoxyuridine **42**



A une solution de **83** (22 mg, 0.02 mmol) dans le THF anhydre (1 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 29 μ L, 0.03 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans un mélange composé de 35 mL d'eau et 15 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 3x10 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **42** (9 mg, 0.01 mmol).

Aspect : caramel brun

Rendement : 50 %

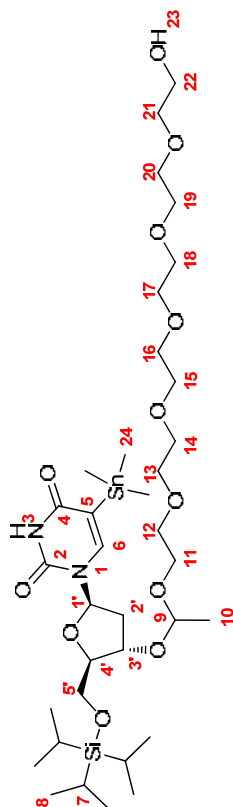
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 20/65/15/0.5, v/v/v/v) : 0.27

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.80-0.91 (m, 1H, H_7), 1.09 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{32}), 1.31 (d, 3H, $J = 5$ Hz, H_{10}), 2.15-2.51 (m, 2H, H_2), 2.66-2.86 (m, 6H, H_{30} , H_{31} , H_{33}), 3.59-3.65 (m, 40H, H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23} , H_{24} , H_{25} , H_{26} , H_{27} , H_{28} , H_{29} , H_{34}), 3.86-3.97 (m, 2H, H_5), 4.04-4.10 (m, 1H, H_4), 4.54-4.67 (m, 1H, H_3), 4.77-4.87 (m, 1H, H_9), 6.12-6.20 (m, 1H, H_1), 7.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{4a}), 8.08 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 2 Hz, H_{43}), 8.48 (ls, 1H, H_{35}), 8.48 et 8.54 (2xs, 1H, H_6), 8.60 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_{41}), 9.63 (s, 1H, H_{39})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 11.9 (C_{32}), 19.7, 20.4 (C_{10}), 37.4 (C_{34}), 39.0, 40.5 (C_2), 48.7 (C_{31}), 52.8 (C_{33}), 53.0 (C_{30}), 61.1, 61.5 (C_5), 62.3, 65.0 (C_1), 67.8, 68.0 (C_3), 70.3-70.8 (C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29}), 71.3, 73.5 (C_3), 85.8, 86.1 (C_4), 86.4 (C_1), 98.1 (C_{42}), 98.5, 98.8 (C_9), 131.0 (C_{44}), 138.6 (C_4), 139.7 (C_{44a}), 139.8 (C_{43}), 144.2, 144.4 (C_{38} , C_{40a}), 144.8 (C_{39}), 145.7 (C_6), 150.0 (C_2), 160.1 (C_4), 163.2 (C_{36})

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+$ $_{\text{th}}$ = 1191.29 / $[\text{M}+\text{H}]^+$ $_{\text{mes}}$ = 1191.33

3'-O-(19-hydroxy-1-méthyl-2,5,8,11,14,17-hexaoxonadec-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **85**



A une solution de **78** (1.235 g, 1.51 mmol) dans le dioxane anhydre (45 mL) dégazée par bullage d'argon sont ajoutés le $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (53 mg, 0.08 mmol) et le Sn_2Me_6 (688 μL , 3.32 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 5 h 30 puis filtré sur Celite® 545, qui est rincée avec 300 mL de CH_2Cl_2 . Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **85** (902 mg, 1.05 mmol).

Aspect : huile incolore

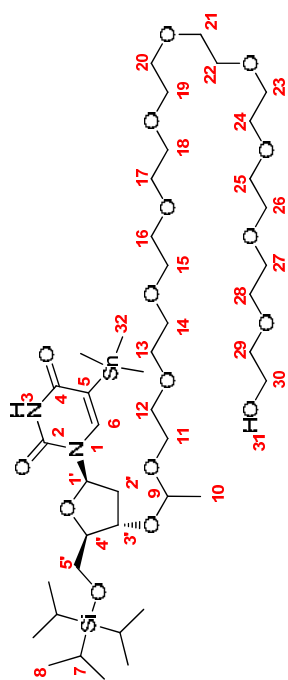
Rendement : 70 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 45/45/10, v/v/v) : 0.34

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.27 (s, 9H, H_{24}), 0.97-1.18 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.33 et 1.34 (2xd, 3H, $J = 5$ Hz, H_{10}), 1.93-2.17 (m, 1H, H_2), 2.41-2.52 (m, 1H, H_2), 2.85 (ls, 1H, H_{23}), 3.54-3.81 (m, 24H, H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22}), 3.84-3.92 (m, 2H, H_5), 4.02-4.15 (m, 1H, H_4), 4.38-4.49 (m, 1H, H_3), 4.81-4.90 (m, 1H, H_6), 6.13-6.22 (m, 1H, H_{17}), 7.17 et 7.22 (2xs, 1H, H_6), 8.36 et 8.48 (2xls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -9.2 ($J_{\text{C-Sn}} = 179$ Hz (^{119}Sn), 188 Hz (^{117}Sn), 3 C_{24}), 11.9 (3 C_7), 18.1 (6 C_8), 20.1 (C_{10}), 37.8, 38.5 (C_2), 61.6, 63.8 (C_{11}), 63.6, 64.2 (C_5), 70.3-70.6 (C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21}), 72.6 (C_{22}), 74.4, 76.0 (C_3), 85.5, 85.7, 85.9 (C_{11} , C_4), 99.0, 99.8 (C_9), 112.6, 112.7 (C_5), 143.0, 143.1 (C_6), 151.0 (C_2), 166.4 (C_4)

3'-O-(31-hydroxy-1-méthyl-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-décaohexatriacont-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **86**



A une solution de **79** (250 mg, 0.25 mmol) dans le dioxane anhydre (7.5 mL) dégazée par bullage d'argon sont ajoutés le $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (9 mg, 0.01 mmol) et le Sn_2Me_6 (114 μL , 0.55 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 5 h puis filtré sur Celite® 545, qui est rincée avec 100 mL de CH_2Cl_2 . Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **86** (206 mg, 0.20 mmol).

Aspect : huile incolore

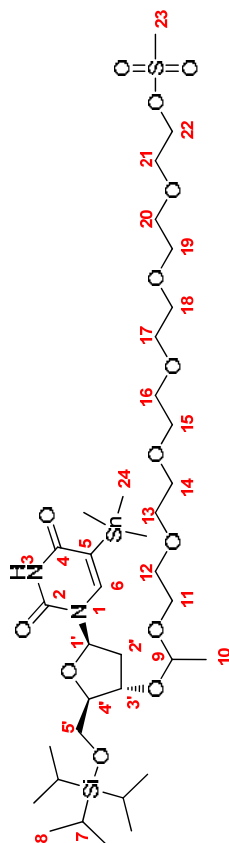
Rendement : 80 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 20/70/10, v/v) : 0.29

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.26 (s, 9H, H_{32}), 1.00-1.08 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.32 et 1.33 (2xd, 3H, $J = 5$ Hz, H_{10}), 1.91-2.15 (m, 1H, H_2), 2.40-2.53 (m, 1H, H_2), 3.12 (ls, 1H, H_{31}), 3.50-3.79 (m, 40H, H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23} , H_{24} , H_{25} , H_{26} , H_{27} , H_{28} , H_{29} , H_{30}), 3.83-3.91 (m, 2H, H_5), 4.01-4.12 (m, 1H, H_4), 4.37-4.47 (m, 1H, H_3), 4.77-4.87 (m, 1H, H_6), 6.13-6.22 (m, 1H, H_{17}), 7.16 et 7.21 (2xs, 1H, H_6), 8.57 et 8.61 (2xls, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -9.2 ($J_{\text{C-Sn}} = 179$ Hz (^{119}Sn), 189 Hz (^{117}Sn), 3 C_{32}), 12.0 (3 C_7), 18.1 (6 C_8), 20.2 (C_{10}), 37.8, 38.5 (C_2), 61.3, 63.8 (C_{11}), 63.7, 64.2 (C_5), 69.9-70.7 (C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29}), 72.3 (C_{30}), 74.5, 75.9 (C_3), 85.5, 85.9 (C_4), 85.7 (C_1), 99.0, 99.8 (C_9), 112.6, 112.7 (C_5), 143.0, 143.1 (C_6), 150.9 (C_2), 166.2 (C_4)

3'-O-(1-méthyl-1,21-dioxo-2,5,8,11,14,17,20-heptaoxa-21-thiadocosa-1-yl)-5'-O-trisopropylisilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **87**



A une solution de **85** (902 mg, 1.05 mmol) et de DIPEA (459 μ L, 2.64 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (27 mL) est ajouté sous argon le MsCl (98 μ L, 1.27 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans un mélange composé de 70 mL d'eau et 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **87** (910 mg, 0.98 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

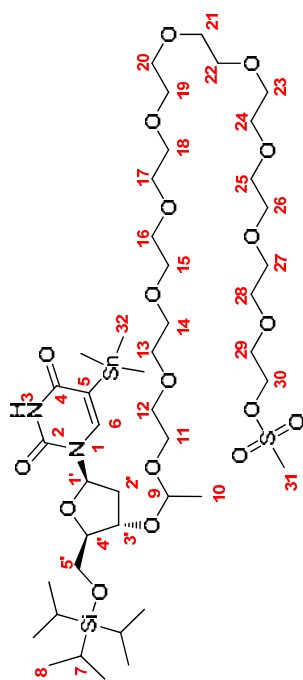
Rendement : 93 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 50/50/4.5, v/v/v) : 0.29

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.27 (s, 9H, H_{24}), 1.01-1.22 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.34 (m, 3H, H_{10}), 1.93-2.17 (m, 1H, H_2), 2.41-2.50 (m, 1H, H_2), 3.08 (s, 3H, H_{23}), 3.53-3.80 (m, 22H, H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20} , H_{21}), 3.84-3.92 (m, 2H, H_5), 4.06-4.13 (m, 1H, H_4), 4.35-4.45 (m, 3H, H_3 , H_{22}), 4.81-4.86 (m, 1H, H_9), 6.13-6.23 (m, 1H, H_1), 7.17 et 7.22 (2xs, 1H, H_6), 8.23 et 8.26 (2x1s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -9.1 ($J_{\text{C-Sn}}$ = 176 Hz (^{119}Sn), 185 Hz (^{117}Sn), 3C $_{24}$), 12.0 (3C $_7$), 18.1 (6C $_8$), 20.1 (C $_{10}$), 37.8 (C $_{23}$), 38.5 (C $_2$), 63.7, 63.8, 64.1 (C $_{11}$, C $_5$), 69.1 (C $_{22}$), 69.4 (C $_{21}$), 70.6-70.7 (C $_{12}$, C $_{13}$, C $_{14}$, C $_{15}$, C $_{16}$, C $_{17}$, C $_{18}$, C $_{19}$, C $_{20}$), 74.5 (C $_3$), 85.5, 85.7, 85.9 (C $_1$, C $_4$), 99.0, 99.7 (C $_9$), 112.6 (C $_5$), 143.0, 143.1 (C $_6$), 150.9 (C $_2$), 166.3 (C $_4$)

3'-O-(1-méthyl-33,33-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaossa-33-thiatétracontriacont-1-yl)-5'-O-trisopropylisilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **88**



A une solution de **86** (186 mg, 0.18 mmol) et de DIPEA (81 μ L, 0.47 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (6 mL) est ajouté sous argon le MsCl (17 μ L, 0.22 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans un mélange composé de 15 mL d'eau et 35 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 3x8 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **88** (118 mg, 0.11 mmol).

Aspect : caramel jaune orangé

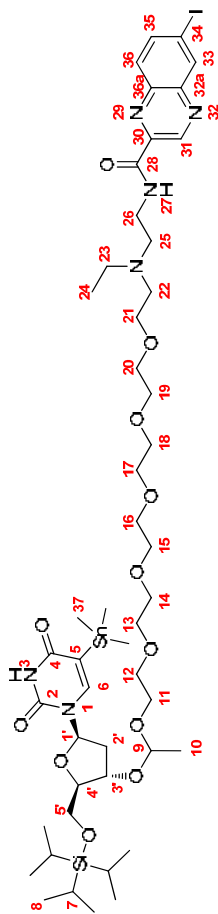
Rendement : 59 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol, 46/46/8, v/v) : 0.32

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.26 (s, 9H, H_{32}), 1.00-1.11 (m, 21H, H_7 , H_8), 1.33 et 1.34 (2xd, 3H, J = 5 Hz, H_{10}), 1.94-2.15 (m, 1H, H_2), 2.40-2.53 (m, 1H, H_2), 3.07 (s, 3H, H_{31}), 3.59-3.67 (m, 36H, H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23} , H_{24} , H_{25} , H_{26} , H_{27} , H_{28}), 3.73-3.80 (m, 2H, H_{29}), 3.81-3.92 (m, 2H, H_5), 3.96-4.14 (m, 1H, H_4), 4.35-4.39 (m, 2H, H_{30}), 4.44-4.47 (m, 1H, H_3), 4.81-4.85 (m, 1H, H_9), 6.13-6.20 (m, 1H, H_1), 7.16 et 7.21 (2xs, 1H, H_6), 8.39 et 8.42 (2x1s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -9.1 ($J_{\text{C-Sn}}$ = 179 Hz (^{119}Sn), 188 Hz (^{117}Sn), 3C $_{32}$), 12.0 (3C $_7$), 18.1 (6C $_8$), 20.2 (C $_{10}$), 37.8, 38.5 (C $_2$), 37.8 (C $_{31}$), 63.7, 63.8, 64.1 (C $_5$, C $_{11}$), 69.1 (C $_{30}$), 69.4 (C $_{29}$), 70.5-70.7 (C $_{12}$, C $_{13}$, C $_{14}$, C $_{15}$, C $_{16}$, C $_{17}$, C $_{18}$, C $_{19}$, C $_{20}$, C $_{21}$, C $_{22}$, C $_{23}$, C $_{24}$, C $_{25}$, C $_{26}$, C $_{27}$, C $_{28}$), 74.5, 75.8 (C $_3$), 85.5, 85.7, 85.9 (C $_1$, C $_4$), 99.0, 99.7 (C $_9$), 112.5, 112.6 (C $_5$), 143.0, 143.1 (C $_6$), 150.8 (C $_2$), 166.1 (C $_4$)

3'-O-(20-éthyl-24-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-24-oxo-2,5,8,11,14,17-hexaoxa-20,23-diazatétracos-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **89**



A une solution de **87** (865 mg, 0.93 mmol) et de DIPEA (242 μ L, 1.39 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (17 mL) est ajouté sous argon l'amine secondaire **13** (514 mg, 1.39 mmol). Le mélange est agité à 65 °C pendant 90 h puis versé dans un mélange composé de 70 mL d'eau + 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **89** (395 mg, 0.33 mmol).

Aspect : caramel brun

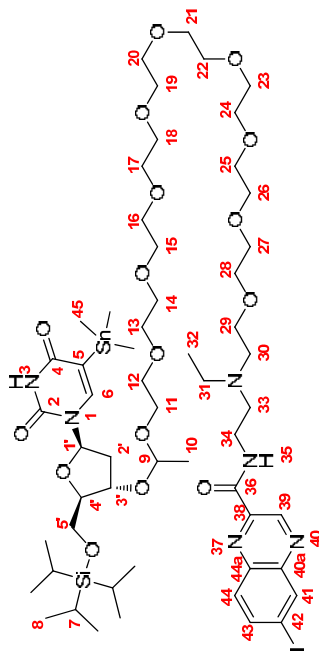
Rendement : 35 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 93/7/1, v/v/v) : 0.30

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.27 (s, 9H, H₃₇), 1.01-1.10 (m, 24H, H₇, H₈, H₂₄), 1.33 (m, 3H, H₁₀), 1.92-2.16 (m, 1H, H₂), 2.40-2.54 (m, 1H, H₂), 2.66 (q, 2H, J = 7 Hz, H₂₃), 2.73-2.81 (m, 4H, H₂₂, H₂₅), 3.53-3.80 (m, 24H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₆), 3.84-3.92 (m, 2H, H₅), 4.02-4.13 (m, 1H, H₄), 4.38-4.48 (m, 1H, H₃), 4.78-4.88 (m, 1H, H₉), 6.13-6.22 (m, 1H, H₁), 7.16 et 7.21 (2xs, 1H, H₆), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₆), 8.07 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₃₅), 8.25-8.43 (lm, 2H, H₃, H₂₇), 8.60 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃₃), 9.64 (s, 1H, H₃₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -9.1 (J_{C-Si} = 179 Hz (¹¹⁹Sn), 188 Hz (¹¹⁷Sn), 3C₃₇), 12.0 (3C₇), 12.2 (C₂₄), 18.1 (6C₈), 20.2 (C₁₀), 37.6 (C₂₆), 37.8, 38.5 (C₂), 48.7 (C₂₃), 52.8, 53.0 (C₂₂, C₂₅), 63.7, 64.1 (C₁₁), 63.8 (C₅), 70.2-70.6 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁), 74.5, 75.8 (C₃), 85.5, 85.9 (C₄), 85.7 (C₁), 98.0 (C₃₄), 99.0, 99.7 (C₉), 112.6, 112.7 (C₃), 130.9 (C₃₆), 138.7 (C₃₃), 139.6 (C_{36a}), 139.7 (C₃₅), 143.0, 143.1 (C₆), 144.3, 144.4 (C₃₀, C_{32a}), 144.8 (C₃₁), 150.9 (C₂), 163.0 (C₂₈), 166.2 (C₄)

3'-O-(32-éthyl-36-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-decaoxa-3,2,35-diazahexatriacont-1-yl)-5'-O-triisopropylsilyl-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine **90**



A une solution de **88** (100 mg, 0.93 mmol) et de DIPEA (31 μ L, 0.18 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (2 mL) est ajouté sous argon l'amine secondaire **13** (43 mg, 0.12 mmol). Le mélange est agité à 70 °C pendant 72 h puis versé dans un mélange composé de 35 mL d'eau et 15 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **90** (32 mg, 0.02 mmol).

Aspect : caramel brun

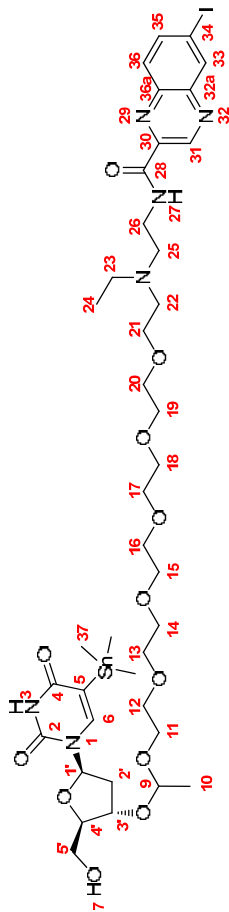
Rendement : 26 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 30/60/10/0.5, v/v/v/v) : 0.26

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.26 (s, 9H, H₄₅), 1.02-1.12 (m, 24H, H₇, H₈, H₃₂), 1.53 (m, 3H, H₁₀), 1.94-2.18 (m, 1H, H₂), 2.39-2.52 (m, 1H, H₂), 2.67 (q, 2H, J = 7 Hz, H₃₁), 2.72-2.83 (m, 4H, H₃₀, H₃₃), 3.52-3.82 (m, 40H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₄), 3.82-3.90 (m, 2H, H₅), 4.01-4.11 (m, 1H, H₄), 4.37-4.49 (m, 1H, H₃), 4.75-4.84 (m, 1H, H₉), 6.12-6.23 (m, 1H, H₁), 7.18 et 7.23 (2xs, 1H, H₆), 7.82 (d, 1H, J = 9 Hz, H₄₄), 8.09 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₄₃), 8.37-8.49 (m, 2H, H₃, H₃₅), 8.61 (d, 1H, J = 2 Hz, H₄₁), 9.65 (s, 1H, H₃₉)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -9.2 (J_{C-Si} = 178 Hz (¹¹⁷Sn), 188 Hz (¹¹⁹Sn), 3C₄₅), 12.0 (3C₇), 12.2 (C₃₂), 18.1 (6C₈), 20.1 (C₁₀), 37.6 (C₃₄), 37.8, 38.5 (C₂), 48.7 (C₃₁), 52.8, 53.0 (C₃₀, C₃₃), 63.6, 64.1 (C₁₁), 63.8 (C₅), 70.1-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉), 74.5, 75.7 (C₃), 85.5, 85.9 (C₄), 85.7 (C₁), 98.0 (C₄₂), 98.9, 99.7 (C₉), 112.5, 112.7 (C₅), 130.9 (C₄₄), 138.6 (C₄₁), 139.6 (C_{44a}), 139.7 (C₄₃), 143.0, 143.1 (C₆), 144.3, 144.5 (C₃₈, C_{40a}), 144.8 (C₃₉), 150.8, 150.9 (C₂), 163.1 (C₃₆), 166.2 (C₄)

3'-O-(20-éthyl-24-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-24-oxo-2,5,8,11,14,17-hexaoxa-20,23-diazatetracos-1-yl)-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine 91



A une solution de **90** (350 mg, 0.29 mmol) dans le THF anhydre (11 mL) est ajouté sous argon le TBAF (IM dans le THF, 435 μ L, 0.44 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans un mélange composé de 35 mL d'eau et 15 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **91** (205 mg, 0.20 mmol).

Aspect : caramel jaune

Rendement : 67 %

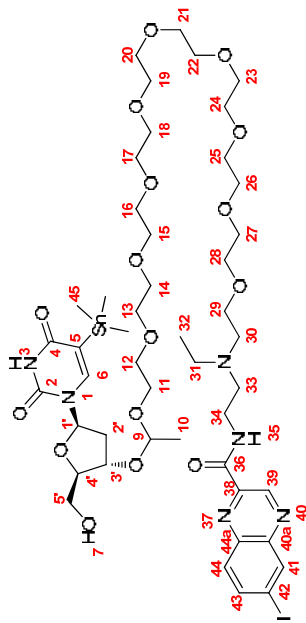
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 68/20/10/0.5, v/v/v/v) : 0.31

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.27 (s, 9H, H₃₇), 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, H₂₄), 1.31 (d, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 2.22-2.41 (m, 2H, H₂), 2.66 (q, 2H, J = 7 Hz, H₂₃), 2.72-2.81 (m, 4H, H₂₂, H₂₅), 3.48-3.70 (m, 24H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₆), 3.73-3.93 (m, 2H, H₅), 4.02-4.13 (m, 1H, H₄), 4.54-4.62 (m, 1H, H₃), 4.79-4.86 (q, 1H, J = 5 Hz, H₆), 6.13-6.21 (m, 1H, H₁), 7.51 et 7.58 (2xs, 1H, H₆), 7.82 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₆), 8.08 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₃₅), 8.15 (ls, 1H, H₃), 8.42 (ls, 1H, H₂₇), 8.61 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃₃), 9.64 (s, 1H, H₃₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -9.2 (J_{C-Sn} = 178 Hz (¹¹⁹Sn), 187 Hz (¹¹⁷Sn), 3C₃₇), 12.2 (C₂₄), 19.8, 20.3 (C₁₀), 37.6 (C₂₆), 38.2, 39.4 (C₂), 48.7 (C₂₃), 52.8, 53.0 (C₂₂, C₂₅), 61.8, 62.2 (C₅), 62.7, 64.7 (C₁₁), 70.1-70.7 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁), 72.83-74.54 (C₃), 85.5, 86.0 (C₁), 86.2, 86.7 (C₄), 98.0 (C₃₄), 98.7, 99.0 (C₉), 112.6, 112.7 (C₃), 130.9 (C₃₆), 138.6 (C₃₃), 139.6 (C_{36a}), 139.7 (C₃₅), 144.3, 144.4 (C₃₀, C_{32a}), 144.7, 144.8 (C₆), 144.7 (C₃₁), 151.1 (C₂), 163.0 (C₂₈), 166.3, 166.4 (C₄)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 1053.25 / [M+H]⁺_{mes} = 1053.37

3'-O-(32-éthyl-36-(6-iodoquinoxalin-2-yl)-1-méthyl-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-decaoxa-32,35-diazahexatriacont-1-yl)-5-triméthylstannyl-2'-déoxyuridine 92



A une solution de **90** (32 mg, 0.02 mmol) dans le THF anhydre (1 mL) est ajouté sous argon le TBAF (IM dans le THF, 41 μ L, 0.04 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans un mélange composé de 35 mL d'eau et 15 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution obtenue est extraite avec 3x10 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **92** (8 mg, 0.01 mmol).

Aspect : caramel brun

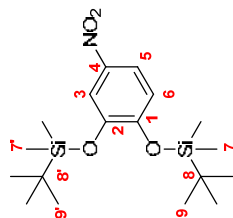
Rendement : 30 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 20/68/12/0.5, v/v/v/v) : 0.28

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.26 (s, 9H, H₄₅), 1.06 (t, 3H, J = 7 Hz, H₃₂), 1.32 (d, 3H, J = 5 Hz, H₁₀), 2.14-2.40 (m, 2H, H₂), 2.66 (q, 2H, J = 7 Hz, H₃₁), 2.73-2.84 (m, 4H, H₃₀, H₃₃), 3.58-3.74 (m, 40H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₄), 3.69-3.89 (m, 2H, H₅), 4.03-4.10 (m, 1H, H₄), 4.54-4.64 (m, 1H, H₃), 4.79-4.86 (q, 1H, J = 5 Hz, H₆), 6.15-6.22 (m, 1H, H₁), 7.52 et 7.58 (2xs, 1H, H₆), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz, H₄₄), 8.07 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₄₃), 8.44 (ls, 1H, H₃₅), 8.60 (d, 1H, J = 2 Hz, H₄₁), 9.63 (s, 1H, H₃₉)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -9.2 (J_{C-Sn} = 179 Hz (¹¹⁹Sn), 188 Hz (¹¹⁷Sn), 3C₄₅), 12.2 (C₃₂), 19.8, 20.3 (C₁₀), 37.5 (C₃₄), 38.2, 39.4 (C₂), 48.6 (C₃₁), 52.8, 53.0 (C₃₀, C₃₃), 61.9, 62.2 (C₅), 62.6, 64.7 (C₁₁), 70.1-70.9 (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉), 72.8, 74.5 (C₃), 85.4, 86.0 (C₁), 86.1, 86.7 (C₄), 98.1 (C₄₂), 98.7, 99.0 (C₉), 112.5, 112.7 (C₃), 130.9 (C₄₄), 138.6 (C₄₁), 139.6 (C_{44a}), 139.8 (C₄₃), 144.2, 144.3 (C₃₈, C_{40a}), 144.7, 144.8 (C₆), 144.7 (C₃₉), 151.1 (C₂), 163.0 (C₃₆), 166.3 (C₄)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 1229.36 / [M+H]⁺_{mes} = 1229.40



A une solution de 4-nitrocatechol (1.5 g, 9.67 mmol) et d'imidazole (2.107 g, 30.95 mmol) dans le THF anhydre (25 mL) est additionnée sous argon une solution de TBDMSCl (3.790 g, 25.15 mmol) dans le THF anhydre (20 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h 30 puis versé dans un mélange composé de 140 mL d'eau et 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 2x80 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 70 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **93** (3.648 g, 9.51 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 98 %

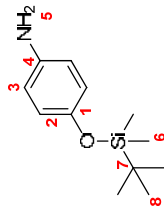
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 3/97, v/v) : 0.30

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 695, 747, 780, 838, 859, 975, 1088, 1130, 1235, 1268, 1300, 1338, 1514, 1582, 2858, 2928

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.25 (s, 12H, H₇), 0.99 (s, 18H, H₉), 6.87 (d, 1H, J = 9 Hz, H₆), 7.71 (d, 1H, J = 3 Hz, H₅), 7.77 (dd, 1H, J = 9 Hz, 3Hz, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.1, -4.0 (2C₇, 2C_{7'}), 18.5, 18.6 (C₈, C₈'), 25.9 (3C₉, 3C_{9'}), 116.3 (C₃), 117.9 (C₅), 120.1 (C₆), 141.8 (C₄), 147.1 (C₂), 153.7 (C₁)

4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)aniline **94**



A une solution de *p*-aminophénol (1.5 g, 13.75 mmol) et d'imidazole (1.497 g, 21.99 mmol) dans le THF anhydre (25 mL) est additionnée sous argon une solution de TBDMSCl (2.693 g, 17.87 mmol) dans le THF anhydre (20 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h 30 puis versé dans un mélange composé de 140 mL d'eau et 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 2x80 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 70 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **94** (2.839 g, 12.71 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 92 %

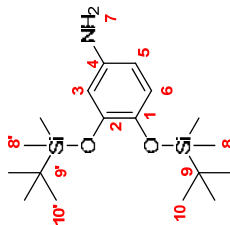
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.33

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 810, 840, 911, 935, 1247, 1472, 1510, 1609, 2859, 2930, 2959

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.14 (s, 3H, H₆), 0.15 (s, 3H, H₆), 0.96 (s, 9H, H₈), 3.40 (ls, 2H, H₅), 6.55-6.68 (m, 4H, H₂, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.4 (2C₆), 18.3 (C₇), 25.9 (3C₈), 116.4 (2C₃), 120.8 (2C₂), 140.4 (C₄), 148.3 (C₁)

3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)aniline **95**



A une solution de **93** (3.748 g, 9.77 mmol) dans l'éthanol anhydre (112 mL) est ajouté le Pd/C (10 % m/m, 1.040 g, 0.98 mmol). Le milieu est purgé 6 fois (vide / atmosphère H₂) puis agité vigoureusement à TA pendant 3 h sous atmosphère d'H₂. Le milieu réactionnel est filtré sur Celite® 545 (rinçage avec 2x50 mL d'AcOEt). Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **95** (3.020 g, 8.54 mmol).

Aspect : huile quasi incolore, solide à 4 °C

Rendement : 87 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 14/86, v/v) : 0.26

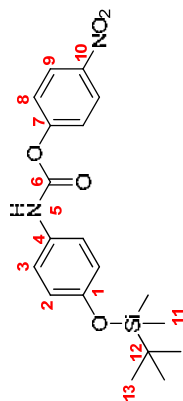
Point de fusion : < 45 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 616, 837, 900, 984, 1114, 1220, 1252, 1321, 1472, 1503, 1609, 2857, 2929, 3325

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.15 (s, 6H, H₈ ou H_{8'}), 0.19 (s, 6H, H₈ ou H_{8'}), 0.96 (s, 9H, H₁₀ ou H_{10'}), 0.98 (s, 9H, H₁₀ ou H_{10'}), 3.92 (ls, 2H, H₇), 6.21 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, H₅), 6.27 (d, 1H, *J* = 3 Hz, H₃), 6.64 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H₆)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.0 (2C₈, 2C_{8'}), 18.6 (C₉, C_{9'}), 26.1 (3C₁₀, 3C_{10'}), 108.5 (C₅), 109.3 (C₃), 121.7 (C₆), 139.7 (C₁), 140.6 (C₄), 147.3 (C₂)

4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phénylcarbamate de 4-nitrophényle) **96**



A une solution de **94** (1.5 g, 6.72 mmol) dans le THF anhydre (45 mL) est ajouté sous argon le chloroformiate de *p*-nitrophényle (1.421 g, 7.05 mmol) puis une solution de pyridine (1.09 mL, 13.43 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) est lentement additionnée sous argon. Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans 250 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x120 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 100 mL d'eau et 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **96** (2.474 g, 6.37 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 95 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 15/85, v/v) : 0.28

Point de fusion : 155-157 °C

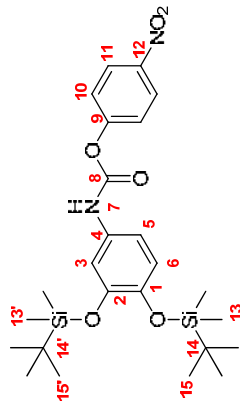
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 784, 847, 999, 1107, 1215, 1268, 1345, 1489, 1508, 1531, 1723, 1757, 2859, 2931, 3334

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.19 (s, 6H, H₁₁), 0.98 (s, 9H, H₁₃), 6.82 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.04 (ls, 1H, H₅), 7.29 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃), 7.36 (d, 2H, J = 9 Hz, H₈), 8.26 (d, 2H, J = 9 Hz, H₉)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.3 (2C₁₁), 18.3 (C₁₂), 25.8 (3C₁₃), 120.7 (2C₂), 120.9 (2C₃), 122.2 (2C₈), 125.3 (2C₉), 130.3 (C₄), 145.1 (C₁₀), 150.6 (C₆), 152.8 (C₁), 155.7 (C₇)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 389.16 / [M+H]⁺_{ms} = 389.15

3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phénylcarbamate de 4-nitrophényle) **97**



A une solution de **95** (1.5 g, 4.24 mmol) dans le THF anhydre (45 mL) est ajouté sous argon le chloroformiate de *p*-nitrophényle (898 mg, 4.45 mmol) puis une solution de pyridine (686 μL, 8.48 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) est lentement additionnée sous argon. Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 250 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x120 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 100 mL d'eau et 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **97** (2.140 g, 4.13 mmol).

Aspect : solide jaune pâle

Rendement : 97 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 10/90, v/v) : 0.29

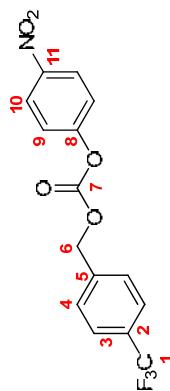
Point de fusion : 113-115 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 781, 840, 903, 991, 1209, 1253, 1350, 1490, 1512, 1610, 1722, 2859, 2931, 2972, 3325

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.19 (s, 6H, H₁₃ ou H_{13'}), 0.22 (s, 6H, H₁₃, H_{13'}), 0.98 (s, 18H, H₁₅, H_{15'}), 6.79-6.81 (m, 3H, H₅, H₆, H₇), 7.10 (ls, 1H, H₃), 7.38 (d, 2H, J = 9 Hz, H₁₀), 8.28 (d, 2H, J = 9 Hz, H₁₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.0 (2C₁₃, 2C_{13'}), 18.6 (C₁₄, C_{14'}), 26.1 (3C₁₅, 3C_{15'}), 112.2 (C₅), 112.9 (C₃), 121.3 (C₆), 122.3 (2C₁₀), 125.4 (2C₁₁), 130.4 (C₄), 144.0 (C₁), 145.1 (C₁₂), 147.4 (C₂), 150.3 (C₈), 155.7 (C₉)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-nitrophényle **98**



A une solution d'alcool 4-trifluorométhylbenzylique (1.5 g, 8.52 mmol) et de chloroformiate de *p*-nitrophényle (1.802 g, 8.94 mmol) dans le THF anhydre (45 mL) est additionnée sous argon une solution de pyridine (1.38 mL, 17.03 mmol) dans le THF anhydre (15 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 600 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x200 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 200 mL d'eau et 200 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **98** (2.501 g, 7.33 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 86 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 18/82, v/v) : 0.35

Point de fusion : 95-97 °C

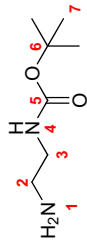
IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 724, 752, 775, 832, 864, 1065, 1135, 1223, 1259, 1325, 1348, 1522, 1763

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 5.35 (s, 2H, H₆), 7.39 (d, 2H, J = 9 Hz, H₉), 7.56 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂), 7.69 (d, 2H, J = 8 Hz, H₃), 8.28 (d, 2H, J = 9 Hz, H₁₀)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 69.9 (C₆), 115.9, 121.3, 126.7, 132.1 (q, ¹J_{C-F} = 271 Hz, C₁), 121.9 (2C₉), 125.5 (2C₁₀), 125.9 (q, ³J_{C-F} = 4 Hz, 2C₃), 128.7 (2C₄), 130.3, 130.9, 131.6, 132.2 (q, ²J_{C-F} = 33 Hz, C₂), 138.3 (C₅), 145.6 (C₁₁), 152.5 (C₇), 155.5 (C₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 342.15 / [M+H]⁺_{mes} = 341.88

2-aminoéthylcarbamate de *tert*-butyle **99**



A une solution d'éthylène diamine (10 g, 166.40 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (50 mL) agitée vigoureusement est lentement additionnée (temps d'addition : 8 h) sous argon une solution de Boc₂O (6.053 g, 27.73 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (400 mL) puis le mélange est agité à TA pendant 20 h. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu repris avec 500 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x150 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à **99**.

Le résidu obtenu est utilisé sans purification.

Aspect : huile jaunâtre

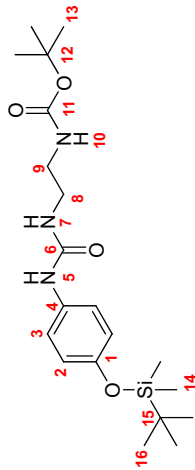
Rendement : quantitatif

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 645, 782, 958, 1046, 1169, 1252, 1366, 1392, 1528, 1689, 2977, 3355

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.12 (ls, 2H, H₁), 1.40 (s, 9H, H₇); 2.75 (t, 2H, J = 6 Hz, H₂), 3.12 (q, 2H, J = 6 Hz, H₃), 5.00 (ls, 1H, H₄)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 28.5 (3C₇), 42.0 (C₂), 43.5 (C₃), 79.3 (C₆), 156.3 (C₅)

2-((4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréido)éthyl)carbamate de *tert*-butyle **108**



A une solution de **99** (502 mg, 3.13 mmol) et de NEt₃ (440 µL, 3.13 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (11 mL) est additionnée sous argon une solution de **96** (811 mg, 2.09 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (11 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h, puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 20 mL puis 2x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées et lavées avec 2x50 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **108** (853 mg, 2.08 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 99 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 60/40, v/v) : 0.33

Point de fusion : 152-154 °C

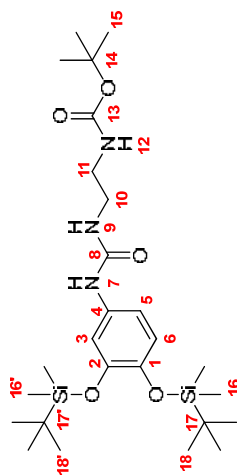
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 659, 780, 805, 835, 919, 1168, 1248, 1288, 1508, 1570, 1649, 1687, 2931, 3314

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.18 (s, 6H, H₁₄), 0.97 (s, 9H, H₁₆), 1.41 (s, 9H, H₁₃), 3.22-3.35 (m, 4H, H₈, H₉), 5.04 (ls, 1H, H₁₀), 5.27 (t, 1H, J = 6 Hz, H₇), 6.55 (ls, 1H, H₅), 6.78 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.14 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.3 (2C₁₄), 18.3 (C₁₅), 25.8 (3C₁₆), 28.5 (2C₁₃), 79.7 (C₁₂), 120.6 (2C₂), 123.3 (2C₃), 132.1 (C₄), 152.3 (C₁), 156.9, 157.2 (C₆, C₁₁)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 410.25 / [M+H]⁺_{mes} = 410.20

2-((3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréido)éthylcarbamate de *tert*-butyle **109**



A une solution de **97** (707 mg, 1.36 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (11 mL) est additionnée sous argon une solution de **99** (262 mg, 1.64 mmol) et de DMAP (216 mg, 1.77 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30, puis versé dans 100 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 30 mL puis 2x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées et lavées avec 2x50 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 % séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **109** (585 mg, 1.08 mmol).

Aspect : meringue blanche

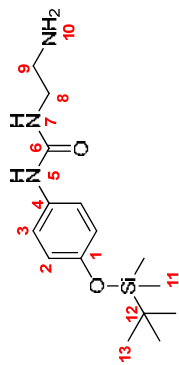
Rendement : 80 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 45/55, v/v) : 0.30

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.18 (s, 6H, H₁₆ ou H_{16'}), 0.20 (s, 6H, H₁₆, H_{16'}), 0.98 (s, 18H, H₁₈, H_{18'}), 1.41 (s, 9H, H₁₃), 3.21-3.27 (m, 2H, H₁₁), 3.29-3.35 (m, 2H, H₁₀), 5.05 (ls, 1H, H₁₂), 5.57 (t, 1H, J = 5 Hz, H₉), 6.47 (ls, 1H, H₇), 6.68 (dd, 1H, J = 9 Hz, 2 Hz, H₅), 6.75 (d, 1H, J = 9 Hz, H₆), 6.86 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.0 (2C₁₆, 2C_{16'}), 18.5 (C₁₇, C_{17'}), 26.1 (3C₁₈, 3C_{18'}), 28.5 (3C₁₅), 40.5 (C₁₀), 41.5 (C₁₁), 79.6 (C₁₄), 114.7 (C₅), 115.2 (C₃), 121.2 (C₆), 132.2 (C₄), 143.6 (C₁), 147.2 (C₂), 156.9, 157.1 (C₈, C₁₃)

N-(2-aminoéthyl)-N'-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)urée **110**



A une solution de **108** (919 mg, 2.24 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (20 mL) est ajouté sous argon le TFA (1.38 mL, 17.95 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h 30, puis versé dans 250 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x150 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées et lavées avec 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **110** (596 mg, 1.93 mmol).

Aspect : solide pâteux blanc

Rendement : 86 %

Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol, 85/15, v/v) : 0.33

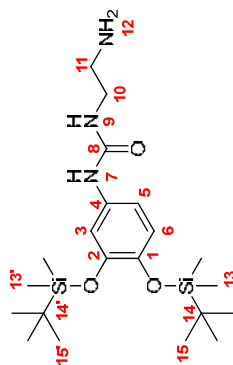
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 778, 840, 919, 1246, 1508, 1559, 1604, 1664, 2930, 3302

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.18 (s, 6H, H₁₁), 0.97 (s, 9H, H₁₃), 1.28 (ls, 2H, H₁₀), 2.83 (ls, 2H, H₆), 3.28 (q, 2H, J = 6 Hz, H₈), 5.32 (t, 1H, J = 5 Hz, H₇), 6.79 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.14 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃), 7.10-7.25 (ls, 1H, H₅)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.4 (C₁₁), 18.3 (C₁₂), 25.8 (3C₁₃), 42.3 (C₉), 43.1 (C₈), 120.6 (C₂), 122.8 (C₃), 132.6 (C₄), 152.0 (C₁), 157.5 (C₆)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 310.20 / [M+H]⁺_{mes} = 310.12

N*-(2-aminoéthyl)-*N'*-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)phényl)urée **111*



A une solution de **109** (1.240 g, 2.30 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (25 mL) est ajouté sous argon le TFA (1.41 mL, 18.38 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h 30, puis versé dans 250 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x150 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées et lavées avec 150 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **111** (789 mg, 1.79 mmol).

Aspect : meringue blanche

Rendement : 78 %

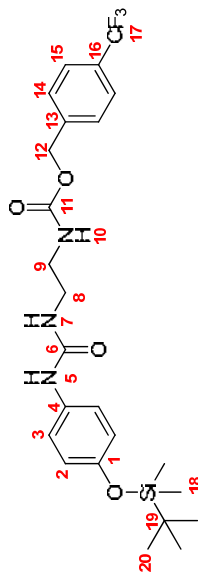
Rf (Al_2O_3 , dichlorométhane/éthanol, 75/25, v/v) : 0.20

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 795, 841, 907, 1225, 1255, 1278, 1509, 1660, 2858, 2930

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.17 (s, 6H, H_{13} ou $\text{H}_{13'}$), 0.19 (s, 6H, H_{13} ou $\text{H}_{13'}$), 0.97 (s, 18H, H_{15} , $\text{H}_{15'}$), 1.51 (s, 2H, H_{12}), 2.80 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz, H_{11}), 3.26 (q, 2H, $J = 5.5$ Hz, H_{10}), 5.52 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, H_9), 6.66 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, 2 Hz, H_5), 6.74 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_6), 6.90 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_3), 7.32 (ls, 1H, H_7)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.0 (2C_{13} , $2\text{C}_{13'}$), 18.6 (C_{14} , $\text{C}_{14'}$), 26.1 (3C_{15} , $3\text{C}_{15'}$), 42.1 (C_{11}), 43.0 (C_{10}), 115.2 (C_5), 115.7 (C_3), 121.3 (C_6), 132.2 (C_4), 143.9 (C_1), 147.3 (C_2), 157.2 (C_8)

2-(3-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)phényl)uréido)éthylcarbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **112**



A une solution de **110** (691 mg, 2.23 mmol) et de NEt_3 (314 μL , 2.23 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (7 mL) est additionnée sous argon une solution de **98** (508 mg, 1.49 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (7 mL). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x50 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **112** (713 mg, 1.39 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 94 %

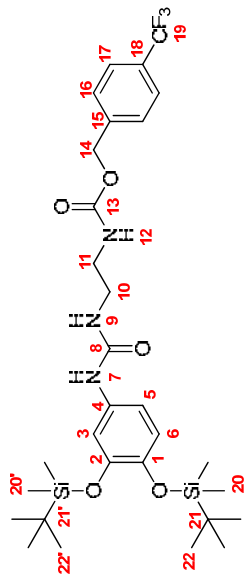
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 80/20, v/v) : 0.40

Point de fusion : 179-181 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.18 (s, 6H, H_{18}), 0.97 (s, 9H, H_{20}), 3.29-3.37 (m, 4H, H_8 , H_9), 5.05-5.12 (m, 1H, H_{10}), 5.12 (s, 2H, H_{12}), 5.54 (ls, 1H, H_7), 6.38 (s, 1H, H_5), 6.78 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.09 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.42 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{14}), 7.57 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{15})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.5 (C_{18}), 18.2 (C_{19}), 25.7 (3C_{20}), 40.0, 42.0 (C_8 , C_9), 65.7 (C_{12}), 115.9, 121.3, 126.8, 132.2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{17}), 120.6 (2C_2), 123.1 (2C_3), 125.46 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{15}), 127.7 (2C_{14}), 130.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{16}), 131.8 (C_4), 140.6 (C_{13}), 152.4 (C_1), 156.9 (C_{11}), 157.5 (C_6)

2-(3-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)oxy)phényl)uréido)éthylcarbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **113**



A une solution de **98** (408 mg, 1.20 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est additionnée sous argon une solution de **111** (789 mg, 1.80 mmol) et de NEt_3 (252 μL , 1.79 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 75 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 10 mL puis 2x25 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 40 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **113** (744 mg, 1.16 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 97 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 65/35, v/v) : 0.36

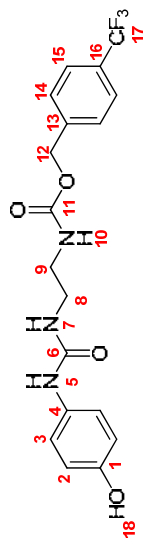
Point de fusion : 136-138 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 781, 840, 911, 1127, 1168, 1252, 1327, 1509, 1561, 1605, 1645, 1702, 2860, 2932, 3334

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.17 (s, 6H, H_{20} ou $\text{H}_{20'}$), 0.18 (s, 6H, H_{20} ou $\text{H}_{20'}$), 0.96 (s, 9H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 0.97 (s, 9H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 3.30 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 5.10 (s, 2H, H_{14}), 5.65 (ls, 1H, H_{12}), 6.63 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_5), 6.74 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_6), 6.89 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H_3), 7.40 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.55 (d, 2H, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.0 (2C_{20} , $2\text{C}_{20'}$), 18.6 (C_{21} , $\text{C}_{21'}$), 26.0 (3C_{22} , $3\text{C}_{22'}$), 40.3 (C_{11}), 42.2 (C_{10}), 65.9 (C_{14}), 115.7 (C_3), 116.2 (C_3), 121.3 (C_6), 116.2, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 269$ Hz, C_{19}), 125.6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{17}), 127.9 (2C_{16}), 129.4, 130.0, 130.6, 131.3 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 131.5 (C_4), 140.7 (C_{15}), 144.4 (C_1), 147.4 (C_2), 156.9 (C_{13}), 157.3 (C_8)

2-(3-(4-hydroxyphényl)uréido)éthylcarbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **114**



A une solution de **112** (713 mg, 1.39 mmol) dans le THF anhydre (21 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 1.67 mL, 1.67 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans 25 mL d'AcOEt, lavé avec 50 mL de solution aqueuse d'HCl 0.1N. La solution obtenue est extraite avec 2x25 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **114** (574 mg, quantitatif).

Aspect : solide blanc

Rendement : quantitatif

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol, 96/4, v/v) : 0.40

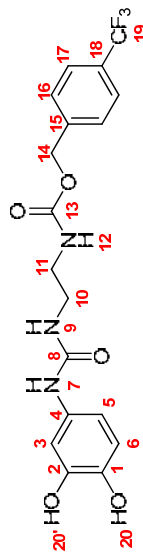
Point de fusion : 175-177 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 645, 831, 1006, 1070, 1117, 1164, 1218, 1270, 1334, 1513, 1542, 1572, 1641, 1692, 3314

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 3.12 (ls, 4H, H_8 , H_9), 5.13 (s, 2H, H_{12}), 6.04 (ls, 1H, H_{10}), 6.63 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.15 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.42 (ls, 1H, H_7), 7.55 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{14}), 7.71 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{15}), 8.18 (s, 1H, H_5), 8.95 (s, 1H, H_{18})

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 39.1, 41.1 (C_8 , C_9), 64.4 (C_{12}), 115.1 (2C_2), 116.2, 121.6, 127.0, 132.4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{17}), 120.0 (2C_3), 125.3 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{15}), 127.3, 127.9, 128.6, 129.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{16}), 127.9 (2C_{14}), 132.0 (C_4), 142.2 (C_{13}), 152.1 (C_1), 155.7, 156.1 (C_{6-6} , C_{11})

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 398.14$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 398.16$, $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{th}} = 396.12$ / $[\text{M}-\text{H}]^-_{\text{mes}} = 396.17$



A une solution de **113** (503 mg, 0.78 mmol) dans le méthanol anhydre (9 mL) est ajouté sous argon l'acide camphorsulfonique (73 mg, 0.31 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis versé dans 150 mL d'AcOEt. La solution obtenue est lavée successivement avec 70 mL d'eau et 70 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **115** (267 mg, 0.65 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 82 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol, 97/3, v/v) : 0.32

Point de fusion : 173-175 °C

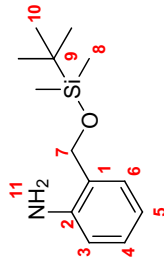
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 767, 826, 1068, 1123, 1166, 1233, 1330, 1435, 1552, 1620, 3355

RMN¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 3.06-3.15 (m, 4H, H₁₀, H₁₁), 5.12 (s, 1H, H₁₄), 5.99 (t, 1H, J = 5 Hz, H₁₂), 6.50-6.59 (m, 2H, H₅, H₆), 6.93 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.44 (t, 1H, J = 5 Hz, H₉), 7.55 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₆), 7.72 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₇), 8.10 (s, 1H, H₇), 8.35-8.80 (sex2, 1Hx2, H₂₀, H₂₁)

RMN¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 38.9 (C₁₁), 41.0 (C₁₀), 107.0 (C₃), 109.1 (C₆), 115.4 (C₅), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, ¹J_{C-F} = 270 Hz, C₁₉), 125.3 (q, ³J_{C-F} = 4 Hz, 2C₁₇), 127.3, 127.9, 128.5, 129.2 (q, ²J_{C-F} = 31 Hz, C₁₈), 127.9 (2C₁₆), 132.5 (C₄), 139.8 (C₁), 142.2 (C₁₅), 145.1 (C₂), 155.5, 156.1 (C₈, C₁₃)

IES-SM⁺ : [M+H]⁺ = 414.13 / [M+H]⁺ = 414.13, [M-H]⁻ = 412.11 / [M-H]⁻ = 411.85

2-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)méthyl)aniline **100**



A une solution d'alcool 2-aminobenzyle (2 g, 16,24 mmol) et d'imidazole (1,548 g, 22,74 mmol) dans le THF anhydre (30 mL) est additionnée sous argon une solution de TBDMSCI (2,937 g, 19,49 mmol) dans le THF anhydre (30 mL). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans un mélange composé de 140 mL d'eau et 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 2x100 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 80 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **100** (3,824 g, 16,11 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 99 %

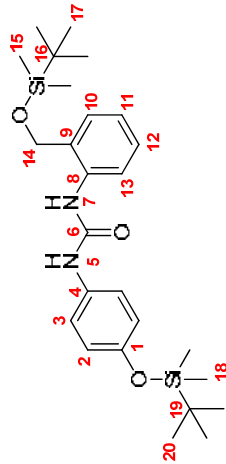
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 10/90, v/v) : 0,41

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 556, 748, 777, 836, 1056, 1256, 1462, 1496, 1621, 2857, 2929, 2954, 3373

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0,07 (s, 6H, H₈), 0,90 (s, 9H, H₁₀), 4,19 (ls, 2H, H₁₁), 4,68 (s, 2H, H₇), 6,65-6,73 (m, 2H, H₃, H₅), 7,01-7,05 (m, 2H, H₄, H₆)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5,1 (2C₈), 18,4 (C₉), 26,0 (3C₁₀), 65,0 (C₇), 115,8 (C₅), 118,0 (C₃), 125,3 (C₁), 128,6, 128,8 (C₄, C₆), 146,3 (C₂)

N-(2-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)benzyl)-N'-4-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréé **116**



A une solution de **100** (733 mg, 3,09 mmol) et de DMAP (327 mg, 2,68 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est additionnée sous argon une solution de **96** (800 mg, 2,06 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 72 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 20 mL puis 2x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **116** (831 mg, 1,71 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 83 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 15/85, v/v) : 0,34

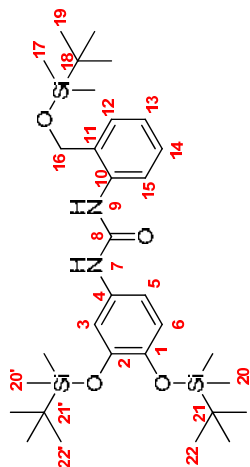
Point de fusion : 191-193 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 739, 780, 840, 919, 1080, 1120, 1254, 1510, 1605, 1631, 2857, 2931, 2955, 3297

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0,00 (s, 6H, H₁₅), 0,19 (s, 6H, H₁₈), 0,84 (s, 9H, H₁₇), 0,98 (s, 9H, H₂₀), 4,67 (s, 2H, H₁₄), 6,22 (s, 1H, H₇), 6,80 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 6,99-7,35 (m, 3H, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 7,18 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃), 7,67 (s, 1H, H₅), 7,91 (d, 1H, J = 7 Hz, H₁₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5,1 (2C₁₅), -4,3 (2C₁₈), 18,3, 18,4 (C₁₆, C₁₉), 25,8, 26,0 (3C₁₇, 3C₂₀), 64,7 (C₁₄), 120,8 (2C₂), 122,6 (C₁₃), 123,6 (C₁₁), 123,8 (2C₃), 128,4, 128,8 (C₁₀, C₁₂), 130,7, 131,3 (C₄, C₉), 137,9 (C₈), 152,9 (C₁), 153,9 (C₆)

N-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)phényl)-*N'*-(2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)benzyl)urée **117**



A une solution de **100** (687 mg, 2.89 mmol) et de DMAP (306 mg, 2.51 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (12.5 mL) est additionnée sous argon une solution de **97** (1 g, 1.93 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (12.5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 16 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 40 mL puis 2x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **117** (995 mg, 1.62 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 84 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 10/90, v/v) : 0.30

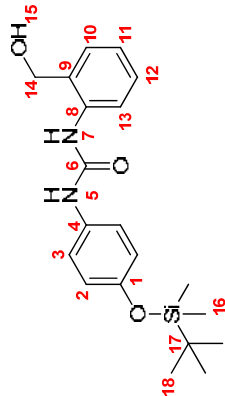
Point de fusion : 177-179 °C

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 779, 839, 894, 1085, 1124, 1226, 1255, 1421, 1508, 1557, 1629, 2858, 2930, 2962, 3355

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.02 (s, 6H, H₁₇), 0.19 (s, 6H, H₂₀ ou H_{20'}), 0.21 (s, 6H, H₂₀, H_{20'}), 0.86 (s, 9H, H₁₉), 0.98 (s, 9H, H₂₂ ou H_{22'}), 0.99 (s, 29H, H₂₂ ou H_{22'}), 4.68 (s, 2H, H₁₆), 6.13 (ls, 1H, H₉), 6.75-6.77 (m, 2H, H₃, H₁₂), 6.95-7.35 (m, 4H, H₅, H₆, H₁₃, H₁₄), 7.64 (ls, 1H, H₇), 7.89 (d, 1H, J = 8 Hz, H₁₅)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.1 (2C₁₇), -4.0 (2C₂₀, 2C_{20'}), 18.4, 18.6 (C₁₈, C₂₁, C_{21'}), 26.1 (3C₁₉, 3C₂₂, 3C_{22'}), 64.8 (C₁₆), 114.9, 115.5 (C₃, C₅), 121.2 (C₁₂), 122.5 (C₁₅), 123.6, 128.4, 128.9 (C₆, C₁₃, C₁₄), 130.6, 131.5 (C₄, C₁₀), 138.0 (C₁₁), 144.1 (C₁), 147.3 (C₂), 153.6 (C₈)

N-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)phényl)-*N'*-(2-(2-hydroxybenzyl)urée **118**



A une solution de **116** (800 mg, 1.64 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (16 mL) sont successivement ajoutés le NaI (25 mg, 0.16 mmol), le TBDMSCl (50 mg, 0.33 mmol) et l'eau (30 µL, 1.64 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 5 h puis versé dans un mélange composé de 40 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 100 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x40 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **118** (479 mg, 1.29 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 78 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.31

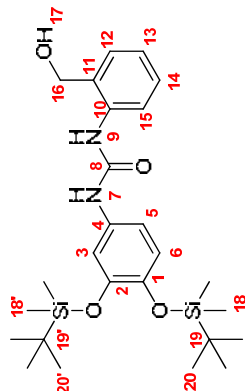
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 753, 779, 838, 915, 991, 1235, 1259, 1510, 1566, 1617, 1684, 2858, 2930, 2952, 3318

Point de fusion : 161-163 °C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.19 (s, 6H, H₁₆), 0.98 (s, 9H, H₁₈), 2.04 (t, 1H, J = 6 Hz, H₁₅), 4.62 (d, 2H, J = 6 Hz, H₁₄), 6.43 (s, 1H, H₇), 6.82 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.02-7.37 (m, 3H, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 7.22 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃), 7.61 (s, 1H, H₅), 7.86 (d, 1H, J = 8 Hz, H₁₃)

RMN ¹³C (50 MHz, Acetone d₆, δ) : -4.3 (2C₁₆), 18.8 (C₁₇), 26.1 (3C₁₈), 63.7 (C₁₄), 120.8, 121.2 (2C₂, 2C₃), 122.4, 123.1 (C₁₁, C₁₃), 128.8, 129.3 (C₁₀, C₁₂), 131.3 (C₉), 134.9 (C₄), 139.7 (C₈), 151.6 (C₁), 153.9 (C₆)

N-(3,4-bis((tert-butylidiméthylsilyloxy)phényl)-N'-(2-hydroxybenzyl)urée 119



A une solution de **117** (880 mg, 1.43 mmol) dans le méthanol anhydre (14 mL) et le CH_2Cl_2 anhydre (3 mL) est ajouté sous argon du I_2 (140 mg, 0.55 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solide est ajouté jusqu'à décoloration. 75 mL d'AcOEt sont ajoutés et la solution obtenue est lavée successivement avec 30 mL d'eau, 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 et 2x30 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchée sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **119** (667 mg, 1.33 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 93 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 25/75, v/v) : 0.48

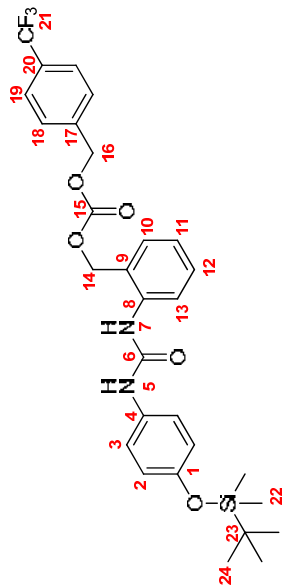
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 780, 913, 997, 1127, 1227, 1254, 1279, 1509, 1554, 1610, 1649, 2858, 2930, 2956, 3320

Point de fusion : 172-174 °C

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 0.16 (s, 6H, H_{18} ou $\text{H}_{18'}$), 0.20 (s, 6H, H_{18} ou $\text{H}_{18'}$), 0.95 (s, 9H, H_{20} ou $\text{H}_{20'}$), 0.96 (s, 9H, H_{20} , $\text{H}_{20'}$), 4.50 (d, 2H, $J = 5$ Hz, H_{16}), 5.40 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H_{17}), 6.74 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_6), 6.85 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, H_2), 6.95-7.23 (m, 3H, H_3 , H_{13} , H_{14}), 7.28 (d, 1H, $J = 7$ Hz, H_{15}), 7.82 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_5), 8.05 (s, 1H, H_7 ou H_9), 9.11 (s, 1H, H_7 ou H_9)

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : -4.3, -4.2 (2C_{18} , $2\text{C}_{18'}$), 18.1, 18.2 (C_{19} , $\text{C}_{19'}$), 25.8 (3C_{20} , $3\text{C}_{20'}$), 61.1 (C_{16} , H_{11} , 3 , C_5), 111.4 (C_3 , C_5), 120.6, 121.4, 122.1 (C_6 , C_{12} , C_{15}), 127.4, 128.0 (C_{13} , C_{14}), 131.2, 134.1 (C_4 , C_{10}), 137.6 (C_{11}), 140.7 (C_1), 145.9 (C_2), 152.7 (C_8)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 2-(3-(4-(tert-butylidiméthylsilyloxy)phényl)urée)benzyle 120



A une solution de **118** (460 mg, 1.24 mmol) et de DMAP (151 mg, 1.24 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (15 mL) est additionnée sous argon une solution de **98** (351 mg, 1.03 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 24 h puis versé dans 75 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 10 mL puis 2x25 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x30 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **120** (387 mg, 0.69 mmol).

Aspect : caramel incolore

Rendement : 67 %

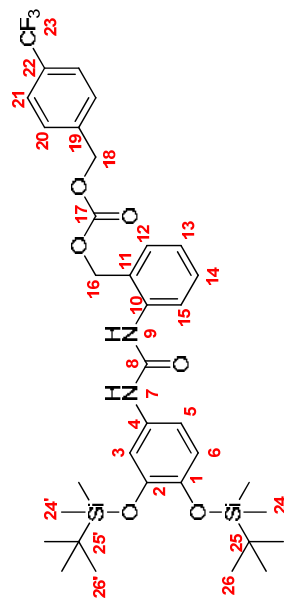
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 6/94, v/v) : 0.28

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 781, 841, 914, 1067, 1127, 1166, 1264, 1327, 1509, 1556, 1649, 1751, 2860, 2932, 2956, 3323

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.16 (s, 6H, H_{22}), 0.96 (s, 9H, H_{24}), 5.13 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 5.15 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 6.39 (s, 1H, H_7), 6.80 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.10-7.45 (m, 5H, H_5 , H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{18}), 7.18 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.61 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{19}), 7.82 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_{13})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.4 (2C_{22}), 18.3 (C_{23}), 25.8 (3C_{24}), 67.4 (C_{14}), 69.0 (C_{16}), 115.9, 121.3, 126.7, 132.2 (q, $J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{21}), 120.8 (2C_2), 123.9, 124.6, 124.9 (2C_3 , C_{11} , C_{13}), 125.6, 125.7, 125.8, 125.9 (q, $J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{19}), 126.9 (C_9), 128.2 (2C_{18}), 129.9, 130.5, 131.2, 131.8 (q, $^2 J_{\text{C-F}} = 31$ Hz, C_{20}), 130.4, 131.1 (C_{10} , C_{12}), 131.3 (C_4), 137.4 (C_8), 138.9 (C_{17}), 152.9 (C_6), 155.2 (C_{15}), 154.4 (C_1)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 2-(3-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréido)benzyle **121**



A une solution de **119** (696 mg, 1.38 mmol) et de DMAP (186 mg, 1.52 mmol) dans le THF anhydre (11 mL) est additionnée sous argon une solution de **98** (472 mg, 1.38 mmol) dans le THF anhydre (11 mL). Le mélange est agité à TA pendant 5 h 30 puis versé dans 100 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x40 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x50 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **121** (596 mg, 0.85 mmol).

Aspect : meringue blanche

Rendement : 61 %

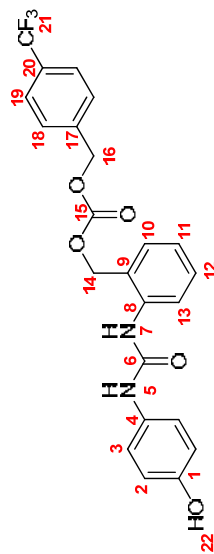
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane, 20/80, v/v) : 0.32

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 782, 841, 912, 1067, 1129, 1169, 1255, 1327, 1509, 1553, 1609, 1648, 1752, 2860, 2932, 2964, 3335

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.17 (s, 6H, H₂₄ ou H_{24'}), 0.20 (s, 6H, H₂₄ ou H_{24'}), 0.97 (s, 9H, H₂₆ ou 0.98 (s, 9H, H₂₆ ou H_{26'})), 5.13 (s, 2H, H₁₆ ou H₁₈), 5.14 (s, 2H, H₁₆ ou H₁₈), 6.39 (s, 1H, H₉), 6.69-6.79 (m, 2H, H₆, H₇), 7.00 (d, 1H, J = 2 Hz, H₁₂), 7.10-7.44 (m, 6H, H₃, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₂₀), 7.61 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂₁), 7.77 (d, 1H, J = 8 Hz, H₁₅)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.0 (2C₂₄, 2C_{24'}), 18.5 (C₂₅, C_{25'}), 26.0 (3C₂₆, 3C_{26'}), 67.3, 68.9 (C₁₆, C₁₈), 115.1, 115.7 (C₃, C₅), 115.9, 121.3, 126.7, 132.2 (q, J_{C-F} = 270 Hz, C₂₃), 121.3, 124.7, 124.9 (C₆, C₁₂, C₁₅), 125.6, 125.7, 125.7, 125.8 (q, J_{C-F} = 4 Hz, 2C₂₁), 127.0 (C₁₁), 128.2 (2C₂₀), 129.9, 130.5, 131.2, 131.8 (q, J_{C-F} = 32 Hz, C₂₂), 130.3, 131.1 (C₁₃, C₁₄), 131.5 (C₁₀), 137.3 (C₉), 138.9 (C₄), 144.2 (C₁), 147.4 (C₂), 154.2 (C₈), 155.2 (C₁₇)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 2-(3-(4-hydroxyphényl)uréido)benzyle **122**



A une solution de **120** (358 mg, 0.64 mmol) dans le THF anhydre (11 mL) est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 959 µL, 0.96 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans 50 mL de solution aqueuse saturée de NH₄Cl. La solution obtenue est extraite avec 4x15 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **122** (120 mg, 0.26 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 41 %

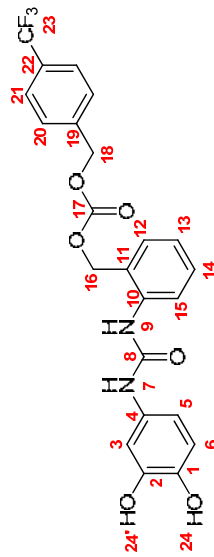
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : 0.26

Point de fusion : 174-176 °C

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 5.18 (s, 2H, H₁₆), 5.27 (s, 2H, H₁₄), 6.68 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 6.88 (d, 1H, J = 8 Hz, H₁₀), 6.95-7.38 (m, 4H, H₃, H₁₁, H₁₂), 7.60 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₈), 7.73 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₉), 7.84 (d, 1H, J = 8 Hz, H₁₃), 8.75 (s, 1H, H₅ ou H₇), 9.09 (s, 1H, H₅ ou H₇), 10.16 (ls, 1H, H₂₂)

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 67.5, 68.0 (C₁₄, C₁₆) ; 113.6 (C₁₀) ; 115.4 (C₂) ; 116.0, 121.4, 126.8, 132.3 (q, J_{C-F} = 270 Hz, C₂₁) ; 120.4, 122.3, 124.4 (C₃, C₁₁, C₁₃) ; 125.2 (C₉) ; 125.3, 125.3, 125.4, 125.5 (q, J_{C-F} = 4 Hz, 2C₁₉) ; 127.8, 128.4, 129.0, 129.7 (q, J_{C-F} = 32 Hz, C₂₀) ; 128.7 (C₁₈) ; 129.2, 130.0 (C₁₀, C₁₂) ; 131.1 (C₄) ; 137.9 (C₈) ; 140.3 (C₁₇) ; 152.6, 153.0 (C₁, C₆) ; 154.2 (C₁₅)

IES-SM : [M-H]⁻_{th} = 459.11 / [M-H]⁻_{mes} = 459.05



A une solution de **121** (400 mg, 0.57 mmol) dans le méthanol anhydre (8 mL) est ajouté sous argon l'acide camphorsulfonique (53 mg, 0.23 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 15 h. 150 mL d'AcOEt sont ajoutés et la solution obtenue est lavée avec 60 mL d'eau et 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **123** (209 mg, 0.44 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 77 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/dichlorométhane, 50/50, v/v) : 0.32

Point de fusion : 152-154 °C

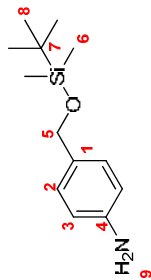
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 763, 788, 831, 1068, 1119, 1166, 1299, 1330, 1519, 1557, 1646, 1720, 3311

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 5.17 (s, 2H, H₁₆), 5.28 (s, 2H, H₁₈), 6.62 (m, 2H, H₃, H₆), 7.00-7.08 (m, 2H, H₁₂, H₁₅), 7.28-7.38 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 7.60 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂₀), 7.72-7.76 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂₁), 7.84 (d, 1H, J = 8 Hz, H₅), 7.96 (s, 1H, H₇ ou H₉), 8.69 (s, 1H, H₇ ou H₉), 8.50 (ls, 1H, H₂₄ ou H_{24'}), 8.93 (ls, 1H, H₂₄ ou H_{24'})

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 67.6 (C₁₆), 69.1 (C₁₈), 108.8, 110.9 (C₃, C₅), 116.0 (C₆), 117.1, 122.5, 127.9, 133.3 (q, ¹J_{C-F} = 270 Hz, C₂₃), 124.1, 124.2 (C₁₂, C₁₅), 126.1, 126.2, 126.3, 126.4 (q, ³J_{C-F} = 4 Hz, 2C₂₁), 127.3 (C₁₁), 129.3 (2C₂₀), 129.6, 130.3, 130.9, 131.5 (q, ²J_{C-F} = 31 Hz, C₂₂), 130.1, 130.9 (C₁₃, C₁₄), 133.1 (C₁₀), 138.9 (C₁₉), 141.3 (C₄), 141.6 (C₁), 145.9 (C₂), 154.0, 155.6 (C₈, C₁₇)

IES-SM : [M-H]⁻_{th} = 475.11 / [M-H]⁻_{ms} = 475.03

4-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)méthyl)amline **101**



A une solution d'alcool 4-aminobenzylque (2.5 g, 20.30 mmol) et d'imidazole (1.935 g, 28.42 mmol) dans le THF anhydre (37.5 mL) est additionnée sous argon une solution de TBDMSCI (3.672 g, 24.36 mmol) dans le THF anhydre (37.5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 1 h 30 puis versé dans un mélange composé de 175 mL d'eau et 75 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 2x125 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **101** (4.267 g, 17.97 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 89 %

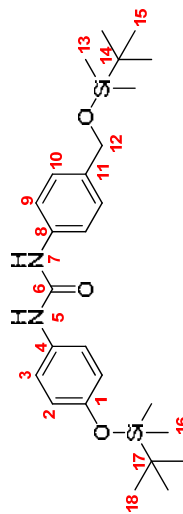
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 20/80, v/v) : 0.32

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 776, 837, 1006, 1072, 1256, 1471, 1518, 1624, 2856, 2929, 2954, 3357

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.08 (s, 6H, H₆), 0.92 (s, 9H, H₈), 3.61 (ls, 2H, H₉), 4.62 (s, 2H, H₅), 6.66 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂), 7.11 (d, 2H, J = 8 Hz, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.0 (2C₆), 18.6 (C₇), 26.1 (3C₈), 65.1 (C₅), 115.1 (2C₂), 127.8 (2C₃), 131.6 (C₄), 145.5 (C₁)

N-(4-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)benzyl)-N'-(4-(((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréé **124**



A une solution de **101** (733 mg, 3.09 mmol) et de DMAP (327 mg, 2.68 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est additionnée sous argon une solution de **96** (800 mg, 2.06 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 72 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 30 mL puis 2x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **124** (868 mg, 1.78 mmol).

Aspect : solide jaune très pâle

Rendement : 87 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 15/85, v/v) : 0.27

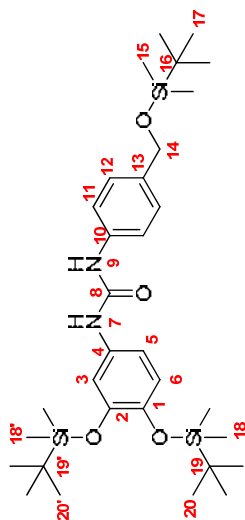
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 665, 779, 838, 923, 1071, 1227, 1258, 1510, 1555, 1602, 1651, 2857, 2930, 2964, 3321

Point de fusion : 216-218 °C

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.09 (s, 6H, H₁₃), 0.19 (s, 6H, H₁₆), 0.93 (s, 9H, H₁₅), 0.98 (s, 9H, H₁₈), 4.69 (s, 2H, H₁₂), 6.36 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.46 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.82 (d, 2H, J = 7 Hz, H₂), 7.18 (d, 2H, J = 7 Hz, H₃), 7.26-7.29 (m, 4H, H₉, H₁₀)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.1 (2C₁₃), -4.3 (2C₁₆), 18.3, 18.5 (C₁₄, C₁₇), 25.8, 26.1 (3C₁₅, 3C₁₈), 64.8 (C₁₂), 120.6, 120.8 (2C₂, 2C₉), 123.4 (2C₃), 127.1 (2C₁₀), 131.5 (C₄), 136.9, 137.2 (C₈, C₁₁), 152.6 (C₁), 154.7 (C₆)

N-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)oxy)phényl)-*N'*-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)benzyl)urée **125**



A une solution de **101** (687 mg, 2.89 mmol) et de DMAP (306 mg, 2.51 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (12.5 mL) est additionnée sous argon une solution de **97** (1 g, 1.93 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (12.5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 16 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 40 mL puis 2x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **125** (1.061 g, 1.72 mmol).

Aspect : meringue blanche

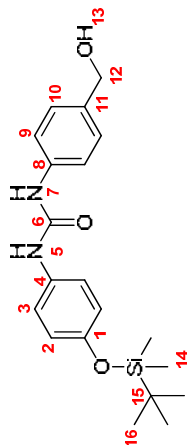
Rendement : 89 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 14/86, v/v) : 0.28

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.08 (s, 6H, H₁₅), 0.20 (s, 6H, H₁₈ ou H_{18'}), 0.21 (s, 6H, H₁₈ ou H_{18'}), 0.93 (s, 9H, H₁₇), 0.98 (s, 9H, H₂₀ ou H_{20'}), 0.99 (s, 9H, H₂₀, H_{20'}), 4.68 (s, 2H, H₁₄), 6.51 (s, 1H, H₇ ou H₆), 6.62 (s, 1H, H₇ ou H₆), 6.64 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, 2 Hz, H₅), 6.78 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H₆), 6.93 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₃), 7.21-7.30 (m, 4H, H₁₁, H₁₂)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.1 (2C₁₅), -4.0, -3.9 (2C₁₈, 2C_{18'}), 18.6 (C₁₆, C₁₉, C_{19'}), 26.1 (3C₁₇, 3C₂₀, 3C_{20'}), 64.8 (C₁₄), 116.1 (C₅), 116.5 (C₃), 120.9 (2C₁₁), 121.4 (C₆), 127.2 (2C₁₂), 131.1 (C₄), 137.0, 137.3 (C₁₀, C₁₃), 144.7 (C₁), 147.5 (C₂), 154.1 (C₈)

N-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)oxy)phényl)-*N'*-(4-hydroxybenzyl)urée **126**



A une solution de **124** (854 mg, 1.75 mmol) dans le méthanol anhydre (17 mL) est ajouté sous argon du I₂ (170 mg, 0.67 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis du Na₂S₂O₃ solide est ajouté jusqu'à décoloration du milieu puis 75 mL d'AcOEt sont ajoutés. La solution obtenue est lavée successivement avec 30 mL d'eau, 30 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 2x30 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **126** (601 mg, 1.61 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 92 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 60/40, v/v) : 0.30

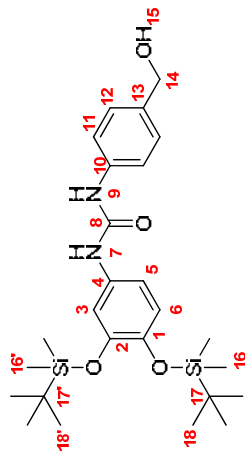
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 777, 840, 910, 1004, 1222, 1263, 1318, 1408, 1507, 1551, 1607, 1685, 3268

Point de fusion : 159-161 °C

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 0.16 (s, 6H, H₁₄), 0.94 (s, 9H, H₁₆), 4.41 (d, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₂), 5.05 (t, 1H, *J* = 6 Hz, H₁₃), 6.76 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₂), 7.20 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H₁₀), 7.28 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₃), 7.38 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₉), 8.45 (s, 1H, H₅ ou H₇), 8.54 (s, 1H, H₅ ou H₇)

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : -4.5 (2C₁₄), 18.0 (C₁₅), 25.6 (3C₁₆), 62.7 (C₁₂), 117.8 (2C₉), 119.9 (2C₂, 2C₃), 127.2 (2C₁₀), 133.5 (C₄), 135.8, 138.5, 138.5 (C₈, C₁₁), 149.9 (C₁), 152.7 (C₆)

N-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)-*N'*-(4-hydroxybenzyl)urée 127



A une solution de **125** (1.030 g, 1.67 mmol) dans le méthanol anhydre (17 mL) et CH_2Cl_2 anhydre (3 mL) est ajouté sous argon du I_2 (170 mg, 0.67 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 2 h 30 puis du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solide est ajouté jusqu'à décoloration du milieu. 100 mL d'AcOEt sont ajoutés et la solution obtenue est lavée successivement avec 50 mL d'eau, 50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 et 2x50 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchée sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **127** (488 mg, 0.97 mmol).

Aspect : solide jaune pâle

Rendement : 58 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 30/70, v/v) : 0.31

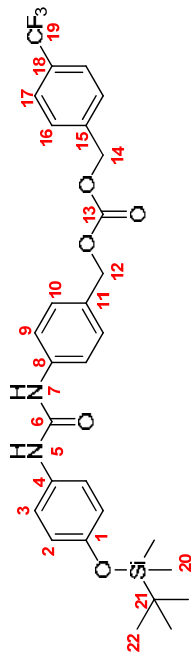
Point de fusion : 139-141 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 781, 839, 912, 997, 1126, 1222, 1255, 1320, 1421, 1509, 1552, 1605, 1647, 2858, 2930, 2956, 3337

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.21 (s, 12H, H_{16}), 0.98 (s, 18H, H_{18}), 4.62 (d, 2H, $J = 6$ Hz, H_{14}), 6.38 (s, 1H, H_7 ou H_9), 6.60 (s, 1H, H_7 ou H_9), 6.72 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, 2 Hz, H_5), 6.81 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_6), 6.90 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_3), 7.24-7.33 (m, 4H, H_{11} , H_{12})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.0 (2C_{16} , $2\text{C}_{16'}$), 18.5 (C_{17} , $\text{C}_{17'}$), 26.1 (3C_{18} , $3\text{C}_{18'}$), 64.6 (C_{14}), 114.3 (C_3), 114.9 (C_3), 120.7 (2C_{11}), 121.2 (C_6), 127.9 (2C_{12}), 131.8 (C_4), 135.9, 137.7 (C_{10} , C_{13}), 143.7 (C_1), 147.2 (C_2), 154.5 (C_8)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(4-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)urée)benzyle 128



A une solution de **126** (867 mg, 2.33 mmol) et de DMAP (313 mg, 2.56 mmol) dans le THF anhydre (16 mL) est additionnée sous argon une solution de **98** (794 mg, 2.33 mmol) dans le THF anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 17 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x50 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **128** (1.181 g, 2.11 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 91 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v, dépôt solide) : 0.38

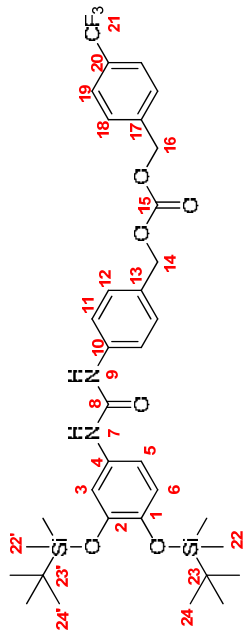
Point de fusion : 184-186 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 779, 840, 923, 1132, 1167, 1250, 1325, 1510, 1558, 1601, 1650, 1748, 2930, 2955, 3313

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.20 (s, 6H, H_{20}), 0.99 (s, 9H, H_{22}), 5.12 (s, 2H, H_{12} ou H_{14}), 5.20 (s, 2H, H_{12} ou H_{14}), 6.30 (s, 1H, H_5 ou H_7), 6.49 (2s, 1H, H_5 ou H_7), 6.84 (d, 2H, $J = 7$ Hz, H_2), 7.18 (d, 2H, $J = 7$ Hz, H_3), 7.27-7.35 (m, 4H, H_9 , H_{10}), 7.49 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.62 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.6 (2C_{20}), 17.9 (C_{21}), 25.6 (3C_{22}), 67.9, 69.3 (C_{12} , C_{14}), 116.0, 121.4, 126.9, 132.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{19}), 117.9 (2C_9), 119.9, 120.0 (2C_2 , 2C_3), 125.3, 125.3, 125.4, 125.5 (q, $J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{17}), 127.8, 128.4, 129.1, 129.7 (q, $J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 128.2 (C_4), 128.4 (2C_{16}), 129.4 (2C_{10}), 133.4 (C_{11}), 140.3, 140.3 (C_8 , C_{15}), 150.0 (C_1), 152.6 (C_6), 154.4 (C_{13})

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)uréido)benzyle 129



A une solution de **127** (441 mg, 0.88 mmol) et de DMAP (107 mg, 0.88 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (13 mL) est additionné sous argon **98** (272 mg, 0.80 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 120 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 30 mL puis 2x50 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **129** (499 mg, 0.71 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 89 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.33

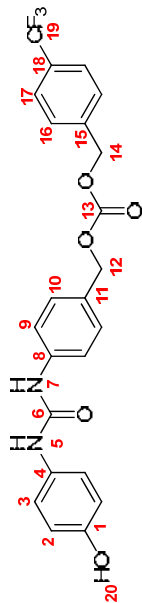
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 783, 839, 913, 1066, 1129, 1168, 1228, 1274, 1326, 1423, 1510, 1557, 1642, 1750, 2860, 2931, 2965, 3321

Point de fusion : 177-179 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.20 (s, 6H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 0.21 (s, 6H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 0.98 (s, 9H, H_{24} ou $\text{H}_{24'}$), 0.99 (s, 9H, H_{24} ou $\text{H}_{24'}$), 5.11 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 5.20 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 6.31 (s, 1H, H_7 ou H_9), 6.57 (s, 1H, H_7 ou H_9), 6.74 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, H_5), 6.82 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_6), 6.88 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_3), 7.29-7.37 (m, 4H, H_{11} , H_{12}), 7.48 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{18}), 7.62 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{19})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : -4.0 (2C_{22} , $2\text{C}_{22'}$), 18.5 (C_{23} , $\text{C}_{23'}$), 26.0 (3C_{24} , $3\text{C}_{24'}$), 68.7, 69.8 (C_{14} , C_{16}), 115.7 (C_5), 115.8, 121.7, 126.8, 132.2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{21}), 116.2 (C_3), 120.2 (2C_{11}), 121.4 (C_6), 125.6, 125.6, 125.7, 125.8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{19}), 128.27 (2C_{18}), 128.6, 129.2, 129.8, 130.4 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{20}), 130.0 (2C_{12}), 130.0, 131.0 (C_4 , C_{17}), 138.9 (C_{13}), 139.3 (C_4), 144.6 (C_1), 147.5 (C_2), 154.1 (C_8), 155.0 (C_{15})

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(4-hydroxyphényl)uréido)benzyle 130



A une solution de **128** (500 mg, 0.89 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) refroidie à 0 °C est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 1.34 mL, 1.34 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h puis versé dans 50 mL de solution aqueuse saturée de NH_4Cl . La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x25 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **130** (392 mg, 0.85 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 95 %

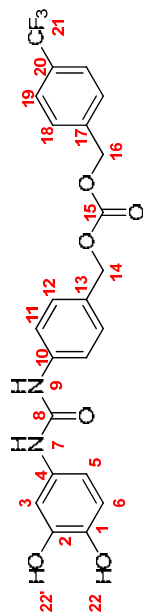
Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 95/5, v/v) : 0.33

Point de fusion : 199-201 °C (décomposition)

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 5.09 (s, 2H, H_{12} ou H_{14}), 5.25 (s, 2H, H_{12} ou H_{14}), 6.68 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.21 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.29 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{10}), 7.44 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_9), 7.61 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.76 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17}), 8.40 (s, 1H, H_5 ou H_7), 8.69 (s, 1H, H_5 ou H_7), 9.07 (s, 1H, H_{20})

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 68.0, 69.3 (C_{12} , C_{14}), 115.2 (2C_2), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271$ Hz, C_{19}), 117.7 (2C_3), 120.4 (2C_3), 125.3, 125.4, 125.4, 125.5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{17}), 127.8, 128.5, 129.1, 129.7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 128.0 (C_4), 128.6 (2C_{16}), 129.5 (2C_{10}), 131.1 (C_{11}), 140.4, 140.5 (C_8 , C_{15}), 152.6, 152.8 (C_1 , C_6), 154.4 (C_{13})

IES-SM : $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{th}} = 459.12$ / $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{mes}} = 459.12$



A une solution de **129** (353 mg, 0.50 mmol) dans le THF anhydre (10 mL), refroidie à -10 °C est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 1.25 mL, 1.25 mmol). Le mélange est agité à -10 °C pendant 1 h. 40 mL d'AcOEt sont ajoutés et la solution obtenue est lavée successivement avec 20 mL de solution aqueuse saturée de NH_4Cl , 20 mL de solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à 5 % et 2x20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **131** (158 mg, 0.33 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 66 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 94/6, v/v) : 0.27

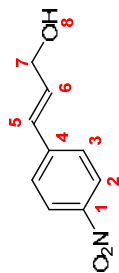
Point de fusion : 188-190 °C (décomposition)

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 5.09 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 5.25 (s, 2H, H_{14} ou H_{16}), 6.58-6.63 (m, 2H, H_5 , H_6), 6.98 (s, 1H, H_3), 7.29 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{12}), 7.43 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{11}), 7.60 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{18}), 7.76 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{19}), 8.28 (s, 1H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 8.57 (s, 1H, H_{22} ou $\text{H}_{22'}$), 8.49 (s, 1H, H_7 ou H_9), 8.91 (s, 1H, H_7 ou H_9)

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 68.0, 69.3 (C_{14} , C_{16}), 107.4 (C_3), 109.7 (C_5), 115.5 (C_6), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{21}), 117.8 (2C_{11}), 125.3, 125.4, 125.5, 125.6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{19}), 127.8, 128.4, 129.1, 129.7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{20}), 128.1 (C_{13}), 128.5 (2C_{18}), 129.5 (2C_{12}), 131.5 (C_{10}), 140.4, 140.5 (C_1 , C_4 , C_{17}), 145.2 (C_2), 152.6 (C_{15}), 154.4 (C_8)

IES-SM : $[\text{M-H}]^-_{\text{th}} = 475.11$ / $[\text{M-H}]^-_{\text{mes}} = 474.99$

Alcool (*E*)-4-nitrocinnamique **106**



A une suspension d'acide (*E*)-4-nitrocinnamique (3,844 g, 19,90 mmol) et de NEt_3 (2,8 mL, 19,90 mmol) dans le THF anhydre (30 mL) refroidie à -20°C est lentement additionné le chloroformiate d'isobutyle (2,6 mL, 19,90 mmol). Le mélange est agité à -20°C pendant 1 h puis le NaBH_4 (2,875 g, 76 mmol) est ajouté. De l'eau (12 mL) est très lentement additionnée par portions en gardant la température comprise entre -30 et -20°C (temps d'addition : 2 h). Le mélange est agité à -20°C pendant 1 h puis versé dans 200 mL de solution aqueuse saturée de NH_4Cl . La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 80 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **106** (2,968 g, 16,57 mmol).

Aspect : solide jaune pâle

Rendement : 83 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 12/88, v/v) : 0,31

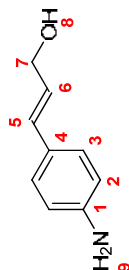
Point de fusion : $125\text{--}127^\circ\text{C}$

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 736, 858, 973, 1100, 1339, 1504, 1597, 2864, 3510

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1,56 (m, 1H, H_8), 4,41 (m, 2H, H_7), 6,54 (td, 1H, $J = 16$ Hz, 5 Hz, H_6), 6,73 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_5), 7,52 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 8,19 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 63,2 (C_7), 124,1 (2C_2), 127,0 (2C_3), 128,3 (C_5), 133,7 (C_6), 143,4 (C_4), 147,0 (C_1)

Alcool (*E*)-4-aminocinnamique **107**



A une solution de **106** (300 mg, 1,67 mmol) dans l'éthanol (12 mL) et l'eau (1,2 mL) sont ajoutés le fer (limaille 40-60 μm , 677 mg, 12,12 mmol) et une solution d' HCl 12N (2 gouttes) puis le mélange est agité à 70°C pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel est versé dans 60 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x20 mL d' AcOEt . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 30 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **107** (138 mg, 0,93 mmol).

Aspect : huile orangée

Rendement : 55 %

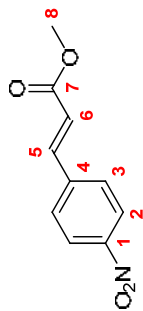
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 55/45, v/v) : 0,27

IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 487, 533, 806, 844, 966, 1020, 1174, 1514, 1606, 2919, 3241, 3386

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1,35 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_8), 3,71 (ls, 2H, H_6), 4,27 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_7), 6,18 (td, 1H, $J = 16$ Hz, 6 Hz, H_6), 6,51 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_5), 6,64 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_2), 7,17 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_3)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 64,0 (C_7), 115,3 (2C_2), 124,9 (C_6), 127,4 (C_4), 127,7 (2C_3), 131,4 (C_5), 146,1 (C_1)

(E)-4-nitrocinnamate de méthyle **104**



A une solution d'acide *p*-nitrocinnamique (3.860 g, 20 mmol) dans le méthanol anhydre (50 mL) est ajouté sous argon l' H_2SO_4 (2 mL, 37.52 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 62 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris avec 300 mL de CH_2Cl_2 et versé dans 200 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La solution obtenue est extraite avec 2x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 100 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis 100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide, conduisant à **104** (2.627 g, 12.68 mmol).

Aspect : solide beige

Rendement : 63 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 80/20, v/v) : 0.72

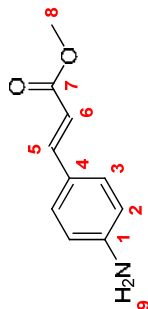
IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 705, 848, 1170, 1311, 1346, 1436, 1513, 1598, 1726

Point de fusion : 161-163 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 3.84 (s, 3H, H_8), 6.56 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_6), 7.65 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.73 (d, 2H, $J = 16$ Hz, H_5), 8.25 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 52.2 (C_8), 122.2 (C_6), 124.3 (2 C_2), 128.8 (2 C_3), 140.6 (C_4), 142.0 (C_7), 148.6 (C_1), 166.6 (C_7)

(E)-4-aminocinnamate de méthyle **105**



A une suspension de **104** (1.934 g, 9.34 mmol) dans le méthanol anhydre (48 mL) est ajouté le $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10.532 g, 46.68 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 30 minutes puis versé dans 300 mL d'eau. Le milieu est basifié jusqu'à pH = 8 avec une solution aqueuse de NaOH 0.1 N puis extrait avec 3x200 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x200 mL de solution aqueuse saturée de NaCl , séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **105** (1.219 g, 6.88 mmol).

Aspect : solide jaune pâle

Rendement : 74 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 4/96, v/v) : 0.31

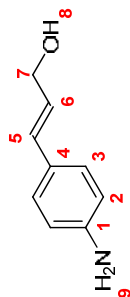
IR (CCl_4 , ν (cm^{-1})) : 521, 828, 1173, 1307, 1327, 1434, 1516, 1593, 1625, 1687, 3354, 3444

Point de fusion : 132-134 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 3.78 (s, 3H, H_8), 3.93 (ls, 2H, H_9), 6.24 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_6), 6.65 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.35 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.60 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_5)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 51.6 (C_8), 113.3 (C_6), 114.9 (2 C_2), 124.7 (C_4), 130.0 (2 C_3), 145.3 (C_5), 148.9 (C_1), 168.3 (C_7)

Alcool (*E*)-4-aminocinnamique **107**



A une suspension de **105** (1.217 g, 6.88 mmol) dans le THF anhydre (73 mL) est lentement additionné à 0 °C sous argon le LiAlH₄ (1M dans le THF, 13.7 mL, 13.70 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h puis à TA pendant 1 h. 150 mL de solution aqueuse saturée de NH₄Cl sont lentement additionnés puis le mélange est extrait avec 3x50 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 80 mL d'eau puis avec 2x80 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **107** (826 mg, 5.54 mmol).

Aspect : solide pâteux beige

Rendement : 80 %

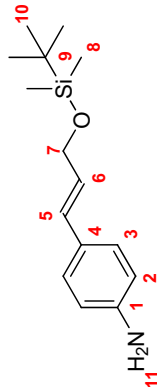
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 60/40, v/v) : 0.31

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 487, 533, 806, 844, 966, 1020, 1174, 1514, 1606, 2919, 3241, 3386

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.35 (t, 1H, J = 6 Hz, H₈), 3.71 (ls, 2H, H₉), 4.27 (t, 2H, J = 6 Hz, H₇), 6.19 (td, 1H, J = 16 Hz, 6 Hz, H₆), 6.51 (d, 1H, J = 16 Hz, H₅), 6.64 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.18 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 64.0 (C₇), 115.3 (2C₂), 124.9 (C₆), 127.4 (C₄), 127.7 (2C₃), 131.4 (C₅), 146.1 (C₁)

(*E*)-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-4-aminocinnamyle **102**



A une suspension de **107** (826 mg, 5.54 mmol) et d'imidazole (528 mg, 7.75 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) est additionnée sous argon une solution de TBDMSCl (1.001 g, 6.64 mmol) dans le THF anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans un mélange composé de 70 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et 70 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 2x50 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 50 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **102** (1.240 g, 4.71 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 85 %

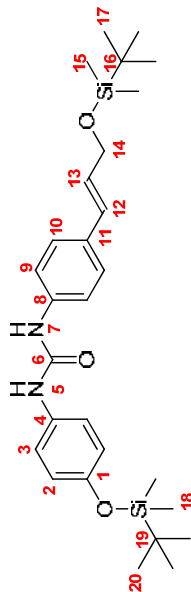
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 24/76, v/v) : 0.35

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 777, 836, 966, 1055, 1112, 1177, 1256, 1471, 1516, 1610, 1856, 2929, 2954, 3374

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.10 (s, 6H, H₈), 0.93 (s, 9H, H₁₀), 3.67 (ls, 2H, H₁₁), 4.31 (dd, 2H, J = 5 Hz, 2 Hz, H₇), 6.08 (td, 1H, J = 16 Hz, 5 Hz, H₆), 6.47 (d, 1H, J = 16 Hz, H₅), 6.63 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.16 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.0 (2C₈), 18.6 (C₉), 26.1 (3C₁₀), 64.4 (C₇), 115.2 (2C₂), 125.5 (C₆), 127.7 (2C₃), 127.9 (C₄), 129.9 (C₅), 146.0 (C₁)

N-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)cinnamyl)-*N'*-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)urée **132**



A une solution de **102** (663 mg, 2.52 mmol) et de DMAP (308 mg, 2.52 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est additionnée sous argon une solution de **96** (889 mg, 2.29 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 40 mL puis 2x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x60 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **132** (1.171 g, 2.28 mmol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : 99 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 18/82, v/v) : 0.32

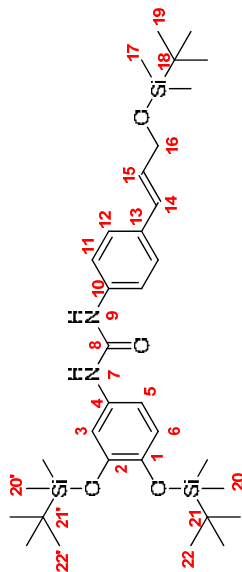
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 777, 837, 923, 1066, 1227, 1251, 1509, 1549, 1596, 1651, 2856, 2929, 2952, 3320

Point de fusion : 206-208 °C

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.10 (s, 6H, H₁₈), 0.18 (s, 6H, H₁₉), 0.93 (s, 9H, H₁₇), 0.98 (s, 9H, H₂₀), 4.33 (dd, 2H, *J* = 5 Hz, 2 Hz, H₁₄), 6.18 (td, 1H, *J* = 16 Hz, 5 Hz, H₁₃), 6.52 (d, 1H, *J* = 16 Hz, H₁₂), 6.63 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.75 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.81 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₂), 7.15 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₃), 7.22-7.32 (m, 4H, H₆, H₁₀)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.0 (2C₁₅), -4.4 (2C₁₈), 18.2, 18.6 (C₁₆, C₁₉), 25.8, 26.1 (3C₂₀), 64.1 (C₁₄), 120.5, 120.6 (2C₂, 2C₉), 123.3 (2C₃), 127.7 (2C₁₀), 129.1 (C₁₃), 130.0 (C₁₂), 131.4, 132.5 (C₄, C₁₁), 137.6 (C₈), 152.4 (C₁), 154.9 (C₆)

N-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)-*N'*-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)cinnamyl)urée **133**



A une solution de **102** (750 mg, 2.85 mmol) et de DMAP (379 mg, 3.11 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (20 mL) est additionnée sous argon une solution de **97** (1.343 g, 2.59 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Le mélange est agité à TA pendant 6 h puis versé dans 250 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 60 mL puis 2x90 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 3x100 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **133** (1.383 g, 2.15 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 83 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 15/85, v/v) : 0.31

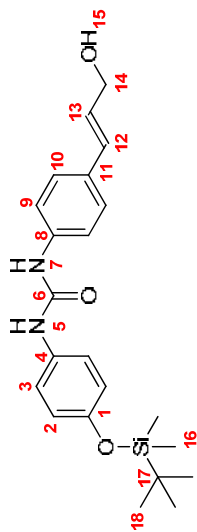
IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 779, 838, 923, 1071, 1227, 1253, 1311, 1510, 1555, 1602, 1651, 2857, 2930, 2976, 3321

Point de fusion : 185-187 °C

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.10 (s, 6H, H₁₇), 0.20 (s, 6H, H₂₀ ou H₂₀'), 0.21 (s, 6H, H₂₀ ou H₂₀'), 0.93 (s, 9H, H₁₉), 0.98 (s, 9H, H₂₂ ou H₂₂'), 0.99 (s, 9H, H₂₂ ou H₂₂'), 4.33 (dd, 2H, *J* = 5 Hz, 2 Hz, H₁₆), 6.19 (td, 1H, *J* = 16 Hz, 5 Hz, H₁₅), 6.40 (s, 1H, H₇ ou H₆), 6.60 (s, 1H, H₇, H₆), 6.52 (d, 1H, *J* = 16 Hz, H₁₄), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, 2 Hz, H₅), 6.80 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H₆), 6.90 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H₃), 7.23-7.33 (m, 4H, H₁₁, H₁₂)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.0 (2C₁₇), -4.0 (2C₂₀, 2C₂₀'), 18.6 (C₁₈, C₂₁, C₂₁'), 26.1, 26.1 (3C₁₉, 3C₂₂, 3C₂₂'), 64.1 (C₁₆), 115.7 (C₅), 116.1 (C₃), 120.5 (2C₁₁), 121.4 (C₆), 127.2 (2C₁₂), 128.1 (C₁₅), 129.1 (C₁₄), 131.2, 132.7 (C₄, C₁₃), 137.5 (C₁₀), 144.4 (C₁), 147.4 (C₂), 154.2 (C₈)

N*-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)-*N'*-(4-hydroxycinnamyl)urée **134*



A une suspension de **132** (463 mg, 0.90 mmol) dans le THF (2 mL), l'acétonitrile (2 mL) et l'eau (2 mL) est ajouté le InCl_3 (20 mg, 0.09 mmol). Le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 1 h 30 puis 70 mL d'AcOEt sont ajoutés. La solution obtenue est lavée avec 30 mL d'eau puis 2x30 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **134** (288 mg, 0.72 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 80 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : 0.29

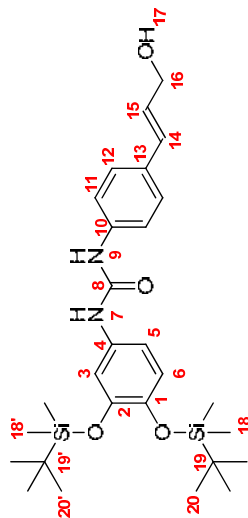
Point de fusion : 178-180 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 779, 806, 835, 915, 971, 1021, 1223, 1272, 1508, 1545, 1596, 1627, 2857, 2934, 3334

RMN ^1H (200 MHz, Acetone d_6 , δ) : 0.19 (s, 6H, H_{16}), 0.99 (s, 9H, H_{18}), 3.85 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_{15}), 4.21 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{14}), 6.28 (td, 1H, $J = 16$ Hz, 5 Hz, H_{13}), 6.54 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_{12}), 6.81 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.30-7.50 (m, 6H, H_3 , H_9 , H_{10}), 7.96-8.09 (H_5 , H_7)

RMN ^{13}C (50 MHz, Acetone d_6 , δ) : -4.3 (2C_{16}), 18.7 (C_{17}), 26.1 (3C_{18}), 63.4 (C_{14}), 119.4 (2C_3), 120.8 (2C_2), 121.3 (2C_9), 127.5 (2C_{10}), 129.0 (C_{13}), 129.9 (C_{12}), 132.1, 134.5 (C_4 , C_{11}), 140.2 (C_8), 151.7 (C_1), 153.6 (C_6)

N*-(3,4-bis((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)-*N'*-(4-hydroxycinnamyl)urée **135*



A une suspension de **133** (1.053 g, 1.64 mmol) dans le THF (3.2 mL), l'acétonitrile (3.2 mL) et l'eau (3.2 mL) est ajouté le InCl_3 (36 mg, 0.16 mmol). Le mélange est agité à reflux pendant 2 h puis 150 mL d'AcOEt sont ajoutés. La solution obtenue est lavée avec 50 mL d'eau puis 2x50 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **135** (710 mg, 1.34 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 82 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 48/52, v/v) : 0.30

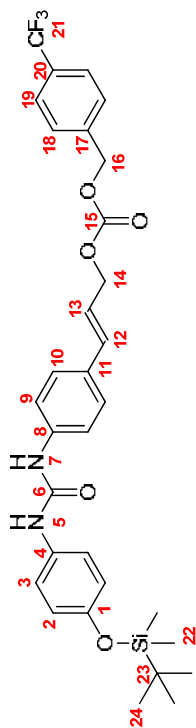
Point de fusion : 222-224 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 780, 841, 887, 995, 1218, 1255, 1321, 1420, 1509, 1548, 1601, 1688, 2858, 2930, 3341

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 0.16 (s, 6H, H_{18} ou $\text{H}_{18'}$), 0.20 (s, 6H, H_{18} ou $\text{H}_{18'}$), 0.95 (s, 9H, H_{20} ou $\text{H}_{20'}$), 0.96 (s, 9H, H_{20} ou $\text{H}_{20'}$), 4.09 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{16}), 4.81 (t, 2H, $J = 5$ Hz, H_{17}), 6.23 (td, 1H, $J = 16$ Hz, 5 Hz, H_{13}), 6.47 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_{14}), 6.71-6.83 (m, 2H, H_5 , H_6), 7.20 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_3), 7.30-7.41 (m, 4H, H_{11} , H_{12}), 8.49 e(s, 1H, H_7 ou H_9), 8.58 (s, 1H, H_7 ou H_9)

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : -4.3, -4.2 (2C_{18} , $2\text{C}_{18'}$), 18.1, 18.2 (C_{19} , $\text{C}_{19'}$), 25.8 (3C_{20}), 61.7 (C_{16}), 111.5, 111.5 (C_3 , C_3), 118.2 (2C_{11}), 120.6 (C_6), 126.6 (2C_{12}), 128.4, 128.5 (C_{14} , C_{15}), 130.5, 133.7 (C_4 , C_{13}), 139.0 (C_{10}), 140.8 (C_1), 145.9 (C_2), 152.5 (C_8)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(4-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényloxy)phényl)uréido)cinnamyle **136**



A une solution de **134** (288 mg, 0.72 mmol) et de DMAP (88 mg, 0.72 mmol) dans le THF anhydre (9 mL) est additionné sous argon **98** (224 mg, 0.66 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 20 h puis versé dans 120 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x50 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x70 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **136** (363 mg, 0.60 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 84 %

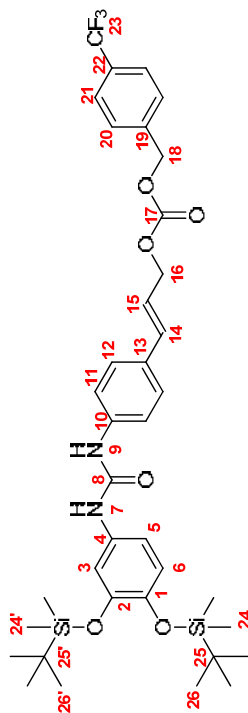
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 30/70, v/v) : 0.33

Point de fusion : 166-168 °C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.20 (s, 6H, H₂₂), 0.98 (s, 9H, H₂₄), 4.79 (d, 2H, J = 6 Hz, H₁₄), 5.22 (s, 2H, H₁₆), 6.20 (td, 1H, J = 16 Hz, H₁₃), 6.29 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.48 (s, 1H, H₅ ou H₇), 6.63 (d, 1H, J = 16 Hz, H₁₂), 6.84 (d, 2H, J = 9 Hz, H₂), 7.18 (d, 2H, J = 9 Hz, H₃), 7.26-7.36 (m, 4H, H₉, H₁₀), 7.50 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₈), 7.63 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₉)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -4.4 (2C₂₂), 18.3 (C₂₃), 25.7 (3C₂₄), 68.7 (C₁₆), 69.1 (C₁₄), 116.0, 121.4, 126.8, 132.2 (q, J_{C-F} = 270 Hz, C₂₁), 120.4 (2C₉), 120.7 (2C₉), 120.8 (C₁₃), 123.7 (2C₃), 125.6, 125.7, 125.7, 125.8 (q, J_{C-F} = 4 Hz, 2C₁₉), 127.6 (2C₁₀), 128.3 (2C₁₈), 130.4, 131.0, 131.7, 132.2 (q, J_{C-F} = 32 Hz, C₂₀), 131.1, 131.3 (C₁₁, C₁₇), 134.8 (C₁₂), 138.5 (C₄), 139.3 (C₈), 152.9 (C₁), 154.4 (C₆), 155.0 (C₁₅)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(3,4-bis(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényloxy)phényl)uréido)cinnamyle **137**



A une solution de **135** (454 mg, 0.86 mmol) et de DMAP (105 mg, 0.86 mmol) dans le THF anhydre (7 mL) est additionnée sous argon une solution de **98** (266 mg, 0.78 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le mélange est agité à TA pendant 5 h 30 puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x80 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **137** (492 mg, 0.67 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 86 %

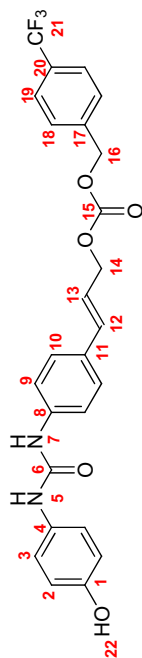
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 23/77, v/v) : 0.30

Point de fusion : 147-149 °C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.20 (s, 6H, H₂₄ ou H_{24'}), 0.21 (s, 6H, H₂₄ ou H_{24'}), 0.98 (s, 9H, H₂₆ ou H_{26'}), 0.99 (s, 9H, H₂₆ ou H_{26'}), 4.77 (d, 2H, J = 6 Hz, H₁₆), 5.22 (s, 2H, H₁₈), 6.19 (td, 1H, J = 16 Hz, 6 Hz, H₁₅), 6.42 (s, 1H, H₇ ou H₉), 6.66 (s, 1H, H₇ ou H₉), 6.63 (d, 1H, J = 16 Hz, H₁₄), 6.72 (dd, J = 8 Hz, 2 Hz, H₅), 6.81 (d, J = 8 Hz, H₆), 6.89 (d, J = 2 Hz, H₃), 7.26-7.32 (m, 4H, H₁₁, H₁₂), 7.50 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂₀), 7.63 (d, 2H, J = 8 Hz, H₂₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : -5.1, -4.6 (2C₂₄, 2C_{24'}), 18.0 (C₂₅, C_{25'}), 25.4, 25.5 (3C₂₆), 68.1 (C₁₈), 68.5 (C₁₆), 115.1 (C₅), 115.5 (C₃), 115.6, 121.0, 126.4, 131.8 (q, J_{C-F} = 270 Hz, C₂₃), 119.6 (2C₁₁), 120.2 (C₆), 120.8 (C₁₃), 125.0, 125.1, 125.2, 125.2 (q, J_{C-F} = 4 Hz, 2C₂₁), 127.0 (2C₁₂), 127.7, 130.7 (C₁₃, C₁₉), 127.7 (2C₂₀), 129.2, 129.7, 130.3, 130.8 (q, J_{C-F} = 27 Hz, C₂₂), 134.3 (C₁₄), 138.0 (C₁₀), 138.8 (C₄), 144.0 (C₁), 146.9 (C₂), 153.5 (C₈), 154.4 (C₁₇)

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(4-hydroxyphényl)uréido)cinnamyle 138



A une solution de **136** (331 mg, 0.55 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) refroidie à 0 °C est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 827 μ L, 0.83 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 2 h puis versé dans un mélange composé de 60 mL de solution aqueuse saturée de NH_4Cl et 20 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x25 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 25 mL d'eau puis 2x25 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **138** (187 mg, 0.38 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 70 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/dichlorométhane, 30/70, v/v) : 0.33

Point de fusion : 209-211 °C

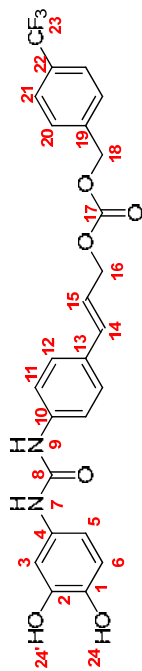
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 820, 1068, 1124, 1237, 1271, 1333, 1513, 1561, 1590, 1641, 1745, 3305

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 4.77 (d, 2H, $J = 6$ Hz, H_{14}), 5.27 (s, 2H, H_{16}), 6.24 (td, 1H, $J = 16$ Hz, Hz, H_{13}), 6.64 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_{12}), 6.68 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_2), 7.21 (d, 2H, $J = 9$ Hz, H_3), 7.34-7.44 (m, 4H, H_6 , H_{10}), 7.62 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{18}), 7.77 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{19}), 8.36 (s, 1H, H_5 ou H_7), 8.65 (s, 1H, H_5 ou H_7), 9.08 (s, 1H, H_{22})

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 67.9 (C_{16}), 68.5 (C_{14}), 115.2 (2C_2), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{21}), 117.9 (2C_9), 120.4 (C_{13}), 120.5 (2C_3), 125.3, 125.4, 125.5, 125.5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{10}), 127.3 (2C_{10}), 127.9, 128.4, 129.0, 129.7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{20}), 128.4 (2C_{18}), 129.1, 131.0 (C_{11} , C_{17}), 134.2 (C_{12}), 140.2, 140.4 (C_4 , C_8), 152.7 (C_1 , C_{15}), 154.3 (C_6)

IES-SM : $[\text{M-H}]^-_{\text{th}} = 485.13$ / $[\text{M-H}]^-_{\text{mes}} = 485.10$

4-(trifluorométhyl)benzylcarbonate de 4-(3-(3,4-dihydroxyphényl)uréido)cinnamyle 139



A une solution de **137** (405 mg, 0.55 mmol) dans le THF anhydre (12 mL) refroidie à -10 °C est ajouté sous argon le TBAF (1M dans le THF, 1.39 mL, 1.39 mmol). Le mélange est agité à -10 °C pendant 1 h 30 puis 50 mL d'AcOEt sont ajoutés. La solution obtenue est lavée successivement avec 20 mL de solution aqueuse saturée de NH_4Cl , 20 mL de solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à 5 % et 2x20 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (dépôt solide), conduisant à **139** (167 mg, 0.33 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 60 %

Rf (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol, 94/6, v/v) : 0.29

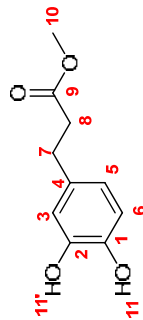
Point de fusion : 189-191 °C

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 4.77 (d, 2H, $J = 5$ Hz, H_{16}), 5.27 (s, 2H, H_{18}), 6.25 (td, 1H, $J = 16$ Hz, 5 Hz, H_{15}), 6.51-6.68 (m, 3H, H_5 , H_6 , H_{14}), 6.98 (s, 1H, H_3), 7.34-7.44 (m, 4H, H_{11} , H_{12}), 7.62 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{20}), 7.77 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_2), 8.30 (s, 1H, H_7 ou H_9), 8.60 (s, 1H, H_7 , H_9), 8.50 (d, 1H, $J = 1$ Hz, H_{24} ou $\text{H}_{24'}$), 8.92 (d, 1H, $J = 1$ Hz, H_{24} ou $\text{H}_{24'}$)

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 68.0 (C_{18}), 68.5 (C_{16}), 107.4 (C_3), 109.6 (C_5), 115.5 (C_6), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{23}), 117.8 (2C_{11}), 120.3 (C_{15}), 125.3, 125.4, 125.5, 125.5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, C_{21}), 127.3 (2C_{12}), 128.5 (2C_{20}), 129.2, 129.7, 130.3, 130.8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27$ Hz, 2C_{22}), 129.0, 131.5 (C_{13} , C_{19}), 134.2 (C_{14}), 140.2, 140.4, 140.5 (C_1 , C_4 , C_{10}), 145.2 (C_2), 152.5, 154.3 (C_8 , C_{17})

IES-SM : $[\text{M-H}]^-_{\text{th}} = 501.13$ / $[\text{M-H}]^-_{\text{mes}} = 500.98$

3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoate de méthyle **140**



A une solution d'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoïque (10 g, 54.89 mmol) dans le méthanol anhydre (100 mL) est additionné sous argon le SOCl_2 (4.8 mL, 65.87 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **140** (10.403 g, 53.02 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 96 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : 0.25

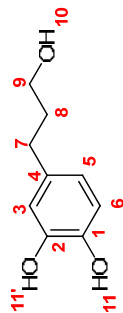
Point de fusion : 77-79 °C

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 527, 573, 616, 787, 821, 1108, 1181, 1207, 1276, 1340, 1380, 1441, 1517, 1607, 1712, 3311, 3485

RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6 , δ) : 2.48-2.54 (m, 2H, H_8), 2.63-2.71 (m, 2H, H_7), 3.57 (s, 3H, H_{10}), 6.42 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, H_5), 6.57 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H_3), 6.62 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_6), 8.70 (ls, 2H, H_{11} , H_{11}')

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6 , δ) : 29.7 (C_7), 35.4 (C_8), 51.2 (C_{10}), 115.5, 115.6 (C_3 , C_6), 118.8 (C_5), 131.3 (C_4), 143.5 (C_1), 145.0 (C_2), 172.8 (C_9)

4-(3-hydroxypropyl)catéchol **141**



A une solution de **140** (10.353 g, 52.77 mmol) dans le THF anhydre (620 mL) est lentement additionné sous argon le LiAlH₄ 2.4 M dans le THF (44 mL, 105.5 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 3 h puis 300 mL de solution aqueuse d'HCl à 5 % sont lentement ajoutés. La solution obtenue est extraite avec 3x100 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x100 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **141** (9.639 g, quantitatif).

Aspect : huile visqueuse incolore

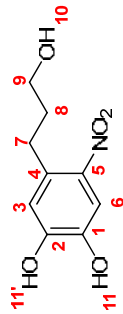
Rendement : quantitatif

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 70/30, v/v) : 0.29

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 1.63 (q, 2H, J = 7 Hz, H₈), 2.42 (t, 2H, J = 7 Hz, H₇), 3.38 (td, 2H, J = 7 Hz, 5Hz, H₉), 4.41 (t, 1H, J = 5 Hz, H₁₀), 6.42 (dd, 1H, J = 8 Hz, 2 Hz, H₅), 6.56 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃), 6.62 (d, 1H, J = 8 Hz, H₆), 8.62 (ls, 2H, H₁₁, H_{11'})

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 31.1 (C₇), 34.7 (C₈), 60.3 (C₉), 115.5, 115.8 (C₃, C₆), 118.9 (C₅), 133.1 (C₄), 143.1 (C₁), 145.0 (C₂)

4-(3-hydroxypropyl)-5-nitrocatéchol **142**



A une solution de **141** (4.616 g, 27.45 mmol) et de NaNO₂ (6.628 g, 96.06 mmol) dans l'eau (140 mL) refroidie à 0 °C est lentement additionné une solution aqueuse d'H₂SO₄ à 20 % (23 mL). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis extrait avec 3x100 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **142** (2.872 g, 13.47 mmol)

Aspect : solide orange

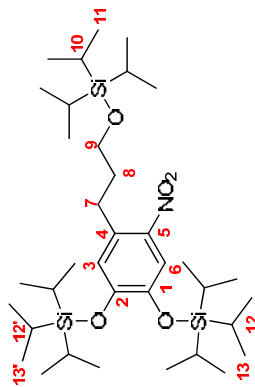
Rendement : 49 %

Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 80/20, v/v) : 0.31

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆, δ) : 1.64 (m, 2H, H₈), 2.77 (t, 2H, J = 6 Hz, H₇), 3.41 (td, 2H, J = 6 Hz, H₉), 6.73 (s, 1H, H₃), 7.46 (1H, H₆), 10.00 (ls, 2H, H₁₁, H_{11'})

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO d₆, δ) : 29.0 (C₇), 32.7 (C₈), 60.5 (C₉), 111.9 (C₆), 117.1 (C₃), 130.7 (C₄), 139.2 (C₅), 142.7 (C₁), 150.2 (C₂)

(3-(2-nitro-4,5-bis((trisisopropylsilyloxy)phényl)propoxy)trisisopropylsilane **143**



A une solution de **142** (2.122 g, 9.95 mmol) et d'imidazole (2.846 g, 41.81 mmol) dans le THF anhydre (32 mL) est additionnée sous argon une solution de TIPSCl (6.909 g, 35.83 mmol) dans le THF anhydre (32 mL). Le mélange est agité à TA pendant 15 h puis versé dans un mélange composé de 140 mL d'eau et 60 mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La solution obtenue est extraite avec 2x120 mL Et₂O. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 100 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **143** (5.783 g, 8.48 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 85 %

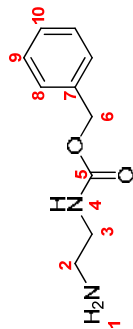
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 3/97, v/v) : 0.26

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 685, 850, 883, 928, 1015, 1061, 1106, 1228, 1297, 1334, 1463, 1521, 1563, 2867, 2945

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06-1.36 (m, 63H, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₂, H₁₃, H₁₃'), 1.78-1.92 (m, 2H, H₈), 2.89-2.97 (m, 2H, H₇), 3.76 (t, 2H, H₉), 6.71 (s, 1H, H₃), 7.60 (1H, H₆)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.2 (3C₁₀), 13.1, 13.3 (3C₁₂, 3C₁₂'), 18.0, 18.0, 18.2 (6C₁₁, 6C₁₁'), 30.0 (C₇), 34.1 (C₈), 62.9 (C₉), 116.7 (C₆), 122.0 (C₃), 132.5 (C₄), 141.1 (C₅), 145.2 (C₁), 152.3 (C₂)

2-aminoéthylcarbamate de benzyle **144**



A une solution d'éthylènediamine (5 g, 83.20 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (50 mL) agitée vigoureusement est lentement additionnée (temps d'addition 4 h) sous argon une solution de chloroformate de benzyle (2.365 g, 13.87 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (50 mL). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans 200 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel d'alumine, conduisant à **144** (2.034 g, 10.47 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 76 %

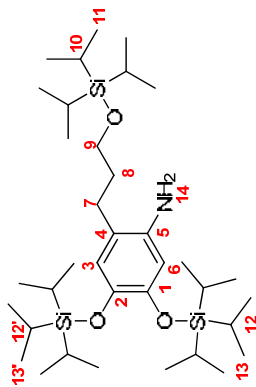
Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 70/30/1, v/v/v) : 0.45

IR (CCl₄, ν (cm⁻¹)) : 698, 735, 1140, 1261, 1455, 1540, 1698, 3361

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.37 (ls, 2H, H₁), 2.79 (t, 2H, H₂), 3.22 (q, 2H, H₃) = 6Hz, H₃), 5.09 (s, 2H, H₆), 5.34 (ls, 1H, H₄), 7.29-7.36 (m, 5H, H₈, H₉, H₁₀)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 41.8 (C₂), 43.9 (C₃), 66.7 (C₆), 128.2, 128.6 (2C₈, 2C₉, C₁₀), 136.67 (C₇), 157.0 (C₅)

4,5-bis((triospropylsilyloxy)-2-(3-((triospropylsilyloxy)propyl)aniline) 145



A une solution de **144** (6.047 g, 8.86 mmol) dans l'éthanol anhydre (180 mL) est ajouté le Pd/C (10 % m/m, 963 mg, 0.89 mmol). Le milieu est purgé trois fois (vide/atmosphère H₂) puis le mélange est vigoureusement agité à TA sous atmosphère d'hydrogène pendant 20 h. Le milieu réactionnel est filtré sur Celite® 545, qui est rincée avec 600 mL d'AcOEt. Les filtrats sont combinés, séchés sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **145** (4.987 g, 7.65 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 86 %

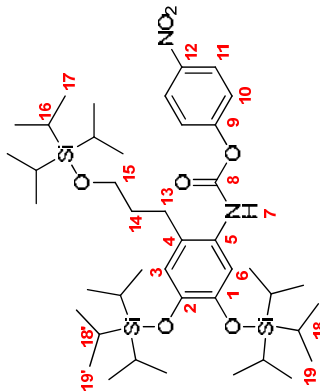
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 8/92, v/v) : 0.41

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 684, 883, 930, 997, 1068, 1100, 1134, 1202, 1225, 1339, 1418, 1514, 1611, 2866, 2943

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.06-1.26 (m, 63H, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₂, H₁₂, H₁₂, H₁₃, H₁₃), 1.69-1.83 (m, 2H, H₈), 2.51 (t, 2H, *J* = 7 Hz, H₇), 3.44 (ls, 2H, H₁₄), 3.70 (t, 2H, *J* = 6 Hz, H₉), 6.21 (s, 1H, H₆), 6.52 (s, 1H, H₃)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.2 (3C₁₀), 13.3 (3C₁₂, 3C₁₂), 18.2 (6C₁₁, 6C₁₃, 6C₁₃), 26.6 (C₇), 33.2 (C₈), 62.4 (C₉), 108.5 (C₆), 119.1 (C₄), 121.2 (C₃), 137.8 (C₅), 139.6 (C₂), 145.3 (C₁)

4,5-bis((triospropylsilyloxy)-2-(3-((triospropylsilyloxy)propyl)phényl)carbamate de 4-nitrophényle 146



A une solution de **145** (4.957 g, 7.60 mmol) et de chloroformiate de *p*-nitrophényle (1.608 g, 7.98 mmol) dans le THF anhydre (150 mL) est lentement additionnée sous argon une solution de pyridine (1.23 mL, 15.20 mmol) dans le THF anhydre (50 mL). Le mélange est agité à TA pendant 4 h puis versé dans 250 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 3x150 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec 150 mL d'eau et 150 mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **146** (4.861 g, 5.95 mmol).

Aspect : huile jaune orangé

Rendement : 78 %

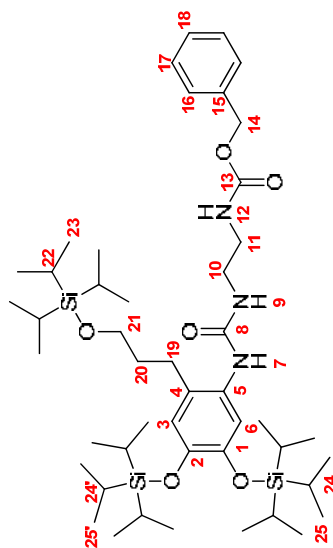
Rf (SiO₂, acétate d'éthyle/cyclohexane, 4/96, v/v) : 0.26

IR (KBr, ν (cm⁻¹)) : 686, 854, 883, 975, 1206, 1342, 1463, 1525, 1758, 2867, 2945

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 1.04-1.28 (m, 63H, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₈, H₁₈, H₁₉, H₁₉), 1.72-1.82 (m, 2H, H₁₄), 2.66-2.72 (m, 2H, H₁₃), 3.61 (t, 2H, *J* = 6 Hz, H₁₅), 6.62 (s, 1H, H₃), 7.27 (s, 1H, H₆), 7.32 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₁₀), 7.90 (ls, 1H, H₇), 8.27 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H₁₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 12.1 (3C₁₆), 13.2, 13.3 (3C₁₈, 3C₁₈), 18.1 (6C₁₇, 6C₁₉, 6C₁₉), 25.9 (C₁₄), 33.8 (C₁₄), 61.0 (C₁₅), 114.6 (C₆), 120.7 (C₃), 122.1 (2C₁₀), 124.5 (C₄), 125.4 (2C₁₁), 128.1 (C₅), 144.9 (C₁, C₂), 145.4 (C₁₂), 151.0 (C₈), 156.0 (C₉)

2-(3-(4,5-bis((triospropylsilyloxy)-2-(3-((triospropylsilyloxy)propyl)phényl)urécido)éthyl carbamate de benzyle **147**



A une solution de **146** (2.922 g, 3.58 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (40 mL) est additionnée sous argon une solution de **144** (901 mg, 4.64 mmol) et de NEt_3 (652 μL , 4.64 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (40 mL). Le mélange est agité à TA pendant 2 h puis versé dans 220 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x75 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x75 mL solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **147** (2.497 g, 2.86 mmol).

Aspect : solide pâteux blanc

Rendement : 80 %

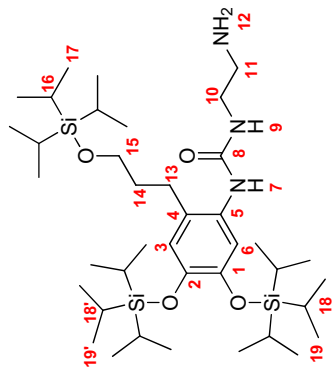
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 35/65, v/v) : 0.35

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 684, 884, 948, 1110, 1214, 1258, 1344, 1411, 1462, 1520, 1668, 1705, 2867, 2944, 3391

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.04-1.29 (m, 63H, H_{22} , H_{23} , H_{24} , H_{25} , H_{26} , H_{27} , H_{28} , H_{29} , H_{30} , H_{31}), 3.63 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{21}), 4.69 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_{12}), 5.06 (s, 2H, H_{14}), 5.48 (ls, 1H, H_9), 6.06 (s, 1H, H_7), 6.69 (s, 1H, H_3), 6.74 (s, 1H, H_6), 7.30-7.32 (m, 5H, H_{16} , H_{17} , H_{18})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.1 (3 C_{22}), 13.2, 13.3 (3 C_{24} , 3 $\text{C}_{24'}$), 18.8 (6 C_{23} , 6 C_{25} , 6 $\text{C}_{25'}$), 26.8 (C_{19}), 34.0 (C_{20}), 40.1 (C_{11}), 42.4 (C_{10}), 62.3 (C_{21}), 66.7 (C_{14}), 119.2 (C_6), 121.0 (C_3), 127.3 (C_2), 128.2, 128.6 (2 C_{16} , 2 C_{17} , C_{18}), 131.2 (C_5), 136.7 (C_{15}), 145.6, 146.4 (C_1 , C_2), 156.8 (C_{13}), 157.9 (C_8)

N-(2-aminoéthyl)-N'-(4,5-bis((triospropylsilyloxy)-2-(3-((triospropylsilyloxy)propyl)phényl)urée **148**



A une solution de **147** (2.473 g, 2.84 mmol) dans l'éthanol anhydre (75 mL) est ajouté le Pd/C (10 % m/m, 300 mg, 0.28 mmol). Le milieu est purgé trois fois (vide/atmosphère H_2) puis le mélange est vigoureusement agité à TA sous atmosphère d'hydrogène pendant 1 h 30. Le milieu réactionnel est filtré sur Celite® 545, qui est rincée avec 7x50 mL d'AcOEt. Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **148** (2.032 g, 2.75 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 97 %

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 70/30/0.5, v/v/v) : 0.23

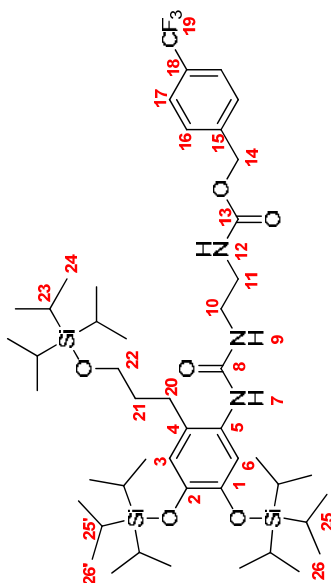
IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 684, 883, 942, 1106, 1221, 1346, 1411, 1463, 1517, 1560, 1632, 2867, 2944

Point de fusion : 179-181 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.02-1.32 (m, 63H, H_{16} , H_{17} , H_{18} , H_{19} , H_{20}), 1.24-1.29 (m, 2H, H_{12}), 1.65-1.79 (m, 2H, H_{14}), 2.54-2.61 (m, 2H, H_{13}), 2.73 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{11}), 3.22 (q, 2H, $J = 6$ Hz, H_{10}), 3.64 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{15}), 4.67-4.74 (m, 1H, H_9), 6.00 (ls, 1H, H_7), 6.69 (s, 1H, H_3), 6.75 (s, 1H, H_6)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.1 (3 C_{16}), 13.2, 13.3 (3 C_{18} , 3 $\text{C}_{18'}$), 18.1, 18.1 (6 C_{17} , 6 C_{19} , 6 $\text{C}_{19'}$), 26.9 (C_{13}), 34.0 (C_{14}), 42.2 (C_{11}), 43.4 (C_{10}), 62.4 (C_{15}), 119.2 (C_6), 121.0 (C_3), 127.7 (C_4), 131.2 (C_5), 145.5, 146.2 (C_1 , C_2), 157.6 (C_8)

2-(3-(4,5-bis((triisopropylsilyloxy)-2-(3-((triisopropylsilyloxy)propyl)phényl)urécido)éthyl)carbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **149**



A une solution de **98** (924 mg, 2.71 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (27 mL) est additionnée sous argon une solution de **148** (2 g, 2.71 mmol) et de NEt_3 (571 μL , 4.06 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (27 mL). Le mélange est agité à TA pendant 18 h puis versé dans 150 mL de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %. Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 20 mL puis 2×50 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2×50 mL solution aqueuse de Na_2CO_3 à 5 %, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **149** (2.273 g, 2.42 mmol).

Aspect : solide pâteux blanc

Rendement : 89 %

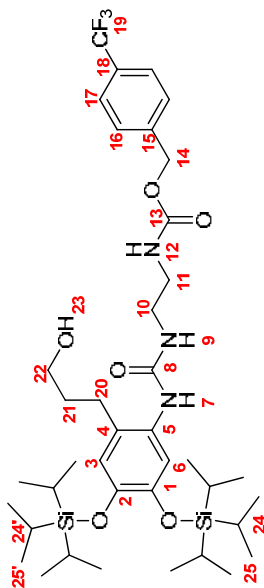
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 40/60, v/v) : 0.30

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 685, 884, 947, 1016, 1068, 1131, 1214, 1257, 1299, 1327, 1411, 1463, 1520, 1556, 1669, 1708, 2867, 2945, 3256, 3393

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.08-1.30 (m, 63H, H_{23} , H_{24} , H_{25} , H_{26} , H_{25} , H_{26}), 1.67-1.77 (m, H_{21}), 2.52-2.60 (m, 2H, H_{20}), 3.24-3.31 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 3.63 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{22}), 4.68 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H_9), 5.11 (s, 2H, H_{14}), 5.67 (ls, 1H, H_{12}), 6.06 (s, 1H, H_7), 6.69 (s, 1H, H_3), 6.73 (s, 1H, H_6), 7.44 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.59 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 12.1 (3C_{23}), 13.2, 13.3 (3C_{25} , 3C_{26}), 18.1, 18.1 (6C_{24} , 6C_{26}), 26.8 (C_{20}), 34.0 (C_{21}), 40.0 (C_{11}), 42.7 (C_{10}), 62.3 (C_{22}), 65.7 (C_{14}), 116.1, 121.5, 126.9, 133.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{19}), 119.1 (C_6), 121.0 (C_3), 125.4, 125.5, 125.6, 125.7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2C_{17}), 127.3 (C_4), 128.0 (2C_{16}), 129.9, 130.6 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 131.2 (C_3), 140.9 (C_{15}), 145.6, 146.5 (C_1 , C_2), 156.5 (C_{13}), 158.1 (C_8)

2-(3-(2-(3-(3-hydroxypropyl)-4,5-bis((triisopropylsilyloxy)phényl)urécido)éthyl)carbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **150**



A une solution de **149** (2.241 g, 2.38 mmol) dans le CH_2Cl_2 (22 mL) sont successivement ajoutés le ZnBr_2 (2.683 g, 11.92 mmol) et l'eau (214 μL , 11.92 mmol). Le mélange est vigoureusement agité à reflux pendant 23 h puis 80 mL de CH_2Cl_2 sont ajoutés. La solution obtenue est lavée avec 2×50 mL d'eau puis 2×50 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **150** (2.273 g, 2.42 mmol).

Aspect : caramel incolore

Rendement : 96 %

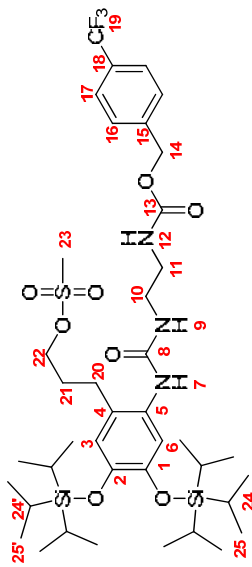
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 90/10, v/v) : 0.28

IR (KBr, ν (cm^{-1})) : 685, 821, 884, 955, 1015, 1067, 1129, 1166, 1215, 1265, 1325, 1411, 1532, 1658, 1703, 2868, 2946, 3370

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.07-1.28 (m, 42H, H_{24} , H_{24} , H_{24} , H_{25} , H_{25}), 1.68-1.80 (m, 2H, H_{21}), 2.16 (ls, 1H, H_{23}), 2.58 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{20}), 3.28-3.33 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 3.52-3.59 (m, 2H, H_{22}), 4.83 (ls, 1H, H_9), 5.11 (s, 2H, H_{14}), 5.77 (ls, 1H, H_{12}), 6.61 (s, 1H, H_7), 6.66 (s, 1H, H_3), 6.87 (s, 1H, H_6), 7.44 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.59 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 13.2, 13.3 (3C_{24} , 3C_{24}), 18.1 (6C_{25} , 6C_{25}), 26.5 (C_{20}), 33.2 (C_{21}), 40.1 (C_{11}), 42.3 (C_{10}), 61.0 (C_{22}), 65.7 (C_{14}), 116.1, 121.5, 126.9, 133.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{19}), 118.0 (C_6), 120.8 (C_3), 125.4, 125.5, 125.6, 125.6 ($^3J_{\text{C-F}}$, $J = 4$ Hz, 2C_{17}), 127.9 (2C_{16}), 128.2 (C_4), 129.1 (C_4), 129.3, 129.9, 130.6, 131.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 140.8 (C_{15}), 145.5, 145.7 (C_1 , C_2), 156.8 (C_{13}), 158.3 (C_8)

Méthanesulfonate de 3-(2-(3-(2-(((4-(trifluorométhyl)benzyl)oxy)carbonyl)amino)éthyl)uréido)-4,5-bis(uréido)-4,5-bis((triisopropylsilyloxy)phényl)propyle **151**



A une solution de **150** (1.647 g, 2.10 mmol), de NEt_3 (443 μL , 3.15 mmol) et de DMAP (26 mg, 0.21 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (33 mL) est ajouté sous argon le MsCl (244 μL , 3.15 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 1 h puis versé dans 200 mL d'eau. La solution obtenue est extraite avec 50 mL puis 2x80 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **151** (1.815 g, 2.11 mmol).

Aspect : meringue incolore

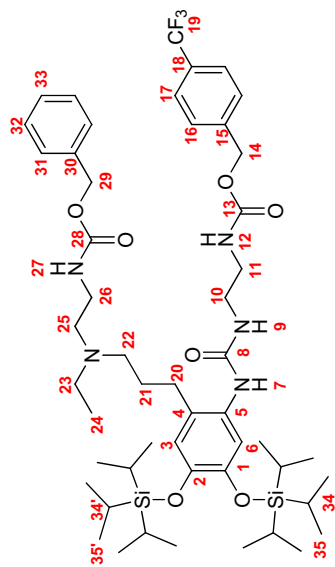
Rendement : quantitatif

Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/cyclohexane, 70/30, v/v) : 0.33

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 1.07-1.32 (m, 42H, H_{24} , $\text{H}_{24'}$, H_{25} , $\text{H}_{25'}$), 1.86-2.00 (m, 2H, H_{21}), 2.59 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H_{20}), 3.02 (s, 3H, H_{23}), 3.26-3.34 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 4.21 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H_{22}), 4.84 (ls, 1H, H_6), 5.12 (s, 2H, H_{14}), 5.64 (ls, 1H, H_{12}), 5.98 (s, 1H, H_7), 6.65 (s, 1H, H_3), 6.89 (s, 1H, H_6), 7.45 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.60 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17})

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 13.2, 13.3 (3 C_{24} , 3 $\text{C}_{24'}$), 18.1 (6 C_{25} , 6 $\text{C}_{25'}$), 26.6 (C_{20}), 30.3 (C_{21}), 37.7 (C_{23}), 40.1 (C_{11}), 42.6 (C_{10}), 65.7 (C_{14}), 69.1 (C_{22}), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{19}), 118.6 (C_6), 120.7 (C_3), 125.4, 125.5, 125.6, 125.6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2 C_{17}), 127.7 (C_{16}), 128.0 (C_5), 128.1 (C_4), 129.3, 129.9, 130.6, 131.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, C_{18}), 140.9 (C_{15}), 145.9, 146.0 (C_1 , C_2), 156.5 (C_{13}), 157.8 (C_8)

3-(2-(éthyl-(3-(2-(((4-(trifluorométhyl)benzyl)oxy)carbonyl)amino)éthyl)uréido)-4,5-bis((triisopropylsilyloxy)phényl)propyl)amino)éthyl)carbamate de benzyle **152**



A une solution de **151** (1.679 g, 1.95 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (40 mL) est additionnée sous argon une solution de DIPEA (509 μL , 2.92 mmol) et de **55** (649 mg, 2.92 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL). Le mélange est agité à reflux pendant 48 h puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans 100 mL de CH_2Cl_2 et versé dans 300 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Les phases sont décantées et la phase aqueuse est extraite avec 2x100 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **152** (1.042 g, 1.05 mmol).

Aspect : caramel jaune pâle

Rendement : 54 %

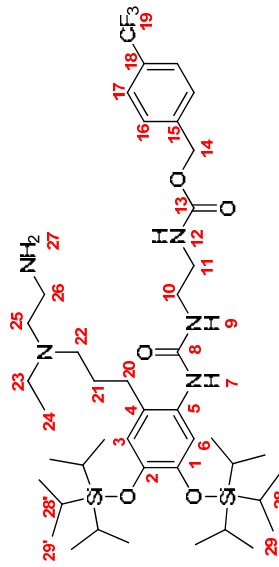
Rf (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol/ammoniacque, 97/3/0.5, v/v/v) : 0.30

IR (KBr , ν (cm^{-1})) : 652, 687, 830, 884, 923, 1066, 1128, 1169, 1218, 1243, 1323, 1411, 1466, 1515, 1632, 1704, 2868, 2947, 3345

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) : 0.91 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_{24}), 1.06-1.33 (m, 42H, H_{34} , $\text{H}_{34'}$, H_{35} , $\text{H}_{35'}$), 1.67-1.73 (m, 2H, H_{21}), 2.14-2.60 (m, 8H, H_{20} , H_{22} , H_{23} , H_{25}), 3.05-3.18 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 3.26-3.34 (m, 2H, H_{26}), 4.94 (ls, 1H, H_{12}), 5.04 (s, 2H, H_{14} ou H_{59}), 5.08 (s, 2H, H_{14} ou H_{29}), 5.42 (s, 2H, H_7), 6.64 (s, 1H, H_3), 6.68 (s, 1H, H_6), 7.16-7.35 (m, 5H, H_{31} , H_{32} , H_{33}), 7.42 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{16}), 7.59 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H_{17}), 9.43 (ls, 1H, H_9)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) : 9.0 (C_{24}), 13.2, 13.3 (3 C_{34} , 3 $\text{C}_{34'}$), 18.0, 18.1 (6 C_{35} , 6 $\text{C}_{35'}$), 26.2 (C_{20}), 28.2 (C_{21}), 38.1 (C_{26}), 40.1 (C_{11}), 42.5 (C_{10}), 47.7 (C_{23}), 49.7, 40.2 (C_{22} , C_{25}), 65.5, 66.1 (C_{14} , C_{29}), 116.0 (C_6), 116.5, 121.9, 126.9, 132.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, C_{19}), 121.4 (C_3), 125.4, 125.5, 125.5, 125.6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, 2 C_{17}), 127.6 (C_5), 127.8-128.6 (2 C_{16} , C_{18} , 2 C_{31} , 2 C_{32} , C_{33}), 129.4 (C_4), 137.2 (C_{30}), 140.9 (C_{15}), 145.1, 145.7 (C_1 , C_2), 156.3 (C_{13}), 157.1 (C_{28}), 158.4 (C_8)

2-(3-(2-(2-aminoéthyl)(éthylamino)propyl)-4,5-bis((triisopropylsilyloxy)phényl)uréido)éthylcarbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **153**



A une solution de **152** (1 g, 1.01 mmol) dans l'éthanol anhydre (30 mL) est ajouté le Pd/C (10 % m/m, 107 mg, 0.10 mmol). Le milieu est purgé quatre fois (vide / atmosphère H₂) puis le mélange est vigoureusement agité à TA sous atmosphère de dihydrogène pendant 2 h. Le milieu réactionnel est filtré sur Celite® 545, qui est rincée avec de l'AcOEt. Les filtrats sont combinés et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel d'alumine, conduisant à **153** (321 mg, 0.38 mmol).

Aspect : huile pâteuse incolore

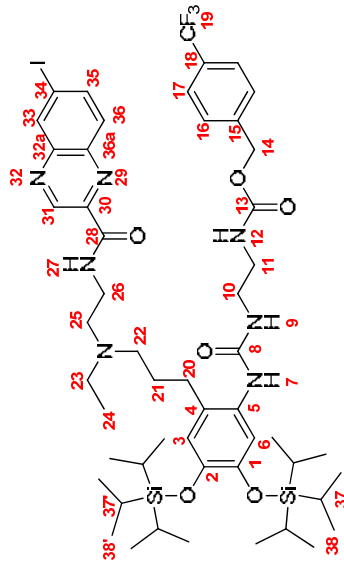
Rendement : 37 %

Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 95/5/0.5, v/v/v) : 0.55

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) : 0.90 (t, 3H, J = 7 Hz, H₂₄), 1.07-1.33 (m, 42H, H₂₈, H₂₉, H_{29'}), 1.67-1.76 (m, 2H, H₂₁), 2.21-2.60 (m, 8H, H₂₀, H₂₂, H₂₃, H₂₅), 2.84 (t, 2H, J = 6 Hz, H₂₆), 3.23-3.37 (m, 4H, H₁₀, H₁₁), 5.12 (s, 2H, H₁₄), 6.02 (s, 1H, H₁₂), 6.57 (s, 1H, H₃), 7.24 (s, 1H, H₆), 7.44 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₆), 7.58 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₇), 8.39 (ls, 1H, H₇)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 9.1 (C₂₄), 13.2, 13.3 (3C₂₈, 3C_{28'}), 18.1 (6C₂₉, 6C_{29'}), 26.9 (C₂₀), 28.3 (C₂₁), 39.0 (C₂₆), 39.4 (C₁₁), 43.1 (C₁₀), 46.8, 50.8, 53.1 (C₂₂, C₂₃, C₂₅), 65.5 (C₁₄), 115.5 (C₆), 116.1, 121.5, 126.9, 132.3 (q, ¹J_{C-F} = 270 Hz, C₁₉), 120.6 (C₃), 125.1 (C₄), 125.4, 125.5, 125.6 (q, ³J_{C-F} = 4 Hz, 2C₁₇), 118.0 (2C₁₆), 129.2, 129.8, 130.4, 131.1 (q, ²J_{C-F} = 32 Hz, C₁₈), 130.3 (C₅), 141.1 (C₁₅), 143.6, 145.2 (C₁, C₂), 156.6 (C₁₃), 157.9 (C₈)

2-(3-(2-(3-(éthyl(2-(6-iodoquinoxaline-2-carboxamido)éthyl)amino)propyl)-4,5-bis((triisopropylsilyloxy)phényl)uréido)éthylcarbamate de 4-(trifluorométhyl)benzyle **154**



A une solution de **153** (321 mg, 0.38 mmol) dans le THF anhydre (8 mL) est ajouté sous argon **12** (174 mg, 0.41 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 22 h puis versé dans 20 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %. La solution obtenue est extraite avec 3x8 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec 2x10 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, conduisant à **154** (220 mg, 0.19 mmol).

Aspect : meringue jaune pâle

Rendement : 52 %

Rf (SiO₂, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 96/4/0.5, v/v/v) : 0.27

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ) : 1.03-1.26 (m, 45H, H₂₄, H₂₄, H₂₄, H₃₇, H₃₇, H₃₈, H₃₈), 1.70-1.73 (m, 2H, H₂₁), 2.30-2.32 (m, 2H, H₂₅), 2.52 (t, 2H, J = 7 Hz, H₂₀), 2.62 (q, 2H, J = 7 Hz, H₂₃), 2.68-2.72 (m, 2H, H₂₂), 3.24-3.32 (m, 4H, H₁₀, H₁₁), 3.62-3.66 (m, 2H, H₂₆), 5.07 (m, 3H, H₁₂, H₁₄), 5.75 (s, 1H, H₉), 6.63 (s, 1H, H₃), 6.77 (s, 1H, H₆), 7.40 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₆), 7.56 (d, 2H, J = 8 Hz, H₁₇), 7.66 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₆), 8.00 (d, 1H, J = 9 Hz, H₃₅), 8.31 (ls, 1H, H₂₇), 8.58 (d, 1H, J = 2 Hz, H₃₃), 8.81 (ls, 1H, H₇), 9.57 (s, 1H, H₃₁)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) : 10.3 (C₂₄), 13.2, 13.2 (3C₃₇, 3C₃₇), 18.0, 18.0 (6C₃₈, 6C₃₈), 27.4 (C₂₀), 28.2 (C₂₁), 37.5 (C₂₆), 40.1 (C₁₁), 42.7 (C₁₀), 47.8 (C₂₃), 51.3, 51.5 (C₂₂, C₂₅), 65.6 (C₁₄), 98.0 (C₃₄), 116.0, 121.4, 126.8, 132.2 (q, ¹J_{C-F} = 270 Hz, C₁₉), 117.4 (C₆), 121.0 (C₃), 125.3, 125.4, 125.5, 125.5 (q, ³J_{C-F} = 4 Hz, 2C₁₇), 127.9 (2C₁₆), 128.6 (C₄, C₅), 129.2, 129.8, 130.4, 131.1 (q, ²J_{C-F} = 32 Hz, H₁₈), 130.8 (C₃₃), 138.6 (C₃₆), 139.6 (C_{36a}), 139.7 (C₃₅), 140.8 (C₁₅), 144.3, 144.5 (C₃₀, C_{32a}), 144.7 (C₃₁), 145.5, 145.6 (C₁, C₂), 156.4 (C₁₃), 158.1 (C₈), 163.8 (C₂₈)

IES-SM : [M+H]⁺_{th} = 1136.46 / [M+H]⁺_{mes} = 1136.55

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] Jemal A. *et al.*, Cancer statistics, 2010. *Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 277-300
- [2] Madan V. *et al.*, Non-melanoma skin cancer. *Lancet* **2010**, *375*, 673-685
- [3] Miller A. J. *et al.*, Melanoma. *New Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 51-65
- [4] Macdonald J. B., Malignant melanoma in the elderly: different regional disease and poorer prognosis. *J. Cancer* **2011**, *2*, 538-543
- [5] *Cancer Facts and Figures 2012*
- [6] MacKie R. M. *et al.*, Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, vi1-vi7
- [7] Belot A. *et al.*, Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epidemiol. Sante* **2008**, *56*, 159-175
- [8] Lipsker D. *et al.*, Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *157*, 338-343
- [9] Whiteman D. *et al.*, Epidemiology of malignant melanoma. *Skin Cancer - A World-Wide Perspective* **2011**, 13-26
- [10] Jemal A. *et al.*, Cancer surveillance series: changing patterns of cutaneous malignant melanoma mortality rates among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 811-818
- [11] Darrell S R., Epidemiology of melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2010**, *29*, 204-209
- [12] Gandini S. *et al.*, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 45-60
- [13] Margaret A T., Melanoma epidemiology. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2009**, *23*, 383-395
- [14] Garbe C. *et al.*, Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 3-9
- [15] Gandini S. *et al.*, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2040-2059
- [16] Fargnoli M. C. *et al.*, MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1413-1420
- [17] Berwick M., Melanoma epidemiology. *Melanoma Development* **2011**, 35-55
- [18] Sekulic A. *et al.*, Malignant Melanoma in the 21st Century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83*, 825-846
- [19] Dennis L. K. *et al.*, Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 812-817
- [20] Beane Freeman L. E. *et al.*, Toenail arsenic content and cutaneous melanoma in Iowa. *Am. J. Epidemiol.* **2004**, *160*, 679-687
- [21] Gallagher R. P. *et al.*, Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 1872-1880
- [22] Hallberg Ö. *et al.*, Malignant melanoma of the skin – not a sunshine story ! *Med. Sci. Monit.* **2004**, *10*, 336-340
- [23] Raposo G. *et al.*, Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 786-797
- [24] http://arts-plastiques.ac-rouen.fr/rue_evreux/seconde_peau/seconde_peau.html.
- [25] <http://www.dreamstime.com/stock-photos-anatomy-of-the-epidermis-of-the-skin-image18337183>.
- [26] Lin J. Y. *et al.*, Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **2007**, *445*, 843-850
- [27] Bahadoran P. *et al.*, Que trafiquent les mélanosomes ? *Medecine / Sciences* **2002**, *18*, 205-209
- [28] Wasmeier C. *et al.*, Melanosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3995-3999
- [29] Zecca L. *et al.*, Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol. Pathol.* **2001**, *54*, 414-418
- [30] Bruno J.R N., A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory. *Med. Hypotheses* **2005**, *65*, 791-796
- [31] Schallreuter K. U. *et al.*, Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 395-404
- [32] Land E. J. *et al.*, Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 300-308
- [33] Olivares C. *et al.*, Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* **2002**, *41*, 679-686
- [34] Ito S. *et al.*, Chemistry of mixed melanogenesis - Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582-592
- [35] Karin U S., Advances in melanocyte basic science research. *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 283-291
- [36] Schallreuter K. U. *et al.*, Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **1994**, *263*, 1444-1446
- [37] Ancans J. *et al.*, Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **2001**, *268*, 26-35
- [38] Fuller B. B. *et al.*, Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp. Cell Res.* **2001**, *262*, 197-208
- [39] Meredith P. *et al.*, Towards structure-property-function relationships for eumelanin. *Soft Matter* **2006**, *2*, 37-44
- [40] Meredith P. *et al.*, Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 211-216
- [41] Brenner M. *et al.*, The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 539-549
- [42] Meredith P. *et al.*, The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigm. Cell Res.* **2006**, *19*, 572-594
- [43] Ings R. M. J., The melanin binding of drugs and its implications. *Drug Metab. Rev.* **1984**, *15*, 1183-1212
- [44] Larsson B. S., Interaction between chemicals and melanin. *Pigm. Cell Res.* **1993**, *6*, 127-133
- [45] Slipicevic A. *et al.*, Narrowing the knowledge gaps for melanoma. *Upsala J. Med. Sci.* **2012**, *0*, 1-7
- [46] Koch S. E. *et al.*, Amelanotic melanoma: The great masquerader. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *42*, 731-734
- [47] Huang S. K. S. *et al.*, Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *111*, 662-667
- [48] Rigel D. S. *et al.*, The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 301-316
- [49] Gould Rothberg B. E. *et al.*, Biomarkers: the useful and the not so useful: an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 1971-1987
- [50] Vereecken P., A Synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol. Res. Pract.* **2012**, *ePub*, 7 pages
- [51] Gershenwald J. E. *et al.*, Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *New Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1738-1745
- [52] Merrick I R., Sentinel node biopsy for melanoma: an update after two decades of experience. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2010**, *29*, 238-248
- [53] Garbe C. *et al.*, Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res.* **2007**, *17*, 117-127
- [54] Fletcher J. W. *et al.*, Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 480-508
- [55] Garbe C. *et al.*, Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 270-283
- [56] Balch C. M. *et al.*, Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3635-3648
- [57] Eigentler T. K. *et al.*, Impact of ulceration in Stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American joint committee on cancer staging system: an analysis of the German central malignant melanoma registry. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4376-4383
- [58] Garbe C. *et al.*, Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and central Europe. *Cancer* **2000**, *89*, 1269-1278
- [59] Morton D. L. *et al.*, Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *New Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1307-1317
- [60] Testori A. *et al.*, Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, vi22-vi29
- [61] Khan N. *et al.*, The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2011**, *80*, 645-654
- [62] Doss L. L. *et al.*, The radioresponsiveness of melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1982**, *8*, 1131-1134
- [63] Schild S. E., Role of radiation therapy in the treatment of melanoma. *Expert Rev. Anticanc.* **2009**, *9*, 583-586
- [64] Pestka S. *et al.*, Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **2004**, *202*, 8-32
- [65] Petrella T. *et al.*, Adjuvant interferon therapy for patients at high risk for recurrent melanoma: an updated systematic review and practice guideline. *Clin. Oncol.* **2012**, *24*, 413-423
- [66] Davar D. *et al.*, Adjuvant Therapy: Melanoma. *J. Skin Cancer* **2011**, *ePub*, Article ID 274382, 19 pages

- [67] Waldmann T. A., The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 595-601
- [68] Schwartzenuber D. J., A phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100: 209–217(210M) peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, 27, Abstract CRA9011
- [69] Lens M. B. *et al.*, Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2003**, 4, 2205-2211
- [70] Lee S. M., Formation and loss of O⁶-methyldeoxyguanosine in human leucocyte DNA following sequential DTIC and fotemustine chemotherapy. *Br. J. Cancer* **1994**, 69, 853-857
- [71] Marchesi F. *et al.*, Triazine compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol. Res.* **2007**, 56, 275-287
- [72] Garbe C. *et al.*, Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist* **2011**, 16, 5-24
- [73] Patel P. M. *et al.*, Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: Final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur. J. Cancer* **2011**, 47, 1476-1483
- [74] Erickson L. C. *et al.*, DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 467-471
- [75] Anderson C. M., Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology* **1995**, 9, 1149-1158
- [76] Steffens T. A. *et al.*, A phase II trial of high-dose cisplatin and dacarbazine. Lack of efficacy of high-dose, cisplatin-based therapy for metastatic melanoma. *Cancer* **1991**, 68, 1230-1237
- [77] Bedikian A. Y. *et al.*, Phase II trial of docetaxel in patients with advanced cutaneous malignant melanoma previously untreated with chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1995**, 13, 2895-2899
- [78] Sun W. *et al.*, Metastatic melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2001**, 2, 193-202
- [79] Chapman P. B. *et al.*, Phase III Multicenter randomized trial of the dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 2745-2751
- [80] Ives N. J. *et al.*, Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25, 5426-5434
- [81] Ji Z. *et al.*, Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol. Asp. Med.* **2010**, 31, 194-204
- [82] Eggermont A. M. M. *et al.*, New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer* **2011**, 47, 2150-2157
- [83] O'Day S. J. *et al.*, Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4). *Cancer* **2007**, 110, 2614-2627
- [84] Kirkwood J. M. *et al.*, Phase II trial of Tremelimumab (CP-675,206) in patients with advanced refractory or relapsed melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 1042-1048
- [85] Weber J. *et al.*, A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of Ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 5591-5598
- [86] O'Day S. J. *et al.*, Efficacy and safety of Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann. Oncol.* **2010**, 21, 1712-1717
- [87] Hodi F. S. *et al.*, Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2010**, 363, 711-723
- [88] Robert C. *et al.*, Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2011**, 364, 2517-2526
- [89] Satyamoorthy K. *et al.*, Constitutive Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Melanoma Is Mediated by Both BRAF Mutations and Autocrine Growth Factor Stimulation. *Cancer Res.* **2003**, 63, 756-759
- [90] Flaherty K. T. *et al.*, Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *New Engl. J. Med.* **2010**, 363, 809-819
- [91] Margolin K. A. *et al.*, Randomized phase II trial of Sorafenib with Temsirolimus or Tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 1129-1137
- [92] Guo J. *et al.*, Phase II, open-label, single-arm trial of Imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-kit mutation or amplification. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 2904-2909
- [93] Fruehauf J. *et al.*, Multicenter, phase II study of Axitinib, a selective second-generation inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3, in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 7462-7469
- [94] Kim K. B. *et al.*, BEAM: A randomized phase II study evaluating the activity of Bevacizumab in combination with Carboplatin plus Paclitaxel in patients with previously untreated advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30, 34-41
- [95] Kirkwood J. M. *et al.*, A phase 2 study of tasisulam sodium (LY573636 sodium) as second-line treatment for patients with unresectable or metastatic melanoma. *Cancer* **2011**, 117, 4732-4739
- [96] Eroglu Z. *et al.*, Phase II clinical trial evaluating docetaxel, vinorelbine and GM-CSF in stage IV melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, 68, 1081-1087
- [97] Kaina B. *et al.*, MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **2007**, 6, 1079-1099
- [98] Jiricny J., The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 335-346
- [99] Chen K. G. *et al.*, Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9903-9907
- [100] Poulidakos P. I. *et al.*, Mutant BRAF melanomas-dependence and resistance. *Cancer Cell* **2011**, 19, 11-15
- [101] Strebhardt K. *et al.*, Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 473-480
- [102] Vilner B. J. *et al.*, Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* **1995**, 55, 408-413
- [103] Megalizzi V. *et al.*, Sigma receptors and their ligands in cancer biology: overview and new perspectives for cancer therapy. *Med. Res. Rev.* **2012**, 32, 410-427
- [104] H. E. *et al.*, Sigma-receptor imaging by means of I[123]-IDAB scintigraphy : clinical application in melanoma and non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **1997**, 17, 1577-1582
- [105] Banerjee R. *et al.*, Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **2004**, 112, 693-700
- [106] Kim C. *et al.*, *In vivo* photoacoustic tomography of melanomas targeted by bio-conjugated gold nanocages. *ACS Nano.* **2010**, 4, 4559-4564
- [107] Dadachova E. *et al.*, Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 14865-14870
- [108] Dadachova E. *et al.*, Pre-clinical evaluation and efficacy studies of a melanin-binding IgM antibody labeled with ¹⁸⁸Re against experimental human metastatic melanoma in nude mice. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, 7, 1116-1127
- [109] Revskaya E. *et al.*, Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 2373-2379
- [110] Dadachova E. *et al.*, Melanin as a potential target for radionuclide therapy of metastatic melanoma. *Future Oncol.* **2005**, 1, 541-549
- [111] Dadachova E., Radiolabeled melanin-binding peptides are safe and effective in treatment of human pigmented melanoma in a mouse model of disease. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2006**, 21, 117-129
- [112] Inoue S. *et al.*, Antimelanoma activity of chloroquine, an antimalarial agent with high affinity for melanin. *Pigm. Cell Res.* **1993**, 6, 354-358
- [113] Mars U. *et al.*, Positron emission tomography of experimental melanoma with [⁷⁶Br]5-bromo-2-thiouracil. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 845-849
- [114] Sobal G. *et al.*, Radioiodinated methylene blue - A promising agent for melanoma scintigraphy: labelling, stability and in vitro uptake by melanoma cells. *Anticancer Res.* **2008**, 28, 3691-3696

Bibliographic

- [115] Michelot J. M. *et al.*, Synthesis and evaluation of new iodine-125 radiopharmaceuticals as potential tracers for malignant melanoma. *J. Nucl. Med.* **1991**, *32*, 1573-1580
- [116] Eisenhut M. *et al.*, Radioiodinated N-(2-Diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3913-3922
- [117] Pham T. Q. *et al.*, Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3561-3572
- [118] Liu X. *et al.*, Synthesis and evaluation of novel radioiodinated nicotinamides for malignant melanoma. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 769-781
- [119] Denoyer D. *et al.*, High-contrast PET of melanoma using ¹⁸F-MEL050, a selective probe for melanin with predominantly renal clearance. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 441-447
- [120] Joyal J. L. *et al.*, Preclinical evaluation of an ¹³¹I-labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4045-4053
- [121] Guerquin-Kern J.-L. *et al.*, Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences. *BioMed. Eng. Online* **2004**, *6*, 10
- [122] Labarre P. *et al.*, Melanin affinity of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide, an effective melanoma imaging agent. *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 115-121
- [123] Moins N. *et al.*, Synthesis, characterization and comparative biodistribution study of a new series of p-Iodine-125 benzamides as potential melanoma imaging agents. *Nucl. Med. Biol.* **2001**, *28*, 799-808
- [124] Chezal J.-M. *et al.*, Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3133-3144
- [125] Madelmont J.-C. *et al.*, Labelled analogues of halobenzamides as radiopharmaceuticals. *World Patent* **2008**, *WO2008012782*
- [126] Bonnet-Duquenooy M. *et al.*, Targeted radionuclide therapy of melanoma: Anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 708-716
- [127] Bonnet M. *et al.*, Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigm. Cell Mel. Res.* **2010**, *23*, e1-e11
- [128] Oltmanns D., Benzamides as melanotropic carriers for radioisotopes, metals, cytotoxic agents and as enzyme inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2086-2094
- [129] Vivier M. *et al.*, Synthesis, radiosynthesis, and biological evaluation of new proteasome inhibitors in a tumor targeting approach. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1043-1047
- [130] Rapp M. *et al.*, A new O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase inhibitor associated with a nitrosourea (Cystemustine) validates a strategy of melanoma-targeted therapy in murine B16 and human-resistant M4Beu melanoma xenograft models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 171-177
- [131] Wolf M. *et al.*, Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity: experimental chemotherapy in a mouse melanoma model. *Melanoma Res.* **2006**, *16*, 487-496
- [132] Han H.-K. *et al.*, Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharmsci.* **2000**, *2*, 48-58
- [133] Ettmayer P. *et al.*, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2393-2404
- [134] Kratz F. *et al.*, Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 20-53
- [135] Guengerich F. P., Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *21*, 70-83
- [136] Albert A., Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421-423
- [137] Stella V. J. *et al.*, Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 677-694
- [138] Sohma Y. *et al.*, Development of water-soluble prodrugs of the HIV-1 protease inhibitor KNI-727: importance of the conversion time for higher gastrointestinal absorption of prodrugs based on spontaneous chemical cleavage. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4124-4135
- [139] Varia S. A. *et al.*, Phenytoin prodrugs IV: hydrolysis of various 3-(hydroxymethyl)phenytoin esters. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1074-1080
- [140] Pasut G. *et al.*, PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1177-1188
- [141] Greenwald R. B. *et al.*, Highly water soluble taxol derivatives: 2'-polyethyleneglycol esters as potential prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2465-2470
- [142] Tunek A. *et al.*, Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 3867-3876
- [143] Yoshikawa M., Metabolism of dopamine prodrug, docarpamine. *Hypertens. Res.* **1995**, *18*, S211-S213
- [144] Matsumura Y. *et al.*, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392
- [145] Khandare J. *et al.*, Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 359-397
- [146] Ducry L. *et al.*, Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *21*, 5-13
- [147] Teicher B. A. *et al.*, Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6389-6397
- [148] Giles F. J. *et al.*, MylotargTM (gemtuzumab ozogamicin) therapy is associated with hepatic venoocclusive disease in patients who have not received stem cell transplantation. *Cancer* **2001**, *92*, 406-413
- [149] Wadleigh M. *et al.*, Prior gemtuzumab ozogamicin exposure significantly increases the risk of veno-occlusive disease in patients who undergo myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **2003**, *102*, 1578-1582
- [150] Bagshawe K. D., Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531-532
- [151] Senter P. D. *et al.*, Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4842-4846
- [152] Mayer A. *et al.*, A Phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFECP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6509-6516
- [153] Landowski C. P. *et al.*, Targeted delivery to PEPT1-overexpressing cells: Acidic, basic, and secondary floxuridine amino acid ester prodrugs. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 659-667
- [154] Ganesh T., Improved biochemical strategies for targeted delivery of taxoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3597-3623
- [155] Low P. S. *et al.*, Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 256-262
- [156] Lee J. W. *et al.*, Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2397-2414
- [157] Liu J. *et al.*, Targeted drug delivery to chemoresistant cells: folic acid derivatization of FdUMP[10] enhances cytotoxicity toward 5-FU-resistant human colorectal tumor cells. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5655-5663
- [158] Henne W. A. *et al.*, Synthesis and activity of a folate peptide camptothecin prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350-5355
- [159] Siegel B. A. *et al.*, Evaluation of ¹¹¹In-DTPA-folate as a receptor-targeted diagnostic agent for ovarian cancer: initial clinical results. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 700-707
- [160] Vlahov I. R. *et al.*, Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096
- [161] Reddy J. A. *et al.*, Preclinical evaluation of EC145, a folate-Vinca alkaloid conjugate. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4434-4442
- [162] Ciccolini J. *et al.*, Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin. Colorectal Cancer* **2010**, *9*, 224-228
- [163] Marshall J. L. *et al.*, Capecitabine: fulfilling the promise of oral chemotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 733-743
- [164] Singh Y. *et al.*, Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1802-1826

- [165] Warburg O., On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309-314
- [166] Jain R. *et al.*, Synthesis and degradation of pH-sensitive linear poly(amidoamine)s. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457
- [167] Reddy S. B. *et al.*, Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells. *Expert Opin. Inv. Drug* **2009**, *18*, 77-87
- [168] Papadopoulos K. P. *et al.*, A phase 1 open-label, accelerated dose-escalation study of the hypoxia-activated prodrug AQ4N in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7110-7115
- [169] Gomes P. *et al.*, Cyclization-activated prodrugs. *Molecules* **2007**, *12*, 2484-2506
- [170] Papot S., Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2002**, *2*, 155-185
- [171] de Groot F. M. H. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of paclitaxel: selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3093-3102
- [172] Vielkind U. *et al.*, Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosine activity and degree of malignancy. *Cancer Res. Clin. Oncol.* **1977**, *90*, 285-299
- [173] Cormier J. N., Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J. Immunother.* **1998**, *21*, 27-31
- [174] Morrison M. E. *et al.*, In vitro studies of 2,4-dihydroxyphenylalanine, a prodrug targeted against malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2960-2964
- [175] Perry M. J. *et al.*, Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: activation by tyrosinase and implications for prodrug design. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3228-3234
- [176] Jordan A. M. *et al.*, Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1549-1558
- [177] Knaggs S. *et al.*, New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT). *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4002-4010
- [178] Prusoff W. H., Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295-296
- [179] Eidinoff M. L. *et al.*, Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science* **1959**, *129*, 1550-1551
- [180] Viera M. H. *et al.*, Herpes simplex virus and human papillomavirus genital infections: new and investigational therapeutic options. *Int. J. Dermatol.* **2010**, *49*, 733-749
- [181] Taverna P. *et al.*, Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 838-846
- [182] Hoshino T. *et al.*, Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int. J. Cancer* **1992**, *50*, 1-5
- [183] Rebeschung C. *et al.*, First human treatment of resistant neoplastic meningitis by intrathecal administration of MTX Plus ¹²⁵IuDR. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 1123-1129
- [184] Kortylewicz Z. P. *et al.*, Radiolabeled 5-iodo-3'-O-(17 β -succinyl-5 α -androstan-3-one)-2'-deoxyuridine and its 5'-monophosphate for imaging and therapy of androgen receptor-positive cancers: synthesis and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5124-5143
- [185] Bolton R., Radiohalogen incorporation into organic systems. *J. Labelled Compd. Rad.* **2002**, *45*, 485-528
- [186] Azizian H. *et al.*, Synthesis of organotrialkylstannanes. The reaction between organic halides and hexaalkyldistannanes in the presence of palladium complexes. *J. Organomet. Chem.* **1981**, *215*, 49-58
- [187] Baranowska-Kortylewicz J. *et al.*, Radiolabeling kit / generator for 5-radiohalogenated uridines. *J. Labelled Compd. Rad.* **1994**, *34*, 513-521
- [188] Wuts P. G. M. *et al.*, Silyl ethers. *Greene's Protective Groups in Organic Syntheses 4th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey **2007**, 165-222
- [189] Moharram S. *et al.*, Design and synthesis of 3'- and 5'-O-(3-benzenesulfonylfuroxan-4-yl)-2'-deoxyuridines: biological evaluation as hybrid nitric oxide donor-nucleoside anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1840-1846
- [190] Denoyer D. *et al.*, Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of a new potent radioiodinated melanoma imaging and therapeutic agent. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 411-418
- [191] Yeom C.-E. *et al.*, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)-promoted efficient and versatile aza-Michael addition. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 904-909
- [192] Farschtschi N., 'Ethylene-bis[phosphonate] nucleic acids': novel monomeric synthons for the solid-phase synthesis of (P-CH₂-CH₂-P)-bridged oligonucleotides. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 402-414
- [193] Matysiak S. *et al.*, Nucleosides. Part LXIII. Acetals as new 2'-O-protecting functions for the synthesis of oligoribonucleotides: synthesis of uridine building blocks and evaluation of their relative acid stability. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1545-1566
- [194] Munro T. A. *et al.*, Standard protecting groups create potent and selective κ opioids: Salvinorin B alkoxyethyl ethers. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1279-1286
- [195] Patino N. *et al.*, Modelling, synthesis and biological evaluation of an ethidium-arginine conjugate linked to a ribonuclease mimic directed against TAR RNA of HIV-1. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 573-584
- [196] Korshun V. A. *et al.*, Novel uridin-2'-yl carbamates: synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2'-pyren-1-ylmethylcarbamate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 1092-1104
- [197] Vortherms A. R. *et al.*, Synthesis, characterization, and in vitro assay of folic acid conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): toward targeted AZT based anticancer therapeutics. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2008**, *27*, 173-185
- [198] Leuck M. *et al.*, A novel reagent for the chemical phosphorylation of oligonucleotides. *Tet. Lett.* **2004**, *45*, 321-324
- [199] Spivey A. C. *et al.*, Nucleophilic Catalysis by 4-(Dialkylamino)pyridines Revisited—The Search for Optimal Reactivity and Selectivity. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436-5441
- [200] Wigerinck P. *et al.*, Synthesis and antiviral activity of 5-thien-2-yl-2'-deoxyuridine analogs. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 538-543
- [201] Miot-Noirault E. *et al.*, The use of [¹²⁵I] scintigraphic in vivo imaging in melanoma-bearing mice for a rapid prescreening of vectors to melanoma tissue. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 629-636
- [202] Barreiro E. J. *et al.*, The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215-5246
- [203] Jain R. *et al.*, Synthesis and degradation of pH-sensitive linear poly(amidoamine)s. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457
- [204] Kwon Y. J. *et al.*, Directed antigen presentation using polymeric microparticle carriers degradable at lysosomal pH for controlled immune responses. *Mol. Pharmaceut.* **2005**, *2*, 83-91
- [205] Smith M. B. *et al.* *March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms and Structure 6th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey **2007**, 479, 1400, 1420
- [206] King S. A., Orthoester-dependent alcoholysis of lactones. Facile preparation of 4-alkoxybutanoates and 5-alkoxypentanoates. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2253-2256
- [207] Cortizo L. *et al.*, Synthesis and antidopaminergic activity of some 3-(aminomethyl)tetralones as analogs of butyrophenone. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2242-2247
- [208] Azim E.-M. *et al.*, Synthesis of 4-tert-butyl-3-(2-chloro-[2-¹⁴C]ethyl)ureido benzene. *J. Labelled Compd. Rad.* **1997**, *39*, 559-566
- [209] Piantadosi C. *et al.*, Plasmalogens. I. The synthesis of 1-alkenyl ethers of glycerol 1,2. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2425-2428
- [210] Craig J. C. *et al.*, Studies directed toward the synthesis of plasmalogens. I. Alkenylglycerols 1. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 907-910
- [211] Westera G. *et al.*, The reaction of Grignard reagents with 1,3-dioxolanes : III. A novel synthetic route to β -hydroxyalkyl enol ethers. *J. Organomet. Chem.* **1978**, *144*, 291-301

Bibliographie

- [212] Feugeas C., Organométalliques alkoxylés : action du magnésium sur les cétales cycliques de cétones halogénées saturées. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1963**, 421, 2568-2579
- [213] Viswesvariah S. *et al.*, One-pot α -bromoacetalization of carbonyl compounds. *Synthesis* **1982**, 1982, 309,310
- [214] Gassman P. G. *et al.*, General method for the synthesis of enol ethers (vinyl ethers) from acetals. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5574-5576
- [215] Park H. S. *et al.*, Facile synthesis of enol ethers by cleavage of α -bromoacetals and α -bromoketals mediated by SmI_2 . *Tet. Lett.* **2001**, 42, 3729-3732
- [216] Smith M. B. *et al.* *March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms and Structure 6th Edition*; Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey **2007**, 260-261
- [217] Salinger R. M. *et al.*, Infrared spectral studies of Grignard solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1782-1786
- [218] Ashby E. C. *et al.*, Composition of grignard compounds. VII. Composition of methyl- and tert-butylmagnesium halides and their dialkylmagnesium analogs in diethyl ether and tetrahydrofuran as inferred from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 1206-1213
- [219] Keegstra E. M. D. *et al.*, A highly selective synthesis of monodisperse oligo(ethylene glycols). *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6678-6680
- [220] Kazemi F. *et al.*, Chemoselective and scalable preparation of alkyl tosylates under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2007**, 63, 5083-5087
- [221] Grieco P. A. *et al.*, Selective deprotection of alkyl *t*-butyldimethylsilyl ethers in the presence of aryl *t*-butyldimethylsilyl ethers. *Tet. Lett.* **1999**, 40, 665-666
- [222] David Crouch R., Selective monodeprotection of bis-silyl ethers. *Tetrahedron* **2004**, 60, 5833-5871
- [223] Lipshutz B. H. *et al.*, Selective deprotection of alkyl vs. aryl silyl ethers. *Tet. Lett.* **1998**, 39, 2495-2498
- [224] Yadav J. S. *et al.*, A mild and selective cleavage of *tert*-butyldimethylsilyl ethers by indium(III) chloride. *New J. Chem.* **2000**, 24, 853-854
- [225] Crouch R. D. *et al.*, Deprotection of silyl ethers using ZnBr_2 and H_2O in CH_2Cl_2 . *Tet. Lett.* **2002**, 43, 7151-7153

RESUME

Le mélanome est un cancer dont l'incidence est toujours en augmentation et dont la mortalité ne faiblit pas, malgré les dispositifs de prévention et de détection précoce. Ce constat peut être principalement imputé au caractère invasif très marqué de cette pathologie, associé à un manque de traitements efficaces face à la maladie disséminée.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans l'initiation d'une stratégie d'adressage tumoral actif de prodrogues, qui s'appuie sur un vecteur ciblant les mélanines (ICF01012) possédant un profil pharmacocinétique favorable (fixation tumorale forte, spécifique et durable). Une première génération de quatre prodrogues constituées par un principe actif anticancéreux modèle (l'IUDR) conjugué au vecteur *via* diverses fonctions espaceurs (ester, acétal, carbonate et carbamate) a été synthétisée et évaluée *in vitro* sur des critères métabolique et physico-chimique. Les études de biodistribution *in vivo* après radiomarquage des deux composés les plus pertinents ont démontré une absence de vectorisation, principalement imputable à une métabolisation très rapide des prodrogues conduisant à la perte de l'édifice vecteur. Ainsi, une seconde génération de trois prodrogues variant la nature des espaceurs (chaînes pegylées, pour l'amélioration de ce dernier point et fonction cétal) a été synthétisée. Les résultats biologiques indiquent que l'insertion d'une chaîne pegylée courte augmente la stabilité métabolique par encombrement de la fonction amine tertiaire, conduisant à une faible fixation tumorale. De plus, un espaceur sensible au pH acide constitué par une fonction cétal a été identifié et devrait permettre une libération sélective du principe actif au sein de la tumeur grâce au pH intramélanosomal acide.

La libération sélective d'un principe actif par l'action d'une enzyme propre aux mélanosomes, la tyrosinase, a également été abordée par la synthèse de huit « prosondes » constituées par un substrat de l'enzyme (phénol ou catéchol), un espaceur auto-clivable et une sonde permettant d'étudier le mécanisme de libération. Une prosonde vectorisée incluant le vecteur a également été préparée. Des voies d'accès versatiles ont été conçues pour faciliter l'insertion ultérieure de principes actifs. L'aboutissement de cette étude devrait conduire à des prodrogues doublement spécifiques (*i.e.* distribution tumorale et libération spécifiques) conçues pour le traitement du mélanome métastaté.

TITLE

Design, synthesis and evaluation of prodrugs with cleavable linkers: application to targeted chemotherapy of metastatic melanoma.

ABSTRACT

Despite prevention campaigns and early detection, incidence and mortality of cutaneous melanoma are still increasing, due to its high invasiveness and the lack of efficient treatments against disseminated disease.

This work is the starting point of a melanoma targeted prodrug therapy approach based on a melanin-targeting ligand (ICF01012) which displays an appropriate *in vivo* kinetic profile (strong, specific and long-lasting tumor uptake). A first generation of four prodrugs with varied spacers (ester, acetal, carbonate and carbamate) was synthesized and evaluated *in vitro* on physicochemical and metabolic stability criteria. Two of them were selected and radiolabelled for *in vivo* evaluation which demonstrated non-specific distribution, mainly because of early metabolism leading to the loss of the targeting moiety. Taking into account these results, a second generation of three prodrugs varying the properties of spacers (pegylated chain for improving this last point and ketal function) was synthesized. Insertion of a short pegylated chain improved the metabolic stability by structural hindering of the tertiary amine function and led to a weak tumor uptake. Moreover, the ketal function was identified as a pH-sensitive linker able to selectively release the drug into the tumor due to the acidic intramelanosomal pH.

The enzymatic drug release by tyrosinase, a specific melanosomal enzyme, was also explored. Eight "pro-probes" including an enzyme substrate moiety (phenol or catechol), a self-immolative spacer and a probe allowing the release mechanism were synthesized. A pro-probe which includes the targeting moiety was also developed. During these studies, versatile synthetic pathways were designed for further easy incorporation of drugs. Achievement of this study should lead double specific prodrugs (*i.e.* specific tumor distribution and release) designed for metastatic melanoma treatment.

MOTS CLES

Mélanome ; chimiothérapie ; vectorisation ; prodrogues ; espaceurs clivables et auto-clivables ; MDEPT ; tyrosinase.

LABORATOIRE

UMR 990 INSERM / Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée
58, rue Montalembert BP184 63005 Clermont-Ferrand